



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Proteômica de *Paracoccidioides brasiliensis*:
uma análise quantitativa das fases miceliana e
leveduriforme e da transição dimórfica**

Tese de Doutorado

Aluna: Tereza Cristina Vieira de Rezende
Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Brasília, 11 de outubro de 2011

TEREZA CRISTINA VIEIRA de REZENDE

PROTEÔMICA DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*:
UMA ANÁLISE QUANTITATIVA DAS FASES MICELIANA E
LEVEDURIFORME E DA TRANSIÇÃO DIMÓRFICA

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular
da Universidade de Brasília como requisito para obtenção
do título de Doutor em Biologia Molecular

ORIENTADORA: PROFA. DR^A. CÉLIA MARIA de ALMEIDA SOARES

Brasília, 11 de outubro de 2011.

Tese desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Goiás

Apoio Financeiro: CNPq e FAPEG (PRONEX), FINEP e Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Luciano Paulino Silva, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília; Pesquisador A da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Profa. Dra. Sílvia Maria Salem Izacc, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes F. Filho, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.

SUPLENTE

Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.

*“Você nasceu para vencer,
mas para ser um vencedor
você precisa planejar para
vencer, se preparar para
vencer e esperar vencer”*

(Zig Ziglar)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar comigo em cada experimento realizado neste trabalho e em cada resultado obtido. Hoje eu sei que algumas situações adversas que aconteceram tiveram sua finalidade e me levaram a me aproximar e conhecer mais o caráter de Deus. Hoje eu conheço muito mais a Deus do que antes. Obrigada por me proteger e por direcionar minha vida. “Bendito seja o Senhor Deus que nunca me rejeitou a oração e nem afastou de mim a sua graça” (Salmos 66:20).

A todos da minha família, que me apoiaram em todos os momentos e, sem eles, essa conquista não seria possível.

Aos meus amigos fora do laboratório, que são mais do que amigos, e que me ajudam e torcem por mim.

À Profa. Dra Célia Maria de Almeida Soares, por me proporcionar todas as condições para realização do meu trabalho, pelas sugestões e críticas que muito contribuíram para meu crescimento profissional. Admirio a sua competência e seu esforço com a pesquisa!

À Profa Maristela pela acessibilidade e por sempre contribuir com sua experiência profissional.

Aos Professores Luciano, Sílvia, Bergmann, Edivaldo e Andréa por aceitarem participar da minha banca.

Aos Professores Carlos André e Marcelo V. de Sousa por aceitar a colaborar nesse projeto e por me receber em seu Laboratório de Química de Proteínas da UnB. A ajuda de vocês no início foi a base de todo trabalho realizado. Agradeço também à Adriana Magalhães, pela amizade sincera, pela disposição e ajuda constante. Obrigada por fazerem parte deste trabalho.

Agradeço ao Alexandre e Clayton pela ajuda na elaboração final do artigo. A contribuição de vocês amenizou meu cansaço de final de tese e contribuiu para que o artigo fosse publicado a tempo.

Agradeço especialmente ao Bruno e ao Carlos Enrique, pela valiosa ajuda nas análises estatísticas. Sem a ajuda, conhecimento e boa vontade de vocês, as análises estatísticas seriam quase impossíveis de terem sido realizadas. Muito obrigada!

Às amigas Luciane Almeida e Fabiane. Foi um grande privilégio conhecê-las. Vocês são profissionais competentes, simples e de boa índole. Obrigada pelas conversas agradáveis, conselhos e por compartilhar as experiências de vida.

Às amigas Dayane, Daciene (pequena flor), Patrícia Zambuzzi e Hellen por serem tão importantes nesse período de doutorado. Obrigada pelos conselhos, pela amizade, pelas alegrias, por me

ajudarem nas situações difíceis e me ergueram quando foi preciso. À Kelly pela amizade, competência profissional e contribuição nos experimentos de PCR em tempo real para o artigo. Obrigada pela amizade, pela ajuda e por sempre mostrar seu caráter cristão.

Aos amigos Laura, Leandro e Neto, obrigada pela ajuda e amizade de vocês. Tenho grande respeito e admiração por vocês. Ao Ronney, que por ter uma inteligência acima do normal, sempre me ajudava com os artigos do seminário.

Aos amigos que deram sua contribuição e foram seguir outro caminho: Sarah, Nádyá Castro, Sabrina, Rodrigo, Bruno, Bernadete, Ernna, Zilma, Luíz Augusto, Wesley, Natalli, Patrícia Kott e Ademar. Vocês fazem muita falta!

À amiga Renata Bastos, que algumas vezes deixou a correria da vida para me ouvir e me dar conselhos. Renata, você é do tipo de pessoa que faz as coisas acontecerem, e você tem mostrado sua competência a cada dia. Tenho um grande carinho e admiração por você.

Aos colegas do laboratório: À Juliana Parente, por compartilhar suas experiências. À Ana Flávia (que me ensinou a manusear o equipamento de espectrometria de massa), Renata, Simone Vitoriano, Nádia, Sheyla, Simone Weber, Patrícia Lima, Luíz Paulo, Laurine, Priscila, Amanda, Karine, Edilânia, Marielle, Mariana, Eliza e Mirelle.

À Professora Lídia do ICB/UFG, por disponibilizar o microscópio para tirar as fotos.

Aos funcionários da limpeza, por manterem o laboratório sempre limpo.

À Ana, secretária do Departamento de Biologia Celular, que sempre compreendeu o fato de eu fazer meus experimentos em outra cidade e sempre teve boa vontade em me atender por telefone. Ana, com certeza, seu trabalho e sua competência ajudam a manter o alto nível da Pós-graduação.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho. Muito obrigada!

Mais uma vez... obrigada à todos vocês por me ajudarem a percorrer esse caminho...

| <u>ÍNDICE</u> | <u>Página</u> |
|---|---------------------|
| <u>RESUMO</u> | <u>XVII</u> |
| <u>ABSTRACT</u> | <u>XVIII</u> |
| <u>I. INTRODUÇÃO</u> | <u>19</u> |
| I.1 – Aspectos gerais do fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | <u>19</u> |
| I.2 – Classificação Taxonômica | <u>19</u> |
| I.3 – Biologia do Fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | <u>20</u> |
| I.4 – Aspectos Epidemiológicos da PCM | <u>21</u> |
| I.5 – A doença Paracoccidioidomicose (PCM) | <u>22</u> |
| I.6 – Dimorfismo e virulência | <u>23</u> |
| I.6.1 – Análises Transcricionais no estudo do dimorfismo em <i>P. brasiliensis</i> | <u>27</u> |
| I.7 – Proteômica | <u>29</u> |
| I.8 – Tecnologia Proteômica | <u>30</u> |
| I.9 – Análise Proteômica de Fungos Patogênicos Humanos | <u>35</u> |
| <u>II – JUSTIFICATIVAS</u> | <u>37</u> |
| <u>III – OBJETIVOS</u> | <u>38</u> |
| II.1 – Objetivos específicos | <u>38</u> |
| <u>IV – MATERIAIS e MÉTODOS</u> | <u>39</u> |
| IV.1 – Isolado, Condições de Cultivo e Diferenciação do Fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> . | <u>39</u> |
| IV.2 – Preparo dos Extratos de Proteína totais | <u>41</u> |
| IV.3 – Eletroforese Bidimensional de Proteínas (2-DE) | <u>41</u> |
| IV.4 – Aquisição e Análise das Imagens | <u>42</u> |
| IV.5 – Análises Estatísticas | <u>43</u> |
| IV.6 – Digestão das proteínas para Espectrometria de Massa | <u>43</u> |
| IV.6.1 Identificação das proteínas por MS e MS/MS e pesquisa em banco de dados | <u>44</u> |
| IV.7 – Produção de conídios e transição de conídio para levedura | <u>45</u> |
| IV.8 – Extração de RNA, síntese de DNA e análise dos transcritos por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) | <u>45</u> |
| IV.9 – Análise por Western blotting | <u>47</u> |
| <u>V – RESULTADOS</u> | <u>48</u> |
| V.1 – Transição dimórfica de micélio para levedura no fungo <i>P. brasiliensis</i> | <u>48</u> |
| V.2 – Otimização dos géis bidimensionais (2-D) | <u>48</u> |
| V.3 – Análises Proteômicas do Fungo <i>P. brasiliensis</i> | <u>50</u> |
| V.4 – Identificações das proteínas do fungo <i>P. brasiliensis</i> através de espectrometria de massa | <u>54</u> |
| V.5 – Localização subcelular | <u>63</u> |
| V.6 – Correlação entre valores experimentais e teóricos | <u>63</u> |
| V.7 – Proteínas do fungo <i>P. brasiliensis</i> preferencialmente expressas na fase de micélio | <u>65</u> |
| V.8 – Proteínas do fungo <i>P. brasiliensis</i> preferencialmente expressas na transição micélio-levedura | <u>67</u> |
| V.9 – Proteínas do fungo <i>P. brasiliensis</i> preferencialmente expressas na fase de levedura | <u>69</u> |
| V.10 – Proteínas do fungo <i>P. brasiliensis</i> constitutivamente expressas nas condições analisadas | <u>71</u> |
| V.11 – Modificações pós-traducionais (MPTs): análises de acetilação, oxidação e | <u>73</u> |

| | |
|--|-------------------|
| fosforilação | |
| V.12 – Análises de transcritos por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) | <u>77</u> |
| V.13 – Análises por Western blotting | <u>79</u> |
| <u>VI – DISCUSSÃO</u> | <u>80</u> |
| VI.1 – Proteínas com expressão preferencial em micélio | <u>80</u> |
| VI.2 – Proteínas com expressão preferencial na transição micélio-levedura após 22 h de mudança da temperatura | <u>80</u> |
| VI.3 – Proteínas com expressão preferencial na fase leveduriforme | <u>83</u> |
| VI.4 – Modificações Pós-Traducionais (MPTs) | <u>84</u> |
| <u>VII – CONCLUSÕES</u> | <u>86</u> |
| <u>VIII – BIBLIOGRAFIA</u> | <u>87</u> |
| <u>IX – ANEXOS</u> | <u>101</u> |
| IX.1 – Produção científica durante o doutoramento | <u>101</u> |

ÍNDICE DAS FIGURAS

| | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| Figura 1 – Regiões endêmicas da PCM na América Latina | <u>21</u> |
| Figura 2 – Componentes básicos do espectrômetro de massa | <u>31</u> |
| Figura 3 – Nomenclatura da fragmentação descrita por Roepstorff & Fohlman | <u>33</u> |
| Figura 4 – Desenho experimental | <u>40</u> |
| Figura 5 – Fluxograma das análises de imagens realizadas entre as três condições: micélio (M), transição (T) e levedura (L) | <u>43</u> |
| Figura 6 – Otimização dos géis 2-D | <u>49</u> |
| Figura 7 (A) – Perfil de proteínas de <i>P. brasiliensis</i> identificadas por espectrometria de massa | <u>51</u> |
| Figura 7 (B) – Perfil de proteínas de <i>P. brasiliensis</i> identificadas por espectrometria de massa | <u>52</u> |
| Figura 7 (C) – Perfil de proteínas de <i>P. brasiliensis</i> identificadas por espectrometria de massa | <u>53</u> |
| Figura 8 – Diagrama representando as proteínas identificadas em cada fase do fungo | <u>54</u> |
| Figura 9 – Análises <i>in silico</i> da localização subcelular das proteínas de <i>P. brasiliensis</i> | <u>63</u> |
| Figura 10 – Gráfico de correlação entre a massa molecular experimental e teórica (A) e entre o <i>pI</i> experimental e teórico (B) | <u>64</u> |
| Figura 11 – Ampliação das regiões dos géis que mostram as diferenças na expressão da proteína entre as três condições analisadas: micélio, transição e levedura | <u>66</u> |
| Figura 12 – Ampliação das regiões dos géis que mostram as diferenças na expressão da proteína entre as três condições analisadas: micélio, transição e levedura | <u>68</u> |
| Figura 13 – Ampliação das regiões dos géis que mostram as diferenças na expressão da proteína entre as três condições analisadas: micélio, transição e levedura | <u>70</u> |
| Figura 14 – Modelo proposto para as alterações metabólicas que ocorrem durante a transição de micélio para levedura | <u>72</u> |
| Figura 15 – Transição dimórfica em <i>P. brasiliensis</i> | <u>77</u> |
| Figura 16 – Análises de transcritos por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) | <u>78</u> |
| Figura 17 – Validação dos resultados de proteoma por Western blotting e amplificação de regiões de <i>spots</i> | <u>79</u> |

ÍNDICE DAS TABELAS

| | <u>Página</u> |
|---|------------------|
| Tabela 1 – Lista dos oligonucleotídeos utilizados | <u>46</u> |
| Tabela 2 – Identificação das proteínas de <i>P. brasiliensis</i> com expressão preferencial na fase de miceliana quando comparadas com as fases de transição de micélio-levedura e levedura | <u>55</u> |
| Tabela 3 – Identificação das proteínas de <i>P. brasiliensis</i> com expressão preferencial na fase de transição de micélio-levedura quando comparadas com as fases de micélio e de levedura | <u>57</u> |
| Tabela 4 – Identificação das proteínas de <i>P. brasiliensis</i> com expressão preferencial na fase leveduriforme quando comparadas com as fases de micélio e de transição de micélio-levedura | <u>59</u> |
| Tabela 5 – Identificação das proteínas constitutivas de <i>P. brasiliensis</i> quando comparadas com as fases de micélio, transição de micélio-levedura e levedura | <u>61</u> |
| Tabela 6 – Predição das modificações pós-traducionais das isoformas das proteínas identificadas | <u>74</u> |
| Tabela 7 – Análise dos espectros das modificações pós-traducionais das isoformas das proteínas identificadas | <u>75</u> |

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|-------------------|---|
| 4-HPPD | 4-hidro-fenil-piruvato desidrogenase |
| 2-D | Gel bidimensional |
| 2-DE | Eletroforese bidimensional |
| µg | micrograma |
| µL | microlitro |
| µm | micrômetro |
| ACN | acetona nitrila |
| ADF | fatores de despolimerização da actina, também conhecidos como destrinas |
| ADH | álcool desidrogenase |
| ANOVA | Análise de variância |
| ATP | adenosina trifosfato |
| BCIP | 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato |
| BAD1 | Blastomyces <u>adhesin</u> (formerly WI-1) - adesina do fungo Blastomyces e é formalmente chamada de WI-1 |
| Bmh | genes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ortólogos à 14-3-3 em <i>P. brasiliensis</i> |
| BYS | gene específico da fase leveduriforme e de função desconhecida |
| CA | anfólitos carreadores |
| cAMP | adenosina monofosfato cíclico |
| CBP1 | proteína de ligação ao cálcio |
| CEK1 | MAPK relacionada com a formação de hifa |
| CHAPS | cyclohexyl amino propanesulfonic acid |
| CHCA | ácido α-ciano- 4-hidroxicinamico |
| CDC42 | (ciclin-dependent kinases) proteína que controla a divisão celular, relacionada com formação de hifa |
| CaCl ₂ | cloreto de cálcio |
| CDI1 | cisteína dioxigenase |
| cDNA | DNA complementar |
| CHS1 | colina sulfatase |
| CPP1 | fosfatase relacionada com formação de hifa |
| CID | colisão induzida por dissociação |
| CPP1 | fosfatase relacionada com formação de hifa |
| CR3 | receptor do complemento tipo 3 |
| CTS | quitinase |
| CST20 | quinase relacionada com formação de hifa |
| ClpB | (caseinolytic protease) chaperona Clpb |

| | |
|--------|--|
| D.O | densidade óptica |
| DD | apresentação diferencial |
| DDC | descarboxilase de aminoácidos aromáticos |
| DFG5 | deficiente para o crescimento filamentosos 5 |
| DIGE | Eletroforese de fluorescência diferencial em gel 2D |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| DOPA | l-3,4-dihidroxi-fenilalanina |
| DTT | ditriotreitól |
| DRK | dimorphism-regulating histidina kinase - sistema de sinalização de dois componentes que controla a transição dimórfica e a virulência em <i>B. dermatitidis</i> e <i>H. capsulatum</i> |
| EBP | proteína que liga-se ao estradiol |
| EDTA | ácido etilenodiaminotetracético |
| ECM | matriz extracelular |
| ERG25 | C-4-esterol metil oxidase |
| ESI | ionização tipo eletrospray |
| EST | etiqueta de sequência expressa |
| Fe | ion ferro |
| f1B | fator de alongação 1B |
| FBA | frutose bifosfato aldolase |
| FMD | formamidase |
| Gp | glicoproteína |
| GAPDH | gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase |
| GAS | glicofosfolípido ancorado à superfície |
| GEF | proteína do tipo Ras, relacionada com formação de hifa |
| GEL | glucanosil transferases |
| GFP | proteína fluorescente verde |
| GlcN | glicosamina |
| GlcNAc | N-acetilglicosamina |
| GLN | glutamina sintase |
| GPI | glicosil-fosfatidil-inositol |
| HCl | ácido clorídrico |
| HPLC | cromatografia líquida de alta resolução |
| HSP | proteína de choque térmico |
| HSP-1 | fator transcricional de choque térmico-1 |
| IEF | focalização isoelétrica |
| IPG | gradiente de pH imobilizado |
| IAA | Iodoacetamida |
| IPTG | isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo |
| ITS | sequência espaçadora interna |

| | |
|----------------------------------|---|
| Kb | kilobases |
| kDa | kilodalton |
| M | molar |
| MgSO ₄ | sulfato de magnésio |
| mA | miliampére |
| mg | miligrama |
| mL | mililitros |
| mm | milímetros |
| mM | milimolar |
| Mpb | mega pares de bases |
| MALDI | ionização por dessorção a laser auxiliado por uma matriz |
| MALDI-TOF | ionização por dessorção a laser assistida por matriz e análise por tempo de voo (TOF) |
| MALDI-TOF-TOF | fonte tipo MALDI com dois analisadores em série tipo TOF |
| MALDI-Q-TOF | fonte tipo MALDI com dois analisadores híbridos tipo quadrupolo e tempo de voo (TOF) |
| MAPK | proteína quinase ativada por mitógeno |
| MM | massa molecular |
| MnSOD | superóxido dismutase dependente de manganês |
| MEP | metionina permease |
| metG | cistationa β-liase |
| MS | espectrometria de massa |
| m/z | razão massa-carga |
| NaCl | cloreto de sódio |
| NaOH | hidróxido de sódio |
| NADH | nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido |
| NADPH | nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido |
| NH ₄ HCO ₃ | bicarbonato de sódio |
| NBT | nitro azul de tetrazol |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NTBC | [2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-ciclohexano-1,3-diona] |
| ng | nanograma |
| NL | não linear |
| nm | nanômetros |
| ODC | ornitina descarboxilase |
| ORF | quadro de leitura aberta |
| PA | persulfato de amônia |
| PAGE | eletroforese em gel de poliacrilamida |
| pb | pares de bases |
| <i>Pb</i> Y20 | proteína homóloga à flavodoxina |

| | |
|---------------|--|
| PBS | solução de tampão fosfato |
| PCR | reação em cadeia da polimerase |
| PCM | paracoccidiodomicose |
| Pdi | proteína disulfeto isomerase |
| PFGE | gel em eletroforese de campo alternado |
| PKA | proteína quinase A |
| PMF | impressão digital do mapa peptídico |
| pH | potencial hidrogeniônico |
| pI | ponto isoelétrico |
| Pmp1 | proteína da matriz peroxissomal |
| p/v | peso por volume |
| q.s.p | quantidade suficiente para |
| qRT-PCR | RT-PCR quantitativo em tempo real |
| RACK1 | receptor for activated C kinases |
| RAPD | polimorfismo de DNA amplificado randomicamente |
| RDA | análise da diferença representacional |
| RNAse | ribonuclease |
| RNI | intermediários reativos de nitrogênio |
| ROI | intermediários reativos de oxigênio |
| ROS | espécies reativas ao oxigênio |
| rDNA | DNA ribossomal |
| RNA | ácido ribonucleico |
| mRNA | RNA mensageiro |
| rRNA | RNA ribossomal |
| RT | transcrição reversa |
| RT-PCR | reação da transcriptase reversa e pcr |
| SAGE | análise serial da expressão gênica |
| SDS | dodecil sulfato de sódio |
| SFB | soro fetal de bovino |
| SNF22 | complexo de remodelagem da cromatina |
| SOW | spherule outer wall – proteína específica da fase leveduriforme de <i>C. immitis</i> |
| TCA | ácido tricloroacético |
| TFA | ácido trifluoroacético |
| TIFF | Tag Image File Format |
| TNF- α | fator de necrose tumoral alfa |
| Tris | tris(hidroximetil)aminometano. |
| TEMED | N, N, N', N'-tetra metiletlenodiamina |
| TPI | triose fosfato isomerase |
| UDP | Uridina difosfato |

| | |
|------|---|
| UI | unidade internacional |
| UV | ultravioleta |
| V | volts |
| v | volume |
| v/v | volume por volume |
| Wos2 | co-chaperona de associação à Hsp90 |
| Yps3 | yeast-phase-specific (proteína específica da fase de levedura no fungo <i>Histoplasma</i>) |

RESUMO

Dimorfismo é uma característica importante para sobrevivência fúngica em diferentes ambientes e tem sido relacionado com a virulência. O fungo ascomiceto, *Paracoccidioides brasiliensis*, agente causador da paracoccidioidomicose, pode crescer nas fases de micélio ou de levedura. A patogenicidade do *P. brasiliensis* é frequentemente associada com a transição dimórfica, de saprófita a patogênico, mas os mecanismos que regulam esse processo permanecem obscuros. Uma das maneiras de estudar esse fenômeno seria isolar e caracterizar proteínas que são especificamente expressas em um dos estágios do ciclo de vida e/ou durante a diferenciação. Eletroforese bidimensional (2-DE) foi utilizada para comparar o proteoma de micélio e de levedura do isolado Pb01 e após 22 h de transição de micélio para levedura. Os géis corados pela prata de três replicatas biológicas independentes foram digitalizados e as imagens foram analisadas utilizando-se o software Image Master 2D Platinum 6.0 software (GE Healthcare). A detecção dos *spots* e o pareamento foram realizados. A intensidade dos *spots* foi normalizada e as análises estatísticas avaliada por one-way ANOVA. Os *spots* de interesse obtidos dos géis 2-D foram retirados, digeridos com tripsina e os peptídeos foram então analisados por MS e/ou MS/MS. Um total de 100 proteínas/isoformas foi identificado; 81 foram diferencialmente expressas nas três fases do fungo, enquanto que 19 proteínas/isoformas foram constitutivamente expressas. A expressão de proteínas como superóxido dismutase e peroxiredoxina mitocondrial foi mais abundante na fase miceliana. Nos estágios iniciais da transição (22 h) algumas enzimas envolvidas na glicólise, como enolase e fosfoglicomutase, estão aumentadas. Proteínas de choque térmico e ATP sintase também estão significativamente aumentadas durante o evento de transição. Proteínas preferencialmente expressas na fase leveduriforme foram identificadas. Muitas das enzimas da via glicolítica e algumas enzimas do ciclo do glioxalato e metabolismo de lipídeos foram mais abundantes em levedura. Para validar os resultados dos géis 2-D foi realizado *western blotting* de seis proteínas diferentes, e os resultados foram confirmados. Os resultados foram validados por RT-PCR em tempo real nas três condições estudadas, incluindo conídio e transição de conídio para levedura. Os resultados demonstram uma mudança no metabolismo durante a transição de micélio para levedura; o mesmo padrão foi evidenciado na transição de conídio para levedura.

Palavras chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, dimorfismo, análise proteômica, espectrometria de massa, RT-PCR em tempo real, conídio.

ABSTRACT

Fungal dimorphism is important for survival in different environments and has been related to virulence. The ascomycete *Paracoccidioides brasiliensis*, the causative agent of paracoccidioidomycosis, can grow as mycelia or yeast. The pathogenicity of *P. brasiliensis* is frequently associated with the dimorphic shift, from a saprobe to a pathogenic lifestyle, but the mechanisms that regulate the process is still poorly understood. One way to study this phenomenon is to isolate and characterize proteins that are specifically expressed in one of the stages of the life cycle and/or during differentiation. Two-dimensional gel electrophoresis we used to investigate the proteins expressed differentially during transition from mycelia to yeast forms of isolate *Pb01* after 22 h of temperature shift. Silver-stained gels of three independent biological replicates were digitalized and the images were analyzed using the ImageMaster 2D Platinum 6.0 software (GE Healthcare). Spot detection and matching was performed. Spot intensities were normalized and the statistics analyses were estimated by one-way ANOVA. The spots of interest were excised, in-gel digested with trypsin, and the peptides were then analyzed by MS and/or MS/MS. A total of 100 proteins/isoforms were identified; 81 were differentially expressed in the three phases of the fungus, whereas 19 proteins/isoforms were constitutively expressed. Enzymes such as superoxide dismutase and mitochondrial peroxiredoxin have been detected as abundant in the mycelium phase. After the early stage of transition (22 h) some enzymes involved in glycolysis, such as enolase and phosphoglutomutase, were increased. Heat shock proteins and ATP synthase were also significantly increased in the transition event. Proteins preferentially expressed in the yeast phase were identified. Most of the enzymes of glycolysis, and some of the glyoxylate cycle and lipid metabolism were more abundant in yeast cells. To validate the 2-D gels results we performed *western blotting* of six different proteins, and the results were confirmed. The results were also validated by real-time RT-PCR in the three studied conditions, including conidia and conidia-yeast transition. The results demonstrated a shift in the metabolism during transition from mycelia to yeast cell; the same patterns were evidenced in the conidia to yeast transition.

Words key: *Paracoccidioides brasiliensis*, dimorphism, proteomic analysis, mass spectrometry, real-time reverse transcription-PCR, conidia.

Introdução 1

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros foram “

Grahan Bell

I - INTRODUÇÃO

1.1 – Aspectos gerais do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

Paracoccidioides brasiliensis, filogeneticamente considerado um fungo ascomiceto, é capaz de adaptar-se para sobreviver no hospedeiro causando a doença paracoccidioidomicose (PCM), a mais prevalente micose sistêmica na América Latina (Restrepo *et al.*, 2001). A doença tem grande impacto social, pois afeta principalmente trabalhadores rurais e do sexo masculino, sendo a sétima causa de morte dentre as doenças crônicas infecciosas no Brasil (Barrozo *et al.*, 2009).

O fungo foi originalmente descrito por Adolpho Lutz em 1908, isolado de lesões orais e de linfonodo cervical no Instituto Biológico de São Paulo (Brasil). Observando os exames histológicos de um de seus pacientes, Adolpho Lutz declarou que a ausência de esférulas com esporos no seu interior diferenciava o fungo de outros espécimes característicos de coccidioidomicose, descrito previamente na Argentina por Posadas em 1892 (Posadas, 1892). Inicialmente, o fungo *P. brasiliensis* foi denominado *Zymonema brasiliensis* por Splendore em 1912. Em 1930, Floriano de Almeida propôs o nome *Paracoccidioides brasiliensis* quando o distinguiu do agente *Coccidioides immitis*, mas a doença foi reconhecida oficialmente como paracoccidioidomicose pela Organização Mundial de Saúde apenas em 1971 (Marques, 1998).

P. brasiliensis é um fungo que apresenta dimorfismo térmico. Em condições ambientais e de cultivo *in-vitro* o fungo cresce na temperatura de 22 a 27 °C como micélio (Lacaz, 1994) que, quando examinado ao microscópio de luz, apresenta hifas finas e septadas com raros clamidósporos terminais ou intercalares e com vários núcleos (Franco *et al.*, 1989). Sob condições de estresse ou falta de nutrientes o micélio pode transformar-se em conídios (Restrepo, 1988) os quais também exibem dimorfismo e, quando incubados à temperatura de 36 °C ou alojados nos pulmões podem transformar-se em leveduras multinucleadas (McEwen *et al.*, 1987). As células leveduriformes apresentam morfologia oval ou alongada, contendo múltiplos núcleos (2 a 5 por células). Sua parede celular é birrefringente com blastoconídios simples ou múltiplos gerados por germinação, conferindo ao fungo a característica primordial em sua identificação, o aspecto de “roda de leme” (Lacaz *et al.*, 1991). O aspecto morfológico do fungo também foi descrito nos tecidos do hospedeiro, onde foi possível observar que durante a infecção ativa, as lesões contêm um elevado número de leveduras, sendo que destas, 24 – 33 % apresentam múltiplos brotamentos (Restrepo, 2000).

1.2 – Classificação Taxonômica

Avanços nas técnicas moleculares têm permitido a caracterização taxômica de espécies de microrganismos com base principalmente, no RNA ribossomal (rRNA) e seu correspondente DNA ribossomal (rDNA) (James *et al.*, 1996). Leclerc *et al.* (1994) e Bialek *et al.* (2000) compararam sequências de rDNA da subunidade ribossomal maior entre fungos dermatófitos e dimórficos e propuseram a classificação do *P. brasiliensis* como pertencente ao filo Ascomycota, a ordem Onygenales e a família Onygenaceae, junto com os as formas teleomórficas de *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* e *Histoplasma capsulatum var. duboissi*.

Matute et al. (2006), em estudos de polimorfismo genético, descreveram a existência de três diferentes espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*: S1 (espécie 1), PS2 (espécie filogenética 2) e PS3 (espécie filogenética 3). A espécie filogenética PS3 está geograficamente restrita à Colômbia, enquanto S1 está distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela. Alguns isolados da espécie filogenética PS2 foram encontrados no Brasil nos estados de São Paulo e Minas Gerais e ainda na Venezuela. Todas as três espécies foram capazes de induzir a doença em hospedeiros humanos e animais; no entanto, PS2 apresentou menor virulência.

Carrero et al. (2008) realizaram análises filogenéticas comparando sequências de regiões codantes, não codantes e ITS (sequência espaçadora interna – “internally transcribed sequence”) de 7 novos isolados e 14 isolados já estudados de *P. brasiliensis*, oriundos do Brasil, Colômbia e Venezuela, por meio do método de comparação genealógica GCPSR (genealogical concordance phylogenetic species recognition). Vinte isolados se agruparam em dois dos três grupos filogenéticos descritos anteriormente (S1, PS2 e PS3), com exceção do isolado *Pb01* (objeto de nossos estudos). Este isolado claramente separa-se de todos os outros, apresentando uma alta variabilidade genética quando comparado com os outros isolados de *P. brasiliensis*, podendo constituir uma nova espécie no gênero *Paracoccidioides* (Carrero et al., 2008; Theodoro et al., 2008).

Na tentativa de resolver a taxonomia do *Pb01*, Teixeira et al. (2009) usaram o método de GCPSR para investigar as diferenças genômicas do *Pb01* com a anteriormente descrito por Carrero et al. (2008). Foram utilizados 122 isolados, compreendendo o *Pb01* e outros isolados da América Latina. As características morfológicas de conídio e de levedura dos isolados foram analisadas. De acordo com o método utilizado, o *Pb01* exibiu grande divergência em relação aos três grupos (S1, PS2 e PS3), inclusive diferenças morfológicas. De acordo com os autores, o *Pb01* (referido como “*Pb01-like*”) pode ser considerado uma nova espécie filogenética, e sugerem a mudança do nome para *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem a Adolfo Lutz.

1.3 – Biologia do Fungo *P. brasiliensis*

A determinação exata do local e as condições onde o fungo ocorre na natureza ainda não são completamente entendidas, embora evidências apontem o solo como sendo o provável habitat do *P. brasiliensis* (Terçarioli et al., 2007). O isolamento do fungo já foi obtido do solo (Albornoz, 1971), de fezes de pinguim e de morcego e de uma amostra comercial de ração canina, provavelmente contaminada com solo (Silva-Vergara et. al., 1998). A frequência de infecção por *P. brasiliensis* em tatus *Dasyus novemcinctus* é alta e o fungo já foi isolado em 75-100% dos animais capturados nas áreas endêmicas de PCM. Os estudos indicam que esses animais possam ser hospedeiros silvestres do fungo, podendo, desenvolver a doença, embora não se acredite que sejam hospedeiros intermediários no processo de infecção, pois os mesmos podem ser acometidos com a doença (Bagagli et al., 2003).

Richini-Pereira et al. (2008) demonstraram, por técnicas moleculares, a presença de *P. brasiliensis* em animais selvagens mortos em estradas e rodovias. Por meio de Nested-PCR (reação em cadeia da polimerase) com oligonucleotídeos ITS específicos para *P. brasiliensis*, detectou-se o

fungo em tatu (*Dasyopus sp.*), preá (*Cavia aperea*), porco espinho (*Sphigurrus spinosus*), guaxinim (*Procyon cancrivorus*) e furão (*Gallictis vittata*). A detecção do fungo *P. brasiliensis* em diferentes órgãos de diferentes espécies mostra que o fungo pode ter diferentes perfis de disseminação.

Recentemente, os genomas estruturais de três isolados de *P. brasiliensis* (*Pb01*, *Pb03* e *Pb18*) foram finalizados por meio do projeto denominado "Genômica Comparativa de *Coccidioides* e outros Fungos Dimórficos". Assim, foram depositados, o genoma completo de três diferentes isolados de *P. brasiliensis*, *Pb01*, *Pb03* e *Pb18* (Broad Institute, <http://www.broad.mit.edu/tools/data/seq.html>). O genoma do isolado *Pb01* é composto de 32,94 Mpb, com um total de 9.132 genes. Este isolado apresenta o genoma maior tanto em número de bases quanto em quantidade de genes comparado aos outros dois isolados analisados, que apresentaram genomas do tamanho de 29,06 e 29,95 Mb, com número de genes de 7.875 e 8.741 (dados dos isolados *Pb03* e *Pb18*, respectivamente). Os resultados obtidos, além de auxiliar na compreensão das diferenças existentes entre os isolados proporcionarão a caracterização de genes e suas regiões promotoras, e o desenvolvimento de novas ferramentas biomoleculares e genéticas para a elucidação de aspectos da biologia de *P. brasiliensis*.

1.4 – Aspectos Epidemiológicos da PCM

A PCM é endêmica na América Latina e por não ser uma doença de notificação compulsória, os dados sobre sua incidência no Brasil são imprecisos. Os cálculos são baseados em relatos de casos; com isso estima-se que só no Brasil a incidência seja de 1 a 3 novos casos para cada 100.000 habitantes. Muitos países da América Latina relatam a ocorrência do fungo, com grande incidência no Brasil, Venezuela, Colômbia e Equador com casos esporádicos no México (Figura 1) (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

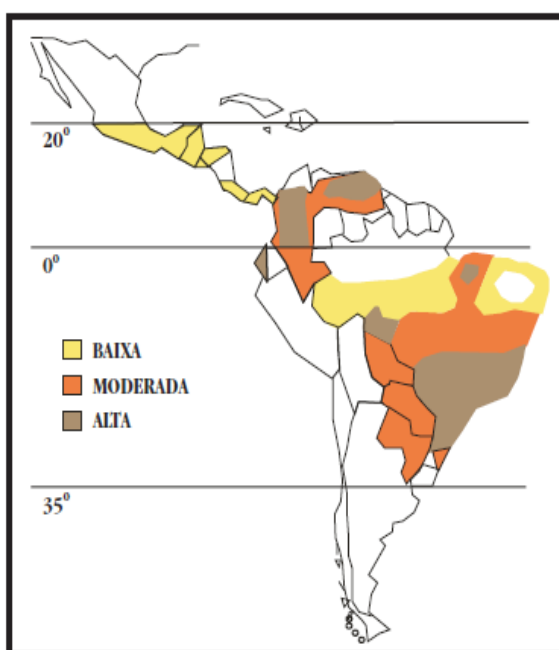


Figura 1 - Regiões endêmicas da PCM na América Latina (obtido de Shikanai-Yasuda et al., 2006)

Alguns casos autóctones já foram diagnosticados na Europa, nos Estados Unidos da América e na Ásia (Joseph et al., 1966; Ajello & Polonelli, 1985). Estes relatos possibilitaram a determinação de um período assintomático da PCM, o qual é em média 15,3 anos, que ocorre após o contato do paciente com a área endêmica até a manifestação da doença (Brummer et al., 1993). O longo período de latência, característico da PCM, dificulta o processo de determinação precisa do sítio onde a infecção ocorreu (Borelli, 1972).

No Brasil, a doença tem distribuição mais frequente nos Estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Goiás. Nas últimas décadas houve muitas alterações da frequência e na distribuição geográfica da doença chegando a atingir até a região Norte do país, sobretudo a Amazônia. É possível que atividades relacionadas à agropecuária e a melhoria do testes diagnósticos expliquem estas alterações (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

A PCM atinge predominantemente trabalhadores rurais do sexo masculino, entre 30 a 60 anos de idade (Svidzinski et al., 1999; Villa et al., 2000). A incidência da doença até a puberdade é a mesma em ambos os sexos, porém na fase adulta, mais de 80% dos pacientes são do sexo masculino (Martinez, 1997). Acredita-se que esse fato seja explicado pela ação protetora que os hormônios estrógenos conferem ao sexo feminino (Sano et al., 1999), e pela ausência ou menor contato das mulheres com as fontes de infecção (Marques et al., 1983).

1.5 – A doença Paracoccidioidomicose (PCM)

A PCM é uma micose infecciosa, granulomatosa, crônica e sistêmica. A principal rota de infecção ocorre pela inalação de conídios produzidos pela forma miceliana do fungo, que ao atingirem os pulmões podem transformar-se em células leveduriformes. A PCM apresenta duas formas clínicas principais: forma aguda ou subaguda (juvenil) e forma crônica (adulta). A forma aguda representa 3 a 5% dos casos descritos, sendo a maioria dos pacientes constituídos por crianças, adolescentes ou adultos jovens. É a forma clínica menos frequente e o período de incubação é de semanas até meses (Barrozo et al., 2009). A doença caracteriza-se por um desenvolvimento rápido e por marcante envolvimento de órgãos como baço, fígado, gânglios linfáticos e medula óssea. Apesar de não haver manifestações clínicas ou radiológicas de comprometimento pulmonar, pode-se isolar o fungo do lavado brônquico, evidenciando a participação do pulmão como porta de entrada, mesmo na ausência de alteração radiológica (Restrepo et al., 1983).

A forma crônica é a forma encontrada em adultos e é a mais frequente (90%), acometendo principalmente homens com mais de 30 anos de idade. O período de latência pode variar desde alguns meses ou até décadas. Ao contrário da forma aguda, o quadro clínico apresenta um desenvolvimento lento com comprometimento pulmonar evidente (Brummer et al., 1993). Em aproximadamente 25% dos casos, o pulmão é o único órgão afetado (forma unifocal), mas é uma doença que tem tendência à disseminação, sendo pouco frequentes os quadros pulmonares isolados (Restrepo et al. 1983). Nesses casos constata-se mais frequentemente, o envolvimento de outros órgãos - pele, mucosas das vias aéreas superiores, tubo digestivo e linfonodos. Na forma crônica disseminada, os sintomas são variáveis, podendo ocorrer lesões nas mucosas orais e nasais, pele,

gânglios linfáticos e adrenais. Menos frequentemente, podem ocorrer envolvimento ocular, destruição óssea, e comprometimento dos sistemas nervoso e vascular (Rivitti & Aoki, 1999). Os sintomas da PCM são variáveis e diferentes manifestações clínicas da doença e a ocorrência de infecções assintomáticas podem resultar de fatores relacionados ao hospedeiro como, sexo, idade e condições imunológicas bem como da virulência do agente infeccioso (Franco et al., 1993).

1.6 – Dimorfismo e virulência

P. brasiliensis é um fungo dimórfico apresentando as formas micélio e leveduriforme. A transição das fases é um requerimento essencial para ocorrência da PCM e de outras doenças causadas por fungos dimórficos e os mecanismos moleculares que controlam essa transição permanecem obscuros (Nemecek et al., 2006). Assim como outros fungos dimórficos patogênicos, a transição da fase miceliana para a fase leveduriforme é essencial para o *P. brasiliensis* estabelecer a doença, visto que linhagens incapazes de diferenciar para levedura não são virulentas (Franco, 1987; San-Blas & Niño-Veja, 2001; Nemecek et al., 2006).

Um dos estímulos ambientais mais notórios no dimorfismo do *P. brasiliensis* é a temperatura, sendo considerado um importante fator de virulência para vários fungos patogênicos (Franco, 1987). *P. brasiliensis* se apresenta como micélio a 22 °C – 25 °C e como levedura a 35 °C – 37 °C (San-Blas et al., 2002). Além da temperatura, fatores nutricionais também podem interferir no processo dimórfico do patógeno. A adição de soro fetal de bezerro tanto ao meio de cultura complexo quanto ao meio quimicamente definido permitiu preservar a expressão fenotípica de leveduras, a 25 °C (Villar et al., 1988).

Um dos aspectos da relação entre *P. brasiliensis* e o hospedeiro é o efeito de hormônios no dimorfismo do fungo. A alta incidência de PCM em adultos do sexo masculino sugere que fatores hormonais possam desempenhar algum papel na patogênese da doença (Sano et al., 1999). O hormônio feminino 17- β -estradiol tem sido relacionado com a diferenciação de *P. brasiliensis*. Estudos prévios mostraram que o hormônio 17- β -estradiol é capaz de inibir a transição de micélio para levedura de maneira dose dependente, *in vitro* (Restrepo, 1985), e *in vivo* (Sano et al., 1999). Aristizabal et al., (2002) observaram, *in vivo*, a participação do hormônio feminino na resistência de fêmeas de rato ao desenvolvimento inicial da PCM. Estudos transcricionais (Felipe et al., 2005) descreveram um gene preferencialmente expresso na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* que potencialmente codifica uma proteína de ligação ao 17- β -estradiol, previamente caracterizada (Loose et al., 1983). A EBP (“Estradiol Binding Protein”) possui interação seletiva a estrogênios ligando-se ao estradiol no citoplasma (Loose et al., 1983; Clemons et al., 1989). Acredita-se que a interação do hormônio 17- β -estradiol com a EBP citoplasmática iniba a transição de micélio para levedura, explicando a baixa incidência da PCM em mulheres.

P. brasiliensis tem se tornado um importante modelo para estudar o processo de transição dimórfica em fungos patogênicos (San-Blas et al., 2002; San-Blas & Niño-Vega 2004). Com esse objetivo, Niño-Vega et al. (2007) caracterizaram e analisaram o perfil de expressão de transcritos durante a transição dimórfica do gene codificante da actina. A expressão do gene foi acompanhada

por análises de *Northern blotting* durante a transição de micélio para levedura e de levedura para micélio. Os resultados mostraram que o transcrito é detectado em ambas as fases, mas com expressão preferencial após 48 h do início da transição de micélio para levedura, sugerindo que a proteína tem uma resposta adaptativa rápida ao estresse térmico. A actina é um dos responsáveis pela maquinaria morfogenética em fungos dimórficos. Em *P. brasiliensis* a transição dimórfica de micélio para levedura é de extrema importância para a expressão de genes envolvidos com a patogenicidade. Os autores enfatizam a importância de estudar as funções e interações entre a actina e outros elementos do citoesqueleto no processo de transição.

Proteínas específicas da fase leveduriforme de fungos são potenciais fatores de virulência. Em *B. dermatitidis* uma proteína antigênica de 120 kDa - a BAD1 (formalmente chamada de WI-1), é específica da fase leveduriforme (Rooney *et al.*, 2001) e tem função de adesina, sendo responsável pela adesão do fungo aos macrófagos e tecidos dos pulmões, mediando a virulência. Em *H. capsulatum*, as proteínas de ligação ao cálcio (CBP1) e a Yps3 (gene específico da fase leveduriforme - "yeast-phase-specific"), ambas específicas da fase leveduriforme, são importantes para o desenvolvimento da patogenicidade e virulência do fungo *H. capsulatum* (Batanghari *et al.*, 1998; Sebghati *et al.*, 2000, Bohse and Woods, 2005). Hung *et al.*, (2002) descreveram que a proteína SOWgp (spherule outer wall) específica da fase leveduriforme de *C. immitis* é capaz de ligar-se à proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, e tem sido relacionada à patogenicidade e virulência nesse fungo.

Genes envolvidos no controle da transição dimórfica e expressão de fatores de virulência em fungos dimórficos foram descritos por Nemecek *et. al.* (2006), que demonstraram fortes evidências da existência de um controle global para ambos, a morfogênese e a patogenicidade. Os autores descreveram um sistema de sinalização de dois componentes - o híbrido histidina quinase (DRK1) - que controla a transição dimórfica e a virulência em *B. dermatitidis* e *H. capsulatum*. Experimentos utilizando a técnica de RNA de interferência para silenciar a expressão do gene DRK1 inibiu a expressão de BAD1, alterou a parede celular, reduziu a transcrição do gene codificante da α -1,3-glicana sintase e do gene BYS1 (um gene específico da fase leveduriforme e de função desconhecida - a yeast-phase gene of unknown function). Em *H. capsulatum*, a expressão dos genes CBP1, AGS1 e yps3, específicos da fase leveduriforme, são regulados pelo DRK1. Alterações no ambiente como temperatura, estresse osmótico ou oxidativo, privação de nutrientes, alteração no potencial de óxido-redução e 17- β -estradiol são detectados pelo sistema DRK1, o qual gerencia a adaptação do fungo ao novo ambiente estimulando a transição dimórfica, a expressão de fatores de virulência e o desenvolvimento da doença (Nemecek *et. al.*, 2006).

Diversos trabalhos têm associado alteração morfológica ao perfil de virulência (Kurokawa *et al.*, 2005; Villar & Restrepo, 1989). A Cdc42p (ciclín-dependent kinases- proteína que controla a divisão celular, relacionada com formação de hifa) pertence à família da proteína ligante de GTP do tipo Rho, uma importante molécula de sinalização para o sistema biológico dos organismos, unicelulares e multicelulares (Etienne-Manneville, 2004), além de participar em diversas funções intracelulares, desde remodelagem do citoesqueleto até divisão celular. A mutação do gene codificante da CDC42 em *S. cerevisiae* resultou no fenótipo de múltiplos brotamentos com distúrbio

no controle do crescimento polarizado (Caviston et al., 2002; Richman et al., 2002, Richman & Johnson, 2000). Nos fungos dimórficos e nos fungos filamentosos a ausência do gene *cdc42* pode levar a disrupção da polaridade durante o crescimento e defeito durante a transição dimórfica (Boyce et al., 2001; Scheffer et al., 2005; Van den Berg et al., 2004; Zhengding et al., 2007). A proteína CDC42 tem sido implicada na patogenicidade de diversos fungos, quer pela regulação da transição dimórfica, quer pela manutenção de sinais intracelulares após o contato do patógeno com as células do hospedeiro ou simplesmente na reestruturação do citoesqueleto de actina durante o crescimento para facilitar a invasão (Price et al., 2008; Rolke & Tudzynski, 2008; Van den Berg et al., 2004; Zhengding et al., 2007). Para avaliar o envolvimento da molécula Cdc42p na virulência de *P. brasiliensis*, Almeida et al. (2009) utilizaram a técnica de RNA anti sense (aRNA) para silenciar a expressão do gene *PbCDC42* em células leveduriformes. Imagens por microscopia confocal mostraram que as células leveduriformes com a expressão do gene *cdc42* reprimida tiveram alteração na morfologia, com significativa diminuição no tamanho das “células mãe” e dos brotamentos. Além disso, foi avaliado o impacto dessa alteração morfológica na virulência em modelo animal de infecção e os resultados mostraram que a repressão do gene *cdc42* acarreta menor virulência e maior susceptibilidade à fagocitose. Finalmente, os resultados mostraram que a *Pbcdc42p* é uma molécula importante para o controle do crescimento de células leveduriformes e que a diminuição da expressão do gene *PbCDC42* também diminui o tamanho das células leveduriformes e aumenta a capacidade dessas células de serem fagocitadas, além de ativar a resposta do tipo Ta1 (linfócitos T auxiliar tipo 1), que é importante para controlar a infecção.

As vias de sinalização que controlam a transição morfológica em *P. brasiliensis* ainda são pouco conhecidas (Marques et al., 2004). A via de sinalização por meio do cAMP (adenosina monofosfato cíclico) parece ser importante, pois a adição exógena do composto inibe a transição de levedura para micélio, mantendo a forma patogênica do fungo (Brown, et al., 1999; Lengeler et al., 2000; Chen et al., 2007). A via sinalizadora da Ca^{2+} /Calmodulina também parece desempenhar papel na diferenciação celular de *P. brasiliensis*. Esta via está envolvida em vários aspectos no desenvolvimento fúngico, incluindo formação de conídios, extensão da hifa, dimorfismo e patogenicidade. A expressão da calmodulina e da subunidade regulatória da calcineurina mostraram-se aumentadas durante a transição dimórfica em *P. brasiliensis* (Nunes et al., 2005), sugerindo importante papel na via de transdução de sinal associada com a morfogênese. Drogas que bloqueiam as quinases dependentes de Ca^{2+} /Calmodulina inibem a diferenciação de micélio para levedura (de Carvalho et al., 2003). Entretanto, devido à complexidade da regulação da patogênese e do processo de diferenciação celular em *P. brasiliensis* estudos futuros para cada elemento da rede de sinalização celular são requeridos.

Vários outros estudos têm sido realizados visando avaliar o dimorfismo em *P. brasiliensis*. Alguns genes de *P. brasiliensis*, apresentam expressão diferencial durante a transição dimórfica do fungo. Os genes codificantes para a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) (Silva et al., 1999), proteína homóloga à flavodoxina *PbY20* (Cunha et al., 1999; Daher et al., 2005), proteína de choque térmico de 60 kDa (HSP60) (Izacc et al., 2001; Cunha et al., 2002), a chaperona ClpB (Jesuino et al., 2002), manosiltransferase (Costa et al., 2002), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

(Barbosa et al., 2004), HSP90 (Nicola et al., 2008) entre outros, apresentam baixos níveis de expressão na forma miceliana quando comparados com a forma leveduriforme, sugerindo que estas proteínas possivelmente seriam fatores na composição de estratégias moleculares que *P. brasiliensis* utiliza para morfo-adaptação e sobrevivência no hospedeiro.

Técnicas proteômicas têm sido utilizadas no estudo do dimorfismo em *P. brasiliensis*. Fonseca et al. (2001), por meio de técnicas de *immunoblotting* e sequenciamento de proteínas identificaram determinantes antigênicos de *P. brasiliensis*, utilizando combinações de soros de pacientes com diferentes manifestações clínicas da PCM. Os antígenos de *P. brasiliensis* caracterizados apresentaram homologia com as proteínas catalase P (61 kDa), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36 kDa), triose fosfato isomerase (29 kDa), malato desidrogenase (34 kDa) e frutose bifosfato aldolase (39 kDa). Estudos posteriores caracterizaram a função de algumas das proteínas citadas. O gene que codifica para a enzima da via glicolítica GAPDH foi caracterizado. A análise da expressão do gene e da proteína foi avaliada revelando que, em *P. brasiliensis*, há um aumento da expressão de GAPDH durante a diferenciação de micélio para levedura (Barbosa et al., 2004). Por meio de imunocitoquímica a proteína GAPDH foi localizada tanto no citoplasma quanto na parede celular de leveduras de *P. brasiliensis*. A proteína GAPDH se liga à componentes da matriz extracelular, o que sugere seu papel como uma adesina de *P. brasiliensis*. A proteína recombinante e o anticorpo anti-GAPDH inibem a adesão e internalização de *P. brasiliensis* a pneumócitos cultivados *in vitro*, o que reforça o papel da GAPDH como molécula de interação fungo-hospedeiro (Barbosa et al., 2006). O gene e o cDNA codificantes para TPI de *P. brasiliensis* foram caracterizados. A proteína, bem como o anticorpo policlonal produzido contra a proteína recombinante inibem a interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais (Pereira et al., 2004, 2007).

As catalases são descritas como importantes fatores que conferem resistência ao estresse oxidativo, uma propriedade importante que permite ao patógeno sobreviver aos efeitos da produção de espécies reativas de oxigênio dentro do hospedeiro (Giles et al., 2006). Com base nisso, Moreira et al. (2004) isolaram e expressaram o cDNA codificante para catalase peroxisomal de *P. brasiliensis* (*PbcatP*), descrita como fator de proteção contra estresse oxidativo. Os autores mostraram que a síntese da proteína e de seus transcritos é regulada durante o desenvolvimento do *P. brasiliensis*, aumentando durante a transição de micélio para a forma leveduriforme e em contato das células com H_2O_2 . Estudos posteriores foram realizados identificando três diferentes tipos de catalases de *P. brasiliensis*. Chagas et al. (2008) demonstraram que três membros da família das catalases (*PbCatA*, *PbCatP* e *PbCatC*) têm expressão diferencial durante a transição morfológica e em diferentes condições de estresse. A *PbCatA*, foi mais expressa na fase miceliana e a expressão parece estar associada ao estresse endógeno causado pela β -oxidação dos ácidos graxos (Chagas et al., 2008). A *PbCatP*, que pode preferencialmente proteger as células do fungo contra estresse exógeno (como H_2O_2), foi preferencialmente expressa na fase leveduriforme, como demonstrado por análises de *Western blotting* por Moreira et al. (2004). A *PbCatC* apresentou padrão constante de expressão, tendo moderada indução nas células expostas aos estresses térmico e osmótico. O estresse térmico não afetou as catalases A e P, o que sugere que a diferença na atividade de ambas as proteínas nas fases de micélio e levedura não é influenciada pela temperatura, mas sim, com alterações na

morfologia da célula, como descrito em *H. capsulatum* (Johnson et al., 2002). Os resultados apontam a importância de se caracterizar e estudar as funções biológicas das catalases dos fungos patogênicos visto que são importantes na resposta ao estresse (Chagas et al., 2008).

1.6.1. – Análises Transcricionais no estudo do dimorfismo em *P. brasiliensis*

Com o intuito de identificar genes e proteínas relacionados com o dimorfismo de *P. brasiliensis* análises transcricionais foram realizadas. Um consórcio de laboratórios da região Centro – Oeste do Brasil (Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *Paracoccidioides brasiliensis*) sequenciaram 25.511 ESTs obtidas de bibliotecas de cDNA de levedura e micélio, resultando em 6022 ESTs. Tal estratégia possibilitou a detecção de genes diferencialmente expressos nas duas fases de *P. brasiliensis*. Além disso, nesse transcriptoma identificou-se 48 transcritos codificantes para proteínas de resposta a estresse (HSP), sendo que o número destes transcritos foi 38% maior na biblioteca de levedura do que na biblioteca de micélio. Estas proteínas estão envolvidas em processos como transição dimórfica e imunopatogenicidade de organismos patógenos. Este fato é compatível com a maior temperatura (36°C) de crescimento de células leveduriformes em relação ao micélio (23°C). Além disso, foram identificados na fase leveduriforme, genes considerados como prováveis fatores de virulência e potenciais alvos para antifúngicos, não possuindo nenhum homólogo no genoma humano, como: quitina desacetilase, isocitrato liase e α -1,3-glicana sintase. Estudos comparativos entre micélio e levedura identificaram um perfil metabólico diferencial exibido nas fases de *P. brasiliensis*. Os autores descreveram que o micélio apresenta metabolismo preferencialmente aeróbio uma vez que durante a fase saprobiótica genes que codificam enzimas que participam da fosforilação oxidativa e do ciclo do ácido cítrico (isocitrato desidrogenase e succinil coenzima-A sintase) estão altamente expressos, ao contrário da fase leveduriforme, que apresenta metabolismo preferencialmente anaeróbio. Nesta fase, os altos níveis de expressão da enzima álcool desidrogenase I favorecem a fermentação alcoólica e consequente produção de etanol (Felipe et al., 2005).

Outro projeto transcriptoma de *P. brasiliensis* foi desenvolvido por grupos do Estado de São Paulo. Por meio da análise de ESTs, Goldman et al. (2003) identificaram vários genes potenciais de virulência em *P. brasiliensis* homólogos à *C. albicans*, que possivelmente atuam na sobrevivência do fungo no ambiente do hospedeiro. Os autores sugerem que os mecanismos para patogenicidade e virulência são conservados entre as espécies analisadas. A identificação de alguns genes de *P. brasiliensis* homólogos às vias de transdução de sinal, como CST20 (quinase relacionada com formação de hifa), CPP1 (fosfatase relacionada com formação de hifa), CEK1 (MAPK relacionada com a formação de hifa), PKA (Proteína quinase A), CDC42 (proteína que controla a divisão celular, relacionada com formação de hifa) e GEF (proteína do tipo Ras, relacionada com formação de hifa), sugere que essas vias possam estar operando em *P. brasiliensis*, provavelmente controlando a mudança morfológica. Outros genes, tais como ubiquitina e chaperonas de choque térmico (HSP70, HSP82 e HSP104) apresentaram níveis de expressão aumentados na transição dimórfica de micélio para levedura e na fase leveduriforme. O aumento da expressão destes transcritos durante a

transição dimórfica sugere que há um maior controle da qualidade das proteínas produzidas nesta etapa, tanto no enovelamento, realizado pelas chaperonas, quanto na degradação de proteínas mal-enoveladas, realizada pela ubiquitina.

Com o intuito de detectar genes preferencialmente expressos na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (isolado *Pb18*), Marques et al. (2004) utilizaram as tecnologias de microarranjos e bibliotecas subtraídas (SSH - suppression subtraction hybridization) nas fases micélio e de levedura. Dentre os genes identificados como diferencialmente expressos estão α -1,3-glicana sintase, envolvida no metabolismo de parede celular. A mudança morfológica do *P. brasiliensis* é acompanhada por alterações na composição da parede celular onde, monômeros de glicana passam de β -1,3-glicana para α -1,3-glicana, assim que o fungo adota a forma leveduriforme (San-Blas & Niño-Vega, 2001). De maneira complementar observou-se uma expressão muito maior do gene que codifica a α -1,3- glicana sintase na fase de levedura do que na fase de micélio (Marques et al., 2004). De forma interessante também foi observado níveis aumentados de expressão do gene *ERG25* na fase de levedura de *P. brasiliensis*. O gene *ERG25* codifica uma C-4- esterol metil oxidase que participa do primeiro passo enzimático da síntese de ergosterol em fungos. É provável que o aumento na expressão de *ERG25* esteja correlacionado ao aumento da sua reutilização de lipídios na síntese da membrana celular. Sugere-se que mudanças na membrana são importantes fatores na transição morfológica a 36°C (Goldman et al., 2003) e a alta reutilização de lipídios na membrana celular também pode contribuir para isso.

A análise do transcriptoma de *P. brasiliensis* durante a transição dimórfica foi objeto de estudo de vários pesquisadores (Nunes et al. 2005, Bastos et al. 2007). Nunes et al. (2005) monitoraram a expressão gênica por meio de microarranjos de DNA durante a transição morfológica de micélio para levedura nos tempos de 0, 5, 10, 24, 48, 72 e 120 h de crescimento, após a alteração da temperatura. Nesse estudo foram identificados vários genes diferencialmente expressos durante a transição morfológica. Genes relacionados com metabolismo de aminoácidos, transdução de sinal, síntese de proteínas, metabolismo da parede celular, estrutura do genoma, resposta ao estresse oxidativo, controle do crescimento e desenvolvimento do fungo *P. brasiliensis* mostraram-se alterados. Um gene, codificando para a enzima 4-hidro-fenil piruvato desidrogenase (4-HPPB) foi altamente expresso durante a diferenciação de micélio para a forma leveduriforme, tendo sido sugerido como um novo alvo para antifúngicos.

O perfil transcricional de *P. brasiliensis* durante a diferenciação morfológica de micélio para levedura foi avaliado por Bastos et. al. (2007). Vários transcritos potencialmente relacionados com a síntese de membrana e parede celulares mostraram-se aumentados durante a diferenciação celular de micélio para a forma leveduriforme após 22 h de indução da transição, sugerindo que *P. brasiliensis* favorece o remodelamento da membrana e de parede celulares nos estágios iniciais da morfogênese. Um novo transcrito que codifica para alfa-glicosidase, possivelmente relacionado ao processamento de β -1,6 glicana também foi identificado durante a transição dimórfica de micélio para levedura. Genes codificantes para quitinase 1 (CTS1) e 3 (CTS3) foram induzidos sugerindo que o processamento de quitina, o maior componente da parede celular, é importante para a transição dimórfica em *P. brasiliensis*. Um transcrito que codifica para aminoácido permease, relacionada à

captação de glutamato e precursor para a síntese de quitina também foi induzido durante a diferenciação de micélio para levedura (Bastos et al., 2007). Durante a transição também foi verificada a presença de enzimas que participam do ciclo do glioxalato, como a isocitrato liase, malato desidrogenase, citrato sintase e aconitase, indicando que esta via é funcional durante esse processo. Também foram identificados genes envolvidos em vias de transdução de sinais tais como MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), serina/treonina quinase e histidina quinase, sugerindo que a transição morfológica em *P. brasiliensis* é mediada por vias de transdução de sinais que controlam a adaptação ao ambiente para a sobrevivência do fungo dentro do hospedeiro (Bastos et al., 2007).

1.7 – Proteômica

A explosão do sequenciamento dos genomas de um grande número de organismos patogênicos e o rápido avanço em técnicas para a caracterização de proteínas são fatores que vêm contribuindo para um rápido desenvolvimento de um novo campo de pesquisa da era pós-genômica – a análise de proteoma. O termo proteoma foi utilizado pela primeira vez em 1995 por Wilkins e Williams, para descrever o conjunto de proteínas expressas por um genoma. Atualmente, o termo proteômica tem sido definido como a análise em grande escala de proteínas expressas por uma determinada célula, tecido ou organismo numa condição específica (Wilkins et al., 1995). O objetivo da análise proteômica não é apenas identificar todas as proteínas na célula mas também criar um mapa tridimensional da célula indicando onde as proteínas estão localizadas e o ambiente no qual a célula é estudada. Em resposta a estímulos ambientais, internos ou externos, as proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais. O padrão de expressão das proteínas é variável - enquanto o genoma é uma característica relativamente fixa de um organismo o proteoma muda continuamente, conforme o estágio de desenvolvimento, tecido, condições ambientais, variações na expressão gênica, “splicing” de RNA e modificações pós-traducionais.

Diversos métodos têm sido utilizados para análises da expressão de RNAm, como SAGE (análise serial da expressão gênica) (Velculescu et al., 1995) e a tecnologia de microarranjos de DNA (Schena et al., 1995 & Shalon et al., 1996). Entretanto, a análise de RNAm não reflete diretamente o conteúdo de proteínas na célula (Graves & Haystead, 2002) e, além disso, alguns estudos têm mostrado a pequena relação entre os níveis de RNAm e de proteína (Abbott, 1999; Anderson, 1997; Gygi, 1999; Ideker, 2001). Em adição, a função das proteínas pode ser modificada a nível pós-traducional e esta informação não é acessível nas análises transcricionais (Gygi et al., 1999).

A análise proteômica ganhou considerável atenção desde que foi revelado que o genoma humano consiste de poucos genes (cerca de 35.000) (Venter, 2001). O perfil de expressão das proteínas altera-se em situações distintas ou diferentes tipos celulares em um mesmo organismo, constituindo-se um fluxo dinâmico respondendo a estímulos internos e externos. As proteínas envolvidas nos processos biológicos são detectadas devido a alterações quantitativas – pouco ou muito reguladas, aparecimento ou desaparecimento e modificações pós-traducionais (Westermeier et al., 2002).

Em fungos patogênicos humanos a proteômica têm contribuído para um melhor conhecimento dos processos envolvidos na morfogênese, virulência, resposta ao hospedeiro, bem

como para o desenvolvimento de alvos antifúngicos potenciais e abordagens terapêuticas (Pitarch *et al.*, 2003). Marcadores biológicos de um determinado patógeno podem ser identificados e caracterizados por técnicas proteômicas, ajudando no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento do tratamento (Cash *et al.*, 2002).

1.8 – Tecnologia Proteômica

Uma parte do desenvolvimento da proteômica deve-se aos avanços na tecnologia de investigação de estudo de proteínas. Para se obter o perfil de expressão de um proteoma sob várias condições a eletroforese 2-DE tem sido a principal ferramenta de escolha (Bhadoria *et al.*, 2007). O primeiro requisito para análise proteômica é a separação de misturas complexas contendo milhares de proteínas. Desde que foi introduzida há 34 anos por O'Farrell (1975), a eletroforese bidimensional de proteínas (2-DE) ainda é a maneira mais efetiva de resolver misturas complexas de proteínas num curto período de tempo (Dunn *et al.*, 2001). Nesse método, as proteínas são primeiramente separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) e, então, numa segunda dimensão, em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com a sua massa molecular (MM) (O'Farrell, 1975). Entretanto, o uso desse método tem sido o principal problema encontrado nos laboratórios devido a baixa reprodutibilidade dos géis utilizando-se anfólitos carreadores (CA). Hoje, esse problema de instabilidade e de reprodutibilidade foi minimizado pela introdução dos gradientes de pH imobilizado (IPG) na focalização isoelétrica (IEF) (Bjellqvist *et al.*, 1982). Nas tiras IPGs, os componentes dos tampões (immobilines) para o gradiente de pH estão covalentemente incorporados dentro da matriz do gel. O resultado é um aumento da reprodutibilidade dos géis bidimensionais (2D), melhor resolução e melhor separação de proteínas ácidas e/ou básicas (Görg *et al.*, 2000). Outra melhoria foi o desenvolvimento de IPGs de intervalo estreito em combinação com o pré-fracionamento da amostra, que tem aumentado a detecção de proteínas pouco abundantes e de proteínas muito alcalinas (Görg *et al.*, 2004).

Outra técnica utilizada na análise proteômica é a espectrometria de massa (MS). A MS tem o potencial para resolver problemas estruturais não facilmente identificados por técnicas de química de proteínas e é uma ferramenta indispensável para analisar a estrutura primária de proteínas e de peptídeos. A MS é uma técnica analítica que mede a massa molecular de moléculas baseadas no movimento de partículas carregadas num campo eletromagnético. Existem vários tipos de equipamentos de espectrometria de massa que são utilizados na pesquisa proteômica, dos quais fazem parte três componentes principais (Figura 2): uma fonte de íons (responsável pela introdução de cargas e vaporização da amostra), um analisador de massas (determina a relação massa-carga do analito) e um detector (detecta a presença do analito). Uma vez que as moléculas atingem a fonte de íons, os componentes da amostra são convertidos em íons e acelerados dentro do analisador de massas e separados de acordo com sua relação massa-carga (m/z). O detector converte a energia dos íons em sinais elétricos, que são transmitidos e analisados por computador.

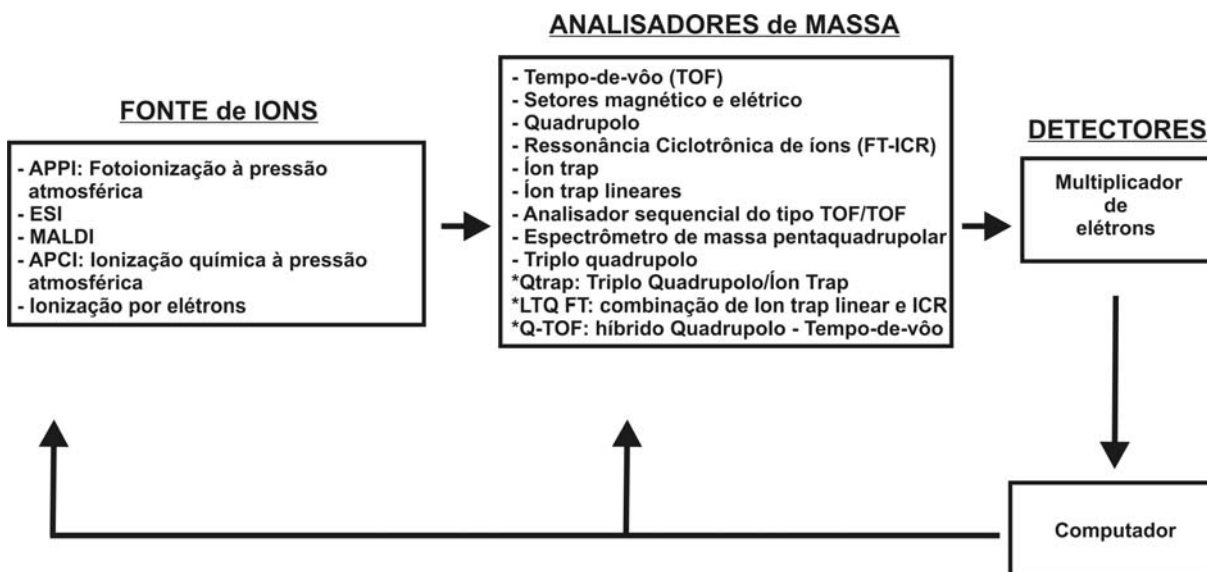


Figura 2 – Componentes básicos do espectrômetro de massa (* equipamentos híbridos)

Diversas técnicas de ionização têm sido desenvolvidas e durante muito tempo a MS era aplicada apenas para a determinação de estruturas químicas de moléculas pequenas e voláteis. Com o desenvolvimento da técnica de ionização por dessorção de plasma, por Macfarlane & Torgerson (1976), foi possível ionizar biomoléculas maiores. Foi em 1988 que Karas e Hillenkamp introduziram a ionização por dessorção a laser auxiliado por uma matriz (MALDI), uma técnica que ioniza biomoléculas com muita sensibilidade utilizando a energia do laser para desorver e ionizar moléculas na presença de uma matriz que absorve luz (Karas & Hillenkamp, 1988). A partir de então, a espectrometria de massa aplicada a biomoléculas, como proteínas, avançou e foi possível a aplicação dessa técnica no estudo de proteínas, como a determinação de massa molecular, quantificação de cisteínas, determinação de ligações dissulfeto, determinação de modificações pós-traducionais tais como glicosilação e fosforilação, determinação da sequência de aminoácidos e, principalmente, a identificação de proteínas (Larsen & Roepstorff, 2000).

Os espectrômetros de massa são classificados em diferentes tipos, dependendo da fonte de ionização e do analisador de massas. Na técnica de ionização tipo MALDI os íons são formados ao se misturar a amostra com a matriz, que contém uma molécula orgânica capaz de absorver luz. A amostra torna-se incorporada dentro do cristal da matriz e então é irradiada com laser absorvendo fótons e tornando-se eletronicamente excitada. O excesso de energia é transferido para amostra e os íons são desprendidos em fase gasosa e acelerados dentro do MS. Na ionização tipo eletropulverização (ESI) a amostra em uma solução acidificada é pulverizada na forma de gotículas altamente carregadas na presença de um campo elétrico forte. Uma corrente de gás (spray) é aplicada às gotículas que, com a evaporação do solvente, decrescem de volume ocasionando a repulsão mútua entre as cargas e a liberação dos íons na fase gasosa em direção do analisador de massas (Siuzdak, 2006). A técnica de ESI consiste em dois processos básicos: (1) geração de uma nuvem fina de gotículas carregadas de uma solução contendo a amostra; (2) evaporação do solvente, resultando em íons (positivo ou negativo) da amostra. Se a amostra em questão tiver vários sítios capazes de carregar cargas, poderá ocorrer a formação de íons de múltiplas cargas.

Os analisadores de massas, como o próprio nome indica, têm como função básica separar os íons formados de acordo com suas relações m/z . Diversos tipos de analisadores de massa acompanham os sistemas de ionização, sendo que os mais comuns são: analisador tipo quadrupolo (Q), armadilha iônica (Ion trap), tempo-de-vôo (time-of-flight - TOF), setores magnético e elétrico. Geralmente, diferentes tipos de analisadores de massa são capazes de combinar-se aos diferentes tipos de ionizadores, permitindo a construção de equipamentos de alto desempenho. Por exemplo, o tempo de vôo, geralmente é associado à ionização tipo MALDI, enquanto que a eletropulverização (ESI) geralmente é associada com analisadores tipo quadrupolo, Ion trap ou híbridos (Q-TOF). Uma vez que os íons são separados, eles são detectados por eletromultiplicadores que constituem os detectores mais largamente usados.

Medzihradzsky et al. (2000) desenvolveram os analisadores TOF/TOF acoplados a uma fonte de íons tipo MALDI, onde os analisadores do tipo TOF foram colocados em série podendo ser operados tanto no modo MS quanto MS/MS, sendo o funcionamento do aparelho similar em geometria aos MALDI-TOF refletido dos tradicionais. Basicamente os analisadores TOF são separados por célula de colisão, com o primeiro analisador TOF usado para selecionar o íon precursor. A alta energia de colisão ocorre dentro da célula de colisão e o segundo analisador TOF resolve os íons. A configuração permite alta sensibilidade e alta resolução em ambos os modos, MS e MS/MS.

Com o objetivo de aumentar a resolução dos equipamentos de espectrometria de massas, no final da década de 70 teve início o desenvolvimento de equipamentos híbridos, visando combinar as diferentes características dos analisadores de massa em um único espectrômetro de massa. Após várias tentativas, o Laboratório Nacional de Oak Ridge (USA) desenvolveu o analisador híbrido combinando um quadrupolo (Q) com um analisador TOF (Q-TOF), (Glish et al, 1984), aproveitando a qualidade das análises MS/MS oferecidas por um quadrupolo com a velocidade e sensibilidade de um tempo de vôo. Na década de 1990, o desenvolvimento das técnicas de ionização aplicadas à bioquímica (MALDI e ESI) avançou e funcionou como uma alavanca para o desenvolvimento dos equipamentos Q-TOF. Em 1996, surge um novo equipamento com o analisador TOF alinhado em posição ortogonal aos quadrupolos (Dawson & Guilhaus, et al, 1984). Uma das grandes melhorias foi o acoplamento do TOF às fontes contínuas de ionização bem como a utilização do chamado espelho eletrostático (ou refletor eletrostático) (Mamyrin & Shikk, et al, 1979) que normalizam as diferenças de energia cinética que, porventura ocorreriam durante a geração de íons, aumentando a resolução do equipamento.

No analisador de massas tipo Q-TOF com aceleração ortogonal, um quadrupolo adicional, chamado de q_0 (*RF Lens*) está localizado antes do Q1 e opera no modo rf (*rádio frequência*), expandindo os íons que passam pelo quadrupolo e diminuindo as colisões, o que melhora a qualidade do feixe de íons. O Q1 funciona como um filtro de íons nos experimentos de MS/MS. Na parte q_2 do analisador (*Hexapole Transfer Lens*) o íon precursor (previamente selecionado pelo Q1) é acumulado e submetido à fragmentação dentro da célula de colisão por um gás inerte num processo denominado de dissociação induzida por colisão ("Collision-Induced Dissociation, CID") (Steen & Mann, 2004), proporcionando, assim, a colisão entre os peptídeos ionizados e as moléculas do gás

inerte, gerando produtos de íons. Como resultado, a energia transferida em cada colisão é convertida em energia interna induzindo a transferência intramolecular dos prótons em cada peptídeo, culminando na desestabilização das ligações do esqueleto polipeptídico e, por consequência, induzindo a formação de dois íons-fragmentos (Mann, 1989). Por fim, os íons produzidos na célula de colisão são direcionados para o analisador TOF onde serão separados pela relação m/z de acordo com seus tempos de voo (El Aneed et al, 2009). A configuração desse equipamento proporciona alta sensibilidade, alta taxa de aquisição de espectros em ambos os modos, MS e MS/MS, e um elevado poder de resolução e exatidão de massa.

No espectro de massas obtido sob baixa energia de colisão, de modo geral, apresenta cerca de seis séries de íons comumente são ionizados. As séries a,b,c ocorrem quando a carga permanece na porção amino-terminal da molécula e x,y,z quando a carga permanece na porção carboxi-terminal, segundo a nomenclatura proposta por Roepstorff & Fohlman em 1984 (Figura 3). É importante enfatizar que os pares de íons a/x , b/y e c/z serão sempre íons correspondentes aos fragmentos opostos e complementares entre si. Considerando-se que as ligações peptídicas são aquelas menos energéticas, espera-se que a formação do par de fragmentos $-b/-y$ seja mais frequente que os demais pares de fragmentos (Cantú et al., 2008). Em altas energias de colisão ocorrem a séries d,v,w, que correspondem às fragmentações de cadeias laterais dos aminoácidos (Johnson et al., 1988).

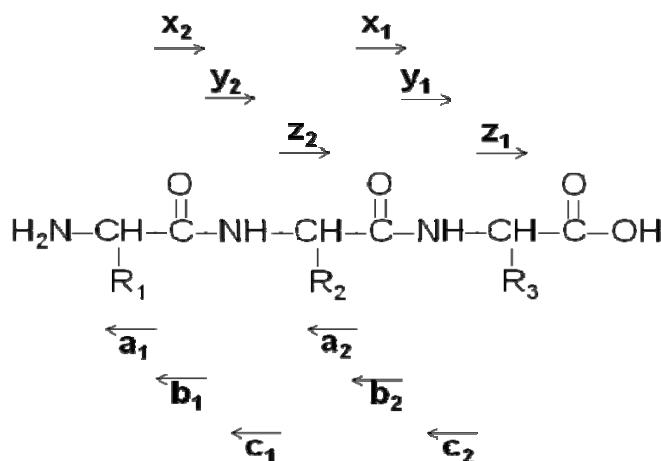


Figura 3 – Nomenclatura da fragmentação descrita por Roepstorff & Fohlman (1984). Apenas os íons observados sob baixa energia CID são incluídos.

Cada peptídeo fragmentado gera picos subsequentes que diferem na massa de um resíduo de aminoácido do pico seguinte da mesma série (Steen & Mann, 2004). Ou seja, podemos determinar a sequência de aminoácidos considerando a diferença de massa existente entre picos vizinhos sendo estes da mesma série. A dificuldade é que a informação em espectros de MS/MS geralmente não é completa e os picos interferentes que podem ou não pertencer às séries, podem confundir a análise. O sucesso da identificação depende da qualidade dos dados em termos de acurácia e resolução de instrumento e também do conteúdo de informação encontrado no espectro.

As principais aplicações da MS na pesquisa proteômica são catalogar a expressão de proteínas, definir interações e identificar sítios de modificações em proteínas (Han et al., 2008). Entretanto, o desenvolvimento de diversos programas de software e a contínua atualização no número de sequências depositadas em bancos de dados tem sido crucial para o sucesso da MS.

Uma das maneiras de identificar as proteínas por MS é por meio da impressão digital do mapa peptídico (peptide mass fingerprinting - PMF), uma técnica descrita em 1993 (Mann et al., 1993). As proteínas são digeridas com uma endoprotease específica, normalmente tripsina, e os peptídeos resultantes da espectrometria de massa são analisados por determinação das suas massas moleculares. O espectrômetro de massas utilizado para realizar o PMF normalmente é do tipo MALDI-TOF (Thiede et al., 2005). Cada proteína no banco de dados é digerida teoricamente (*in silico*) com a mesma enzima utilizada na etapa de digestão, produzindo milhares de peptídeos teóricos. A massa experimental dos peptídeos derivadas do MS (PMF) é então comparada com as massas dos peptídeos teóricos e um valor de significância (*score*) é calculado e determinado. O *score* reflete a concordância (*match*) entre a massa experimental e a massa teórica. A probabilidade de o valor de *m/z* de um fragmento teoricamente obtido coincidir, de maneira randômica, com o valor de *m/z* de um fragmento obtido experimentalmente é calculada e expressa como sendo o negativo do logaritmo desse número (*score*). Assim, quanto maior for o valor obtido, menor é a probabilidade de que este resultado seja fruto de uma “coincidência. A cada busca realizada o software fornece um valor limite, que indica que o resultado obtido possui probabilidade inferior a 5% de ser um evento randômico (Cantú et al., 2008). A proteína identificada como a mais provável é a que tem o melhor *match* entre os peptídeos experimental e o teórico. O número de peptídeos observado no PMF e a exatidão para o qual eles são medidos determinam a confiança na identificação da proteína. Um programa muito utilizado para fazer esse tipo de busca é o MASCOT (www.matrixscience.com), que correlaciona o espectro de massas de fragmentação de peptídeos com sequências de aminoácidos de proteínas registradas em bancos de dados. Essa técnica mostrou-se capaz de identificar proteínas oriundas de géis 2-DE em baixas concentrações, na ordem de picomoles (10^{-18} M), tornando-se extremamente útil na identificação de proteínas. Schevchenko et al., (1996) demonstraram que até 90% das proteínas provenientes de gel 2-DE de lisado de *E. coli* foram identificadas por PMF.

Outra ferramenta importante na pesquisa proteômica é o banco de dados. Dayhoff et al. (1960), construíram a primeira base de dados moleculares para conter todas as sequências de proteínas conhecidas até essa data. O advento do sequenciamento de DNA em grande escala em 1990 levou à construção de banco de dados capazes de abrigar o grande número de sequências obtidas. O NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foi criado em 1988 para abrigar esse tipo de informação. Uma colaboração entre os bancos NCBI, EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) e o DDJB (*DNA Data Bank of Japan*) foi criado para montar um banco de dados de sequências de nucleotídeos - A INSDC (*International Nucleotide Sequence Database Collaboration*) (Miyazaki et al., 2003). Dois tipos de banco de dados são disponíveis para pesquisa de genes e proteínas. O GenBank (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e o EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), também chamados de banco de dados primário ou banco de dados redundantes (Stoesser et al., 2002). O segundo tipo de banco de dados é também chamado de banco de dados secundários ou curados, como o SWISS-PROT (<http://www.expasy.ch/sprot/>) e o TrEMBL (<http://www.ebi.ac.uk/uniprot>) (Apweiler et al., 2004).

1.9 – Análise Proteômica de Fungos Patogênicos Humanos

Embora existam diversos genomas de fungos sequenciados, poucos estudos têm sido feitos comparando o perfil proteômico com análises transcricionais. No momento, o grande objetivo na biologia dos fungos é entender a expressão, função e regulação das proteínas codificadas pelo genoma do fungo (Bhadauria et al., 2007). Os primeiros trabalhos pós-genômicos foram com estudos de proteína do envelope em *Trichoderma reesei* (Lim et al., 2001) e de proteínas ancoradas à GPI (glicosilfosfatidilinositol) em *Aspergillus fumigatus* (Bruneau et al., 2001). Desde então, diversos trabalhos em proteomas têm sido publicados. Melin et al. (2002) realizaram o primeiro trabalho de análise proteômica com o fungo patogênico *Aspergillus nidulans*. Num trabalho mais recente com *A. fumigatus*, Strom, et al. (2005) detectaram alterações específicas na expressão de proteínas envolvidas com mudanças morfológicas causadas quando o fungo foi cultivado com uma bactéria produtora de ácido láctico. Num trabalho posterior realizado também em *A. fumigatus*, Kniemeyer et al. (2006) identificaram que 52 proteínas da gliconeogênese, ciclo do glioxalato e enzimas de degradação do etanol estavam hiper-reguladas durante a repressão catabólica por carbono. Carberry et al. (2006) acrescentaram mais 28 proteínas ao mapa proteômico de *A. fumigatus* mostrando pela primeira vez que o fator de alongação 1B (f1B) exibe atividade de glutatona transferase. Essas descrições ilustram que a análise proteômica abre novas perspectivas para se entender a fisiologia dos fungos, como observado com o fungo *A. nidulans* durante a osmoadação. Nesse trabalho, os autores mostraram que enzimas direcionadas ao ciclo do ácido tricarbóxico estão reduzidas. Além disso, observaram um aumento no acúmulo de proteínas de choque térmico (Kim et al., 2007). Análises proteômica da adaptação do fungo *A. fumigatus* a altas temperaturas revelaram novos alvos da regulação pelo fator transcricional de choque térmico-1 (HSF-1), como síntese de manitol, tradução, organização do citoesqueleto e divisão celular (Albrecht et al., 2010). Para elucidar as proteínas do fungo *A. fumigatus* que são mais expressas durante a aspergilose invasiva Asif et al. (2010) utilizaram extratos de proteínas do fungo e inocularam os animais em duas doses com extratos de proteínas de conídios do fungo *Aspergillus fumigatus*. O soro foi então utilizado como anticorpo primário para identificar antígenos de *A. fumigatus* separados por eletroforese bidimensional. As análises levaram à identificação de proteínas relacionadas à via glicolítica, ao estresse oxidativo bem como proteínas associadas à parede celular, representando valiosos marcadores da infecção bem como possíveis componentes da vacina contra a aspergilose.

Os estudos proteômicos de fungos patogênicos dimórficos vêm crescendo gradativamente, acompanhando o desenvolvimento dos bancos de dados. Orsborn et al. (2006) utilizaram a técnica 2D-DIGE (Eletroforese de fluorescência diferencial em gel 2D) acoplada à cromatografia líquida de alta resolução e ao espectrômetro de massas (HPLC-MS/MS) para analisar o perfil de expressão diferencial de *Coccidioides posadasii* nas formas micélio e levedura. Essa técnica levou a identificação da proteína da matriz peroxissomal (Pmp1) a qual, em estudos em modelo de infecção animal, conferiu proteção a animais contra a coccidioidomicose. Técnicas similares foram utilizadas para o fungo *Penicillium marneffeii* nas formas micélio e levedura (Xi et al., 2007) com o objetivo de entender a transição dimórfica. As análises resultaram na identificação de 26 proteínas que foram diferencialmente expressas entre elas a Hsp90, proteína ligante da Hsp90, Hsp70 mitocondrial,

citocromo P-450 que foram mais expressas na forma de levedura; enquanto que poli (A) polimerase e SNF22 encontraram diminuídas. Os resultados demonstram um aumento de mais de 14 vezes no nível do acúmulo da proteína catalase-peroxidase, quando comparados a fase leveduriforme com a fase miceliana. Esse resultado é de grande interesse, visto que o fungo *P. marneffe* sobrevive dentro do macrófago. Outra proteína significativamente alterada é a isocitrato liase, uma enzima “chave” na via glicoxalato. Em patógenos que parasitam macrófagos, como *Mycobacterium tuberculosis* e *C. albicans* essa via é necessária para a patogenicidade (de Voss et al., 2000; Lorenz & Fink, 2001; McKinney et al., 2000).

A formação do biofilme é um dos maiores fatores de virulência de *Candida glabrata*, contribuindo para sua resistência a antifúngicos (Tumbarello et. al., 2007). Análise proteômica do fungo *C. glabrata* crescido sob a forma de biofilme e comparado com a forma planctônica foram realizados para explorar os mecanismos que contribuem para a virulência desse organismo (Seneviratne et. al., 2010). As análises mostraram um aumento de proteínas relacionadas ao estresse e uma diminuição das enzimas da via glicolítica. Alterações na expressão das proteínas citoplasmáticas de *C. albicans* durante a transição dimórfica de levedura para hifa têm sido estudadas. Utilizando-se a técnica 2D-DIGE Monteoliva et al. (2010) detectaram proteínas citoplasmáticas de diferentes vias metabólicas envolvidas no estabelecimento e na manutenção de cada morfologia celular.

Teutschbein et al. (2010) utilizaram o gel 2-DE para comparar o perfil de proteínas intracelulares entre conídios e micélio. Entre as 57 proteínas que foram mais expressas em conídio incluem as enzimas envolvidas na eliminação de intermediários reativos de oxigênio (ROI), biosíntese de pigmentos e hidrofobina RodA. As enzimas piruvato decarboxilase e álcool desidrogenase mostraram-se mais reguladas em conídios em repouso quando comparadas com micélio.

A utilização de ferro é essencial para o estabelecimento da infecção em microorganismos e, sugere-se que, o sequestro desse metal seja uma estratégia usada pelo hospedeiro para combater a infecção. Numa análise proteômica em condições de depleção de ferro no fungo *H. capsulatum*, Winters et al. (2008) detectaram 35 proteínas que tiveram seus níveis diminuídos, dentre elas enolase, malato desidrogenase, sacaropina desidrogenase, HSP70, asparaginil-tRNA sintetase e uma proteína não caracterizada. Esses resultados sugerem uma necessidade do *H. capsulatum* por induzir funções metabólicas específicas para competir com alterações no ambiente do hospedeiro. A análise proteômica das proteínas citoplasmáticas de *P. brasiliensis* sob restrição do íon ferro foi avaliado por Parente et al. (2011). Enzimas da via glicolítica foram induzidas enquanto que várias enzimas do ciclo do ácido tricarbóxico, ciclo do metilcitrato e glicoxalato e proteínas da cadeia transportadora de elétrons mostraram-se reprimidas. Em adição, os resultados mostraram também que proteínas de resposta ao choque térmico (HSPs) foram induzidas.

Nesse trabalho, utilizamos a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) acoplado à identificação por espectrometria de massa MALDI-QTOF MS e MS/MS como ferramentas proteômicas para investigar o perfil de proteínas de *P. brasiliensis* durante a morfogênese de micélio para células leveduriformes 22 h após a transição.

Justificativas 2

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende com a vida e com os humildes”

Cora Coralina

II – JUSTIFICATIVAS

P. brasiliensis é um fungo termodimórfico que sofre mudanças em sua morfologia sob influência da temperatura, apresentando-se na forma miceliana a temperatura de 22 - 26 °C e na forma leveduriforme a 36 ° C. Essa característica favorece a instalação do fungo no hospedeiro. Sendo assim, a patogenicidade está intimamente relacionada à diferenciação celular, visto que isolados de *P. brasiliensis* que não são capazes de se diferenciar na forma leveduriforme não são virulentos (Franco, 1987; San-Blas & Niño-Veja, 2001; Nemecek et al., 2006).

Diversos estudos transcricionais foram realizados com o objetivo de identificar genes e proteínas relacionados com o dimorfismo de *P. brasiliensis*. Embora esses estudos proporcionaram uma base para entender o dimorfismo, o nosso conhecimento dos mecanismos moleculares que direcionam a morfogênese do *P. brasiliensis* ainda permanecem obscuros.

Em fungos patogênicos humanos as análises proteômicas têm contribuído para um melhor conhecimento dos processos envolvidos na morfogênese, virulência, resposta ao hospedeiro, bem como para o desenvolvimento de alvos antifúngicos potenciais e abordagens terapêuticas. Com esse objetivo, utilizamos a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) acoplado à identificação por espectrometria de massa. Essa técnica vem complementar as estratégias e metodologias já utilizadas com o intuito de entender melhor os mecanismos moleculares da regulação da expressão gênica/proteínas durante a transição morfológica, bem como decifrar os possíveis fatores de virulência do fungo e tentar descobrir possíveis moléculas alvos de drogas.

Objetivos 3

“A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio”

Martin Luther King

III – OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do projeto é realizar estudos proteômicos visando detectar e avaliar diferenças qualitativas e quantitativas nas proteínas de *P. brasiliensis* nas fases micélio e levedura e durante a transição de micélio para levedura após 22 h de mudança da temperatura de 22 °C para 36 °C.

III.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

As estratégias utilizadas foram:

- Padronização de mapas eletroforéticos bidimensionais de proteínas totais hidrossolúveis nas formas miceliana e leveduriforme de *P. brasiliensis* (Pb01).
- Realização de análises computacionais dos mapas bidimensionais de proteínas capturadas em sistema de fotodocumentação e processá-las, detectando o número de *spots* de proteínas, a massa molecular e ponto isoelétrico em cada estágio morfológico do fungo *P. brasiliensis* (Pb01).
- Realização de análises estatísticas para obter os *spots* das proteínas de *P. brasiliensis* que são diferencialmente expressas em cada estágio morfológico do fungo *P. brasiliensis* (Pb01).
- Retirada dos *spots* proteômicos de interesse dos géis bidimensionais e realizar digestão com tripsina para, posteriormente, obter os espectros de massas.
- Comparação dos dados dos mapas peptídicos com proteínas candidatas em bancos de dados.
- Correlação entre os níveis de expressão proteica com as características biológicas de cada estágio de vida do fungo;
- Análises por *Western blotting*;
- Correlação dos dados proteômicos com os níveis de transcritos cognatos utilizando-se qRT-PCR nas condições micélio, transição micélio-levedura (22 h) e levedura, bem como conídio e transição de conídio-levedura (22 h).
- Estudo das alterações metabólicas de *P. brasiliensis* nas fases micélio e levedura e durante a transição micélio-levedura.

Material e Métodos 4

“A imaginação é mais importante que o conhecimento”

Albert Einstein

IV – MATERIAL e MÉTODOS

4.1 – Isolado, Condições de Cultivo e Diferenciação do Fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

P. brasiliensis, Pb01 (ATCC, MYA-826) foi utilizado em todos os experimentos citados nesse estudo. A fase saprofítica (micélio) do fungo foi crescida em meio Fava-Netto semi-sólido, contendo [1% (w/v) peptona, 0,5% (p/v) extrato de levedura, 0,3% (p/v) proteose peptona, 0,5% (p/v) extrato de carne, 0,5% (p/v), NaCl, 4% (p/v) glicose, 1,2% (p/v) agar, pH 7,2] à 22 °C. O mesmo meio foi utilizado para o cultivo da fase leveduriforme a 36 °C. A diferenciação micélio para levedura foi realizada no mesmo meio acima, sem adição de agar. O fungo foi incubado a 22 °C por 18 h, após o que a temperatura foi alterada para 36 °C, como descrito (Bastos et al., 2007). Todas as etapas da diferenciação foram acompanhadas ao microscópio de luz e as imagens foram obtidas. Alíquotas das fases micélio (M), levedura (L) e após 22 h de diferenciação de micélio para levedura (T) foram coletadas por centrifugação (10000 g, 15 min, 4 °C) e armazenadas à - 80 °C para posterior extração das proteínas. Um esquema experimental de todas as técnicas desenvolvidas é mostrado na Figura 4.

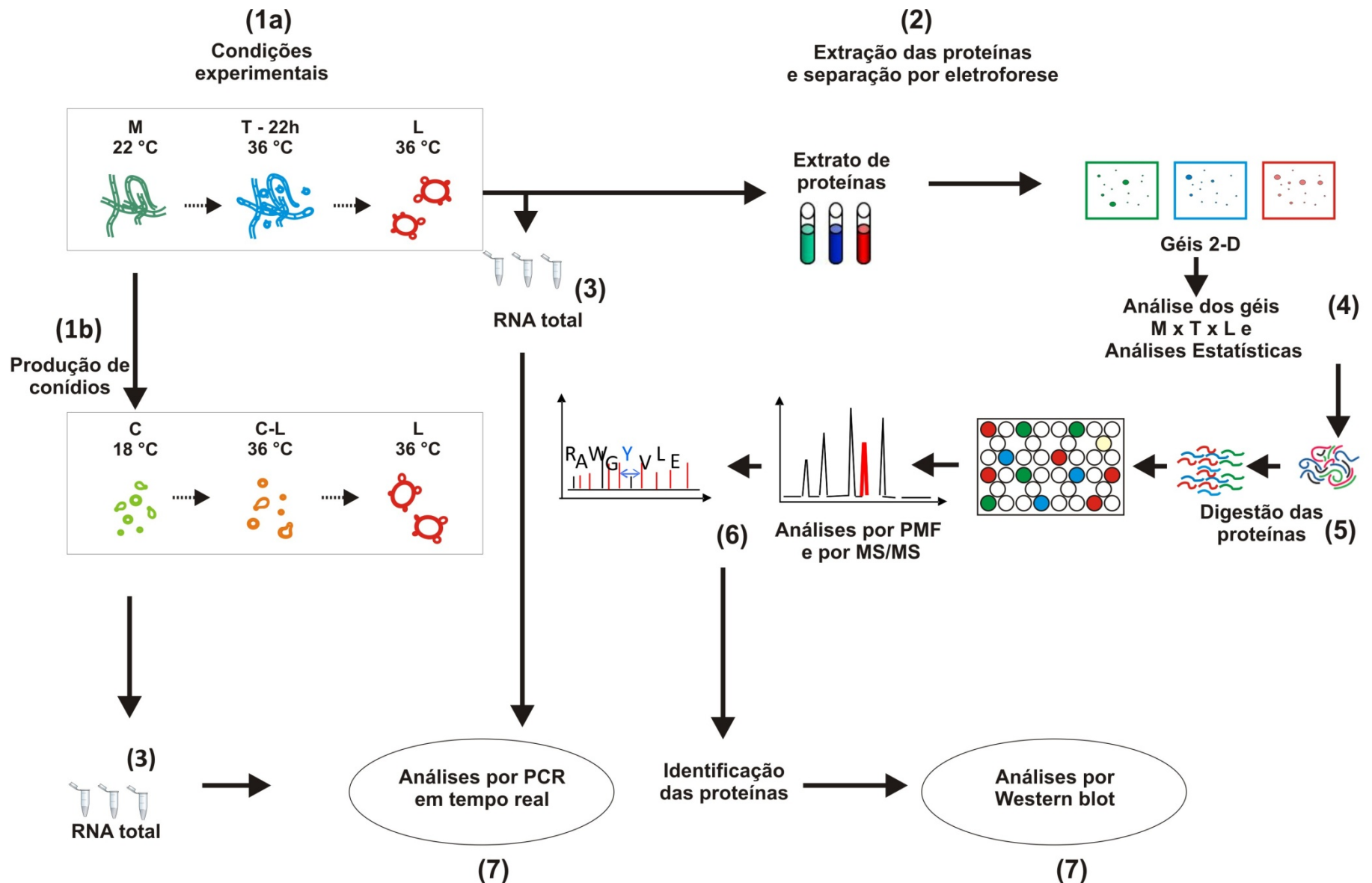


Figura 4 – Desenho experimental. (1a) *P. brasiliensis*, Pb01 (ATCC MYA-826) foi utilizado em todos os experimentos. Micélio (M) e levedura (L) cresceram à 22 °C e 36 °C, respectivamente, em meio Fava-Netto líquido. O mesmo meio foi utilizado para diferenciação de micélio para levedura (T). (1b) Para produção de conídios (C) células de micélio foram incubadas em meio agar batata por 50 dias à 18 °C. Os conídios foram coletados e induzidos a diferenciação para levedura por 22 h (C-L). (2) Preparação dos extratos de proteínas e fracionamento por 2-DE. Triplicatas de cada condição foram obtidas (M, T e L). (3) Extração de RNA de micélio, levedura e transição. (4) Análise de imagem utilizando-se o software ImageMaster 2D Platinum 6.0 e análises estatísticas por one-way ANOVA ($p < 0.05$). (5) digestão dos spots de interesse. (6) Aquisição dos espectros MS e MS/MS. (7) Análises por *Western blot* e RT-PCR em tempo real.

4.2 – Preparo dos Extratos de Proteínas totais

As células micélio, transição de micélio para levedura após 22 h de mudança da temperatura e de leveduras foram coletadas por centrifugação por 10 min. a 10.000 g e lavadas três vezes com água estéril gelada. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram congeladas e maceradas na presença de nitrogênio líquido, utilizando-se gral e pistilo, até a completa pulverização celular, como descrito (Fonseca et al., 2001). O material foi acrescido de tampão Tris-Cálcio (20 mM Tris-HCl pH 8,8; 2 mM CaCl₂), mistura de nucleases e coquetel de inibidores de proteases (serina, cisteína calpaína), sem EDTA. Após a adição de pérolas de vidro (0,45-mm) o material foi submetido à agitação vigorosa por 1 h a 4 °C seguido por centrifugação a 10.000 g por 15 min a 4 °C. O procedimento foi realizado separadamente para cada amostra utilizada nas análises. O teor de proteínas do sobrenadante foi quantificado com o sistema comercial Plus One 2D Quant™ (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) segundo as instruções do fabricante.

4.3 – Eletroforese Bidimensional de Proteínas (2-DE)

Todos os reagentes e equipamentos utilizados na eletroforese bidimensional foram da empresa GE Healthcare. Um protocolo compatível com a focalização isoelétrica foi desenvolvido após testarem-se diversas condições, incluindo tampão de reidratação. Um total de 170 µg de proteínas foi utilizado para cada condição e aplicado em tiras de gradiente de pH imobilizado (IPG) de 13 cm com separação não linear (NL) de pH 3-11. Antes da focalização isoelétrica (IEF) os extratos celulares foram precipitados utilizando-se o sistema comercial 2-D Clean-Up™. Após a centrifugação o precipitado foi lavado para retirada de contaminantes não protéicos como detergentes, sais, lipídeos e ácidos nucléicos. A mistura foi centrifugada novamente e o precipitado resultante foi ressuspensionado em tampão de reidratação (7 M uréia, 2 M tiouréia, 0,5 % (v/v) tampão para IPG 3-11 NL, 65 mM DTT, 2 % [p/v] CHAPS e traços de azul de bromofenol até se obter o volume final de 250 µL. Após incubação por 1 h, sob agitação, o material foi centrifugado a 12.000 g, 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi aplicado a um suporte apropriado e a tira de IPG foi colocada sobre o tampão de reidratação. As tiras de IPG foram cobertas com óleo mineral e deixadas por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, as tiras foram incubadas (reidratadas) por 14 h. sendo as seguintes as condições para a focalização das proteínas: 500 V por 1 h (step), 500 -1000 V por 1 h (gradiente), 1000 - 8000 por 12,5 h (gradiente) e 8000 V por 2,5 h (step), com total de 15980 V/h. Tanto a reidratação quanto a focalização isoelétrica foram realizados no sistema Ettan IPGphor III e a temperatura da corrida foi mantida à 20 °C. Após o término da focalização isoelétrica as tiras foram armazenadas à - 80 °C. Após a focalização isoelétrica as tiras de IPG foram reduzidas com 0,5% (p/v) de DTT em 5 mL de tampão de equilíbrio contendo 6 M uréia; 0,5 M Tris-HCl; pH 8,8; 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS e azul de bromofenol durante 40 min com suave agitação. Em seguida, a solução foi descartada e as tiras foram alquiladas com 2,5% (p/v) de iodocetamida no mesmo tampão de equilíbrio e deixadas por 40 min com suave agitação e sob proteção da luz. Após isso, o tampão de equilíbrio foi retirado e as tiras IPGs foram lavadas com tampão de corrida (25 mM Tris pH 8,8, 192 mM glicina, 0,1% [p/v] SDS) por 5 min. A separação na segunda dimensão foi realizada na cuba

de eletroforese vertical, Hoefer SE-600 em géis homogêneos de 10% T, (1,5 mm de espessura). Um marcador de proteínas com massa molecular conhecida foi colocado na extremidade ácida da tira IPG. As tiras IPG foram colocadas e seladas nos géis SDS-PAGE com 0,5% de agarose em tampão de corrida e traços de azul de bromofenol. A separação eletroforética da segunda dimensão foi realizada segundo a descrição de Laemmli (1970) com tampão de corrida nos compartimentos superior e inferior da cuba. A corrida teve duas etapas: na primeira hora de corrida a voltagem foi mantida a 100 V e após esse tempo foi aumentada para 250 V até que a linha de frente atingisse o final do gel. A temperatura foi mantida à 10 °C e após o término da corrida os géis foram retirados da cuba e corados utilizando-se o sistema comercial Silver Staining kit Protein™, sem glutaraldeído. Os géis foram armazenados à 4 °C em ácido acético a 1%. As imagens dos géis foram capturadas utilizando-se o scanner ImageScan III e posteriormente, digitalizadas com o software ImageMaster 6.0.

4.4 – Aquisição e análise das imagens

Os géis corados foram capturados em modo transparência utilizando-se o programa Labscan v 3.0 e as imagens foram importadas do formato TIFF (Tag Image File Format) e convertidas para o formato do programa Image Master Platinum 6.0 (.mel). Os *spots* detectados automaticamente pelo software do programa foram conferidos manualmente e os sinais falsos positivos foram removidos, também, manualmente. Foram analisadas triplicatas de géis para cada condição estudada, utilizando-se uma referência para alinhamento (ponto de referência) para pareamento automático. Um *spot* foi considerado reprodutível quando estava presente em todas as triplicatas dos géis de cada condição. Para se comparar spots entre os géis das três condições (pareamento intra classes) uma pasta de pareamento (*matchSet*) foi criada. Um gel referência (*master*) de cada condição foi escolhido como sendo a imagem com o maior número de spots e com melhor resolução. O pareamento automático entre os géis *master* (pareamento inter classes) foi realizado pelo programa e uma inspeção manual de cada *spot* foi realizada para aumentar a confiabilidade do pareamento (Figura 5). A porcentagem de volume de cada *spot* foi determinada e utilizada para cálculos estatísticos dos níveis de expressão de proteínas.

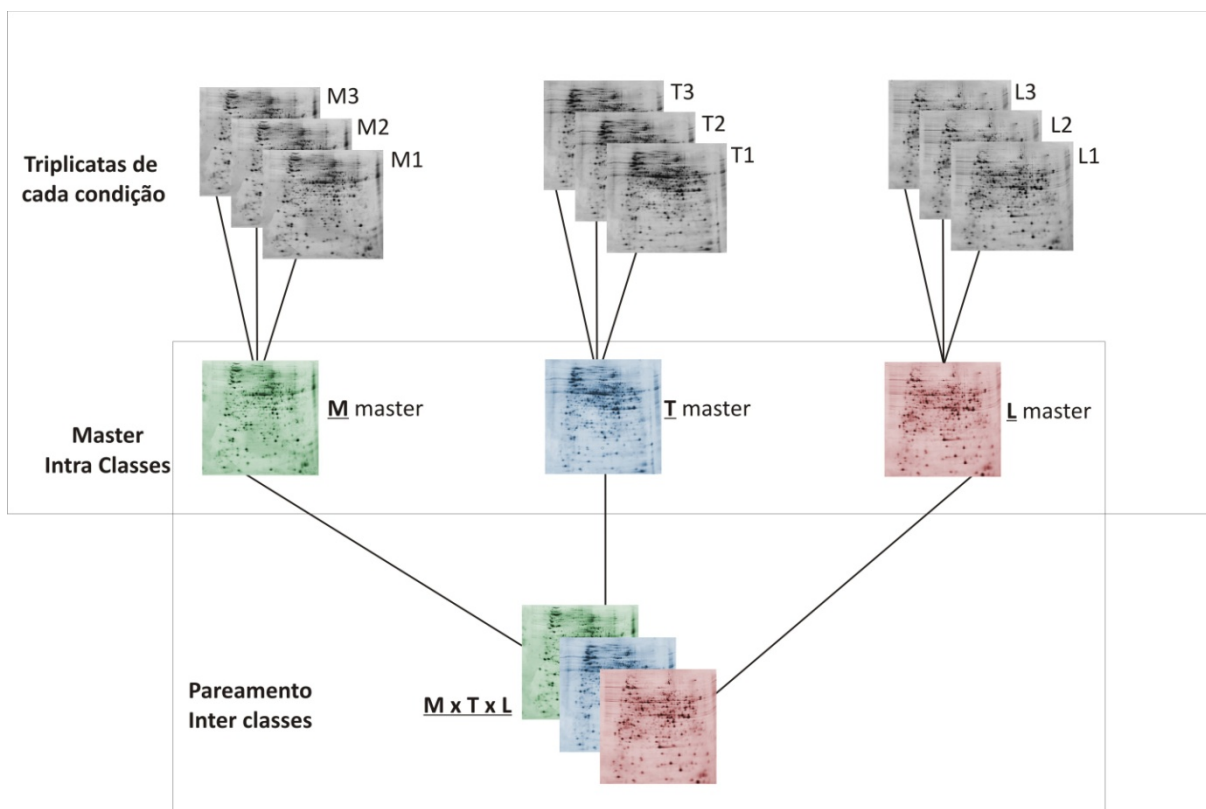


Figura 5 – Fluxograma das análises de imagens realizadas entre as três condições: micélio (M), transição (T) e levedura (L).

4.6 – Análises Estatísticas

As análises estatísticas das três amostras de micélio, levedura e da transição de micélio para levedura (22 h) foram realizadas com o software STATISTICA version 7.0 (Statsoft Inc., 2005). Os testes de análise de variância (one-way ANOVA) e comparações múltiplas com teste de Tukey foram realizados para identificação de diferenças significativas entre as três condições analisadas. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

4.7 – Digestão das proteínas para espectrometria de massa tipo MALDI

Os *spots* de proteínas com diferença significativa de expressão foram selecionados, bem como outros escolhidos aleatoriamente, não apresentando expressão diferencial, e excisados do gel 2-D. Quando necessário, o mesmo spot foi retirado de dois ou mais géis e misturados no mesmo tubo antes da digestão. Para retirada da coloração pela prata, os *spots* foram descorados em 15 mM de ferricianeto de potássio e 50 mM de tiosulfato de sódio (Gharahdagi et al. 1999) por 5 min e lavados 3 vezes com água milli-Q. O procedimento para a digestão das proteínas foi realizado manualmente como previamente descrito (Winters et al., 2008). Os *spots* foram desidratados com 100 μ L de acetonitrila (ACN) por 5 min e, após a solução ser retirada, os *spots* de proteínas foram deixados no *speed vacuum* até secar completamente. Os *spots* de géis foram então reduzidos com 10 mM DTT por 1 h. O sobrenadante foi retirado e os *spots* foram alquilados com 55 mM de iodoacetamida ao abrigo da luz. Os *spots* foram lavados com 100 μ L de solução contendo 25 mM de NH_4HCO_3 por 10

min agitando em vortex. Em seguida o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 100 µL de uma solução contendo 25 mM de NH₄HCO₃/50% ACN (v/v), deixando sob agitação em vortex por 5 min. Esse procedimento foi repetido. Após a solução ser retirada as amostras foram desidratadas no *speed vacuum*. Finalmente, as amostras foram reidratadas em 30 µl de tripsina a 10 ng/µL (Sequencing Grade Modified Trypsin Promega, Madison, WI, USA) durante 10 min a 4 °C. Após a remoção do excesso de tripsina foi adicionado 25 µL de solução de 25 mM de NH₄HCO₃ às amostras em gel e prosseguiu-se a incubação à 37 °C por 16 h. Após a digestão, o sobrenadante foi retirado e colocado em tubos novos e limpos. Aos spots de géis foi adicionado 50 µL de solução de 50% (v/v) de ACN, 5% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA). A solução foi misturada em vortex por 10 min e depois sonicada por 3 min a 4 °C. O sobrenadante foi adicionado aos tubos anteriores contendo a mistura de peptídeos. Os tubos contendo os peptídeos trípticos foram deixados no *speed vacuum* até secarem completamente e, em seguida, os peptídeos foram reconstituídos em água. Para concentrar e dessalinizar algumas amostras de *spots* pequenos foi utilizada a ponteira de cromatografia ZipTip C18 (Millipore, Bedford, MA, USA). Foi adicionado 2 µL da amostra na placa MALDI e deixado secar à temperatura ambiente até a completa evaporação. Em seguida, 2 µL da solução de matriz CHCA [α ácido α -ciano- 4-hidroxicinâmico em 50% (v/v) de acetonitrila e 5% (v/v) de TFA] a 10 ng/µL foi adicionado à placa e deixado secar à temperatura ambiente.

4.8 – Identificação das proteínas por PMF e por MS/MS e pesquisa em banco de dados

As análises foram realizadas no espectrômetro de massa MALDI-Synapt MSTM (Waters-Micromass, Manchester, UK). Para realização das análises por MS os espectros foram adquiridos em modo positivo e refletido. O instrumento foi calibrado com uma acurácia de <10 ppm utilizando-se uma mistura de padrões de peptídeos sintéticos conhecidos com uma variação de m/z de 800 to 4000 Da. O instrumento foi configurado para adquirir os espectros MS e os picos com intensidade acima de 15 *counts* foram automaticamente fragmentados com argônio na célula de colisão, resultando nos espectros MS/MS, utilizando se o software Masslynx 4.0. Os picos de listas (*.txt) e (*.pkl) foram criados pelo ProteinLynx Global Server 2.2.5v (Waters, UK).

A identificação das proteínas por PMF foi realizada submetendo-se as listas de massas monoisotópicas dos espectros MS (*.txt) ao programa MASCOT (MASCOT 2.1.02; Matrix Science, London, U.K.), usando o banco de dados não redundante do National Center for Biotechnology Information (NCBI) para identificar proteínas candidatas. Os parâmetros de busca para PMF foram: (i) taxonomia, fungi; (ii) enzima, tripsina; (iii) modificações fixas: carbamidometilação das cisteínas; (iv) modificações variáveis: oxidação das metioninas; (v) tolerância de peptídeos: 20-100 ppm; (vi) permissão de clivagem perdida para peptídeos: máximo de 1. Para confirmação da identificação das proteínas por PMF, os espectros de ions MS/MS processados e convertidos nos arquivos *.pkl e a lista de picos foram confrontados novamente no banco de dados não redundante do NCBI (fungi). Os parâmetros de busca foram os mesmos descritos para o PMF, exceto para tolerância de massa do fragmento (MS/MS), que foi entre 0.2-0.6 Da. As análises por MS/MS confirmaram as proteínas identificadas com base nos PMFs, validando as identificações. O banco de dados MIPS

(<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/listSearch.html?order=entry>) foi utilizado para prever a categoria funcional das proteínas.

4.9 – Produção de conídios e transição de conídio para levedura

Para a produção de conídios foi utilizado o protocolo previamente descrito por Restrepo (1986). Os micélios foram cultivados em meio agar batata à 18 °C. A produção de conídios foi observada e documentada no microscópio Eclipse TE 2000S, NIKON, com aumento de 40 x. Após 50 dias de incubação os conídios foram coletados das placas, purificados e armazenados para posterior análise. Para induzir o processo de transição de conídio para levedura (C-L) os conídios coletados foram contados na câmara de Neubauer, ajustando-se à concentração final de 5×10^6 e distribuídos em frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL de meio líquido Fava-Netto. O material foi incubado à 36 °C, por 22 h, sob agitação constante. O material foi centrifugado e o sobrenadante foi congelado em nitrogênio líquido. Um total de $1,7 \times 10^6$ conídios foram utilizados para extração de RNA.

4.10 – Extração de RNA, síntese de cDNA e análise dos transcritos por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)

Todos os procedimentos envolvendo a manipulação de RNA foram realizados em condições livres de RNases. O RNA total das células de micélio (M), levedura (L), transição de micélio para levedura após 22 h (T), conídio (C) e da transição de conídio para levedura após 22 h (C-L) de *P. brasiliensis* foram utilizados. Os RNAs foram isolados por ruptura mecânica das células e agitação com pérolas de vidro por 10 min na presença de Trizol (GIBCO™ Invitrogen Corporation), seguindo o protocolo do fabricante. Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados na junção exon-exon, amplificando amplicons de aproximadamente 100 a 200 pares de base. A Tabela 1 mostra a lista dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR. As reações de qRT-PCR foram realizadas utilizando-se a mistura SYBR green (Applied Biosystems, Foster City, CA) no sistema StepOnePlus™ real time PCR (Applied Biosystems) em triplicatas biológicas. A especificidade de cada par de oligonucleotídeos utilizados foi confirmada pela visualização de um único produto de PCR em gel de agarose 1,2%. Os oligonucleotídeos com as sequências correspondentes estão descritos na Tabela 1. A reação de PCR em tempo real foi realizada em 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. A mistura SYBR Green PCR foi utilizada adicionada de 10 pmol de cada oligonucleotídeo e 40 ng de cDNA molde, em um volume final de 25 µl. As curvas padrões foram geradas utilizando-se uma alíquota de cDNA de cada amostra, serialmente diluídas (1:5 da diluição original). Os dados foram normalizados com o transcrito codificante para a proteína alfa tubulina amplificado em cada conjunto de experimentos de qRT-PCR. Os níveis de expressão relativa dos genes de interesse foram calculados utilizando-se o método de curva padrão para quantificação relativa (Bookout et al., 2006). Os resultados foram validados pelo teste de ANOVA (one-way) seguido por comparações múltiplas com teste de Tukey, sendo consideradas diferenças significativas as amostras que apresentaram valor de $p < 0.05$.

Tabela 1- Lista dos oligonucleotídeos utilizados

| Número do spot | Nome do gene | Oligonucleotídeo | Sequência do oligonucleotídeo (5'-3') | Tamanho do fragmento amplificado (total bp) |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|--|--|
| 13 | isocitrato liase | sense antisense | GAACCGACCTCCTGGCTGT CGTTCTTGCCTGCTTGCTCA | 162 |
| 22, 23 | aldeído desidrogenase | sense antisense | CCTCTTACGGCCTTGCTGC CGGACGCCCTTGATCTGAG | 208 |
| 28, 29, 30, 31 | enolase | sense antisense | GATTTGCAGGTTGTGCGCCGA TGGCTGCCTGGATGGATTCA | 139 |
| 81 | triosefosfato isomerase | sense antisense | GATGATGAGTTTGTAGCACGG CGACCTTGCCCGTTCCGAT | 220 |
| 67 | álcool desidrogenase | sense antisense | ATCATACGACGGGGCTTCTG AGTGGTAAAAGTTGGATGATTG | 146 |

4.11 – Análises por *Western blotting*

Extratos protéicos (30 µg) das células de micélio, levedura, transição de micélio para levedura do fungo *Pb01* foram quantificadas e as proteínas fracionadas por SDS-PAGE (12%), como descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (HyBond ECL, GE Healthcare) a 30 V por 16 h a 4 °C. Após a confirmação da transferência seguiu-se a incubação com tampão de bloqueio por 2 h a temperatura ambiente. Após o bloqueio dos sítios inespecíficos, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos policlonais selecionados. A incubação foi realizada à temperatura ambiente por 2 h, sob agitação vigorosa. Os anticorpos utilizados para essa análise foram: isocitrato liase (Cruz et al., 2011), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (adquirido de United States Biological/Swampscott, MA), enolase (Nogueira et al., 2010), aconitase (Brito et al., 2011), triosefosfato isomerase (Pereira et al., 2007) e frutose-1,6-bisfosfato aldolase (38 kDa, dados não publicados). Anticorpo policlonal contra a proteína C-24 esterol metiltransferase foi utilizado como controle da reação. Após incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes e incubadas com anticorpo secundário de camundongo e/ou coelho, acoplados à fosfatase alcalina. A incubação foi realizada a temperatura ambiente por 1 h, sob agitação vigorosa. Após a lavagem das membranas e incubação com tampão para fosfatase alcalina, as bandas reativas foram desenvolvidas com o substrato cromogênico para fosfatase alcalina (BCIP/NBT) e a reação foi interrompida pela adição de EDTA 0,5M.

Resultados 5

“Obstáculos são aquelas coisas assustadoras que você vê quando desvia seus olhos de sua meta”

Henry Ford

V – RESULTADOS

5.1 – Transição dimórfica de micélio para levedura no fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

A alteração da temperatura de 22 °C para 36 °C é condição que dispara a transição de micélio para levedura em *P. brasiliensis*. A alteração na morfologia (Figura 9) da fase de micélio (saprofítica) para a fase leveduriforme (patogênica) está diretamente associada com a expressão diferencial de proteínas, como anteriormente demonstrado em ensaios com [³⁵S] metionina (Silva et al., 1994). No presente trabalho, foi escolhido o tempo de 22 h de incubação após o início da transição, visto que trabalhos anteriores do grupo demonstraram alterações na expressão de transcritos nesse período de tempo (Bastos et al., 2007). Assim, a análise proteômica foi realizada nas fases micélio (M), levedura (L) e após 22 h de diferenciação (T).

5.2 – Otimização dos géis bidimensionais

As condições para eletroforese bidimensional (2-DE) das proteínas do fungo *P. brasiliensis* foram padronizados para a faixa de pH de 3-11 não linear. Neste estudo, verifica-se a grande capacidade da 2-DE em resolver proteínas do fungo *P. brasiliensis*, utilizando-se o gradiente de pH imobilizado (IPG). Um dos problemas frequentes na eletroforese bidimensional é a presença de arrastes (vertical ou horizontal) na região alcalina do gel, geralmente devido à ionização de DTT ou devido ao efeito eletroosmótico da água (arraste horizontal).

Os géis foram realizados com amostras preparadas em diferentes condições como o uso do reagente Clean-up (GE Healthcare) para eliminar interferentes que pudessem prejudicar a focalização isoeletrica das proteínas. O uso dos agentes caotrópicos uréia e tiouréia também foram testados. Os resultados demonstram que a combinação desses dois agentes melhora a solubilização das proteínas, principalmente as de alta massa molecular (Figura 6-A). Na tentativa de resolver o problema do arraste na região alcalina testamos duas concentrações de DTT, 40 mM e 65 mM (Figura 6-B). Embora o arraste não tenha sido completamente eliminado nesse teste, optamos por usar 65 mM de DTT, visto que nessa concentração as proteínas foram mais bem solubilizadas. A quantidade de CHAPS e de tampão de IPG também foram testados (dados não mostrados). Optamos em utilizar 2% de CHAPS (p/v) e 0,5% de tampão de IPG (v/v), e não 4% e 1%, respectivamente, visto que não houve alteração na solubilização nem na resolução das proteínas (Figura 6-C). O equilíbrio das tiras IPGs também foi testado com o intuito de se eliminar o arraste vertical na região alcalina. O tempo de equilíbrio foi alterado de 15 para 40 min na etapa de redução e de 15 para 40 min na etapa de alquilação das proteínas. Foi selecionado o tempo de 40 min devido à melhora na separação vertical das proteínas. A resolução dos *spots* na região básica foi resolvida após várias tentativas (Figura 6 –D).

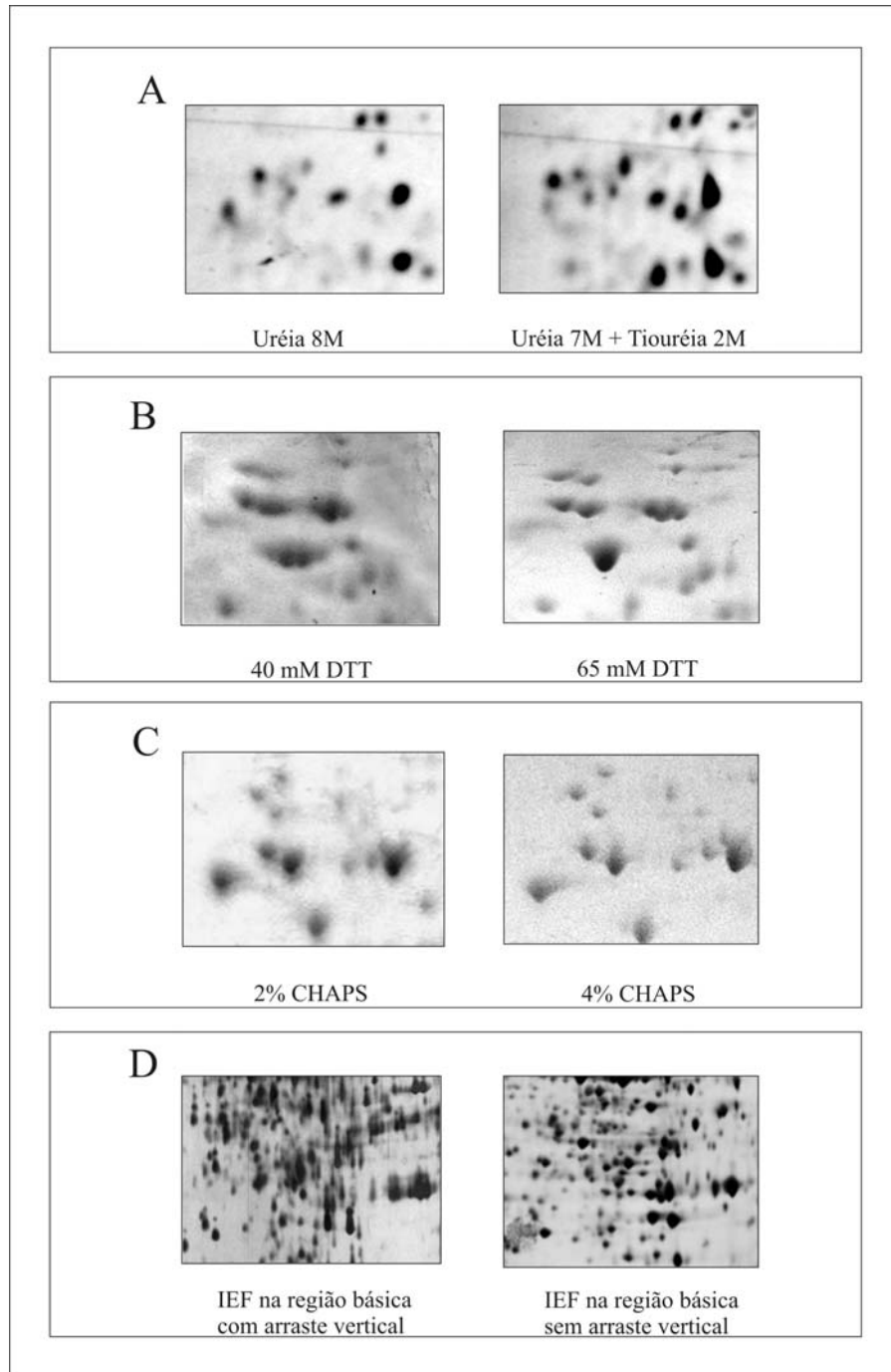


Figura 6 - Otimização dos géis 2-D - Gel bidimensional com 150 ug de extrato de proteínas. SDS-PAGE 10%. Coloração pela prata. **(A) Efeito da concentração de caotrópicos no padrão eletroforético de extratos de *P. brasiliensis*:** Amostras de proteínas solubilizadas em tampão de reidratação contendo uréia 8M ou uma mistura de tiouréia 2M com uréia 7M. **(B) Efeito da concentração de DTT no padrão eletroforético de extratos de *P. brasiliensis*:** Amostras de proteínas solubilizadas em tampão de reidratação contendo DTT 40 mM ou 65 mM. **(C) Efeito da concentração de CHAPS no padrão eletroforético de extratos de *P. brasiliensis*:** Amostras de proteínas solubilizadas em tampão de reidratação contendo 2% ou 4% CHAPS. **(D) Efeito eletroendoosmótico (EOF):** Gel bidimensional com e sem arraste vertical na região básica do gel.

5.3 – Análises proteômicas do fungo *P. brasiliensis*

As proteínas do fungo *P. brasiliensis* foram extraídas seguindo um procedimento já estabelecido (Fonseca et. al., 2001) e um protocolo para eletroforese bidimensional foi padronizado. Utilizando uma ampla faixa de pH de 3-11 não linear (NL) e coloração pela prata (sem glutaraldeído) foi possível a resolução e detecção de cerca de 911-1017 *spots* de proteínas com massas moleculares de 11 a 127 kDa e *pI* de 3,3 a 11. O perfil protéico da forma miceliana apresentou uma média de 991 *spots*, a forma leveduriforme 1017 *spots* e a transição de micélio para levedura (22 h), 911 *spots*. Os perfis protéicos foram reprodutíveis considerando-se as replicatas técnicas e as amostras biológicas. Para se avaliar os níveis de expressão das proteínas do fungo *P. brasiliensis*, a intensidade de coloração dos *spots* nas três condições (M, L e T) foi comparada através do software Image Master Platinum 6.0 (GE Healthcare). Inicialmente, foi realizado o pareamento entre as triplicatas das amostras de micélio; em seguida o mesmo procedimento foi realizado para a forma levedura e para transição de micélio para levedura (T). Logo após, pareou-se o gel mais representativo (*master*) da forma micélio com o *master* da formas levedura e transição de micélio para levedura (T). Foi gerada então, uma lista dos *spots* contendo dados como volume, volume normalizado (% de cada *spot*) e valores experimentais de massas moleculares da segunda dimensão e *pI* da primeira dimensão de todos os *spots*. Para comparar as diferenças na expressão das proteínas entre as condições analisadas, 396 *spots* que parearam entre as três condições foram analisados estatisticamente pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$). As análises revelaram que 33, 73 e 62 *spots* de proteínas foram diferencialmente expressos em micélio, durante a transição de micélio para levedura e levedura, respectivamente. Os *spots* foram descritos como: sendo “comuns” às três condições do fungo ou preferencialmente expressos em uma das três condições. A Figura 7 (A-C) apresenta um gel bidimensional (*master*) de cada um das três condições realizadas e as proteínas identificadas nas três condições estudadas.

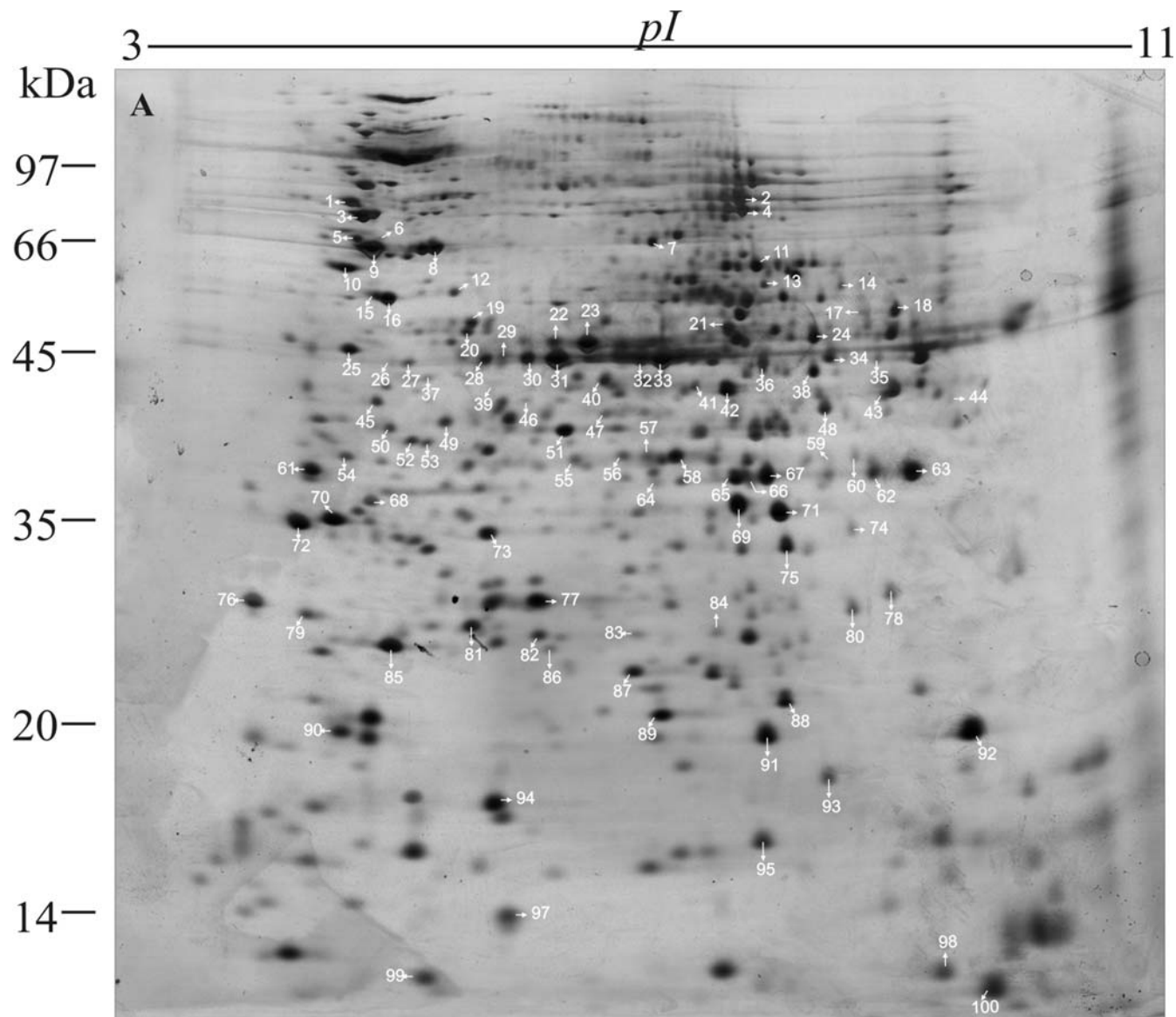


Figura 7 (A) – Perfil de proteínas de *P. brasiliensis* identificadas por espectrometria de massa. Imagem 2-DE de micélio. Um total de 170 µg de extrato de proteínas foram separadas em tiras de 13 cm (IPG strips), pH 3–11 não linear. As posições das proteínas identificadas por espectrometria de massa estão indicadas pelas setas e números. O gradiente de pH está marcado acima do gel e a massas moleculares do padrão (kDa) estão indicadas à esquerda dos géis.

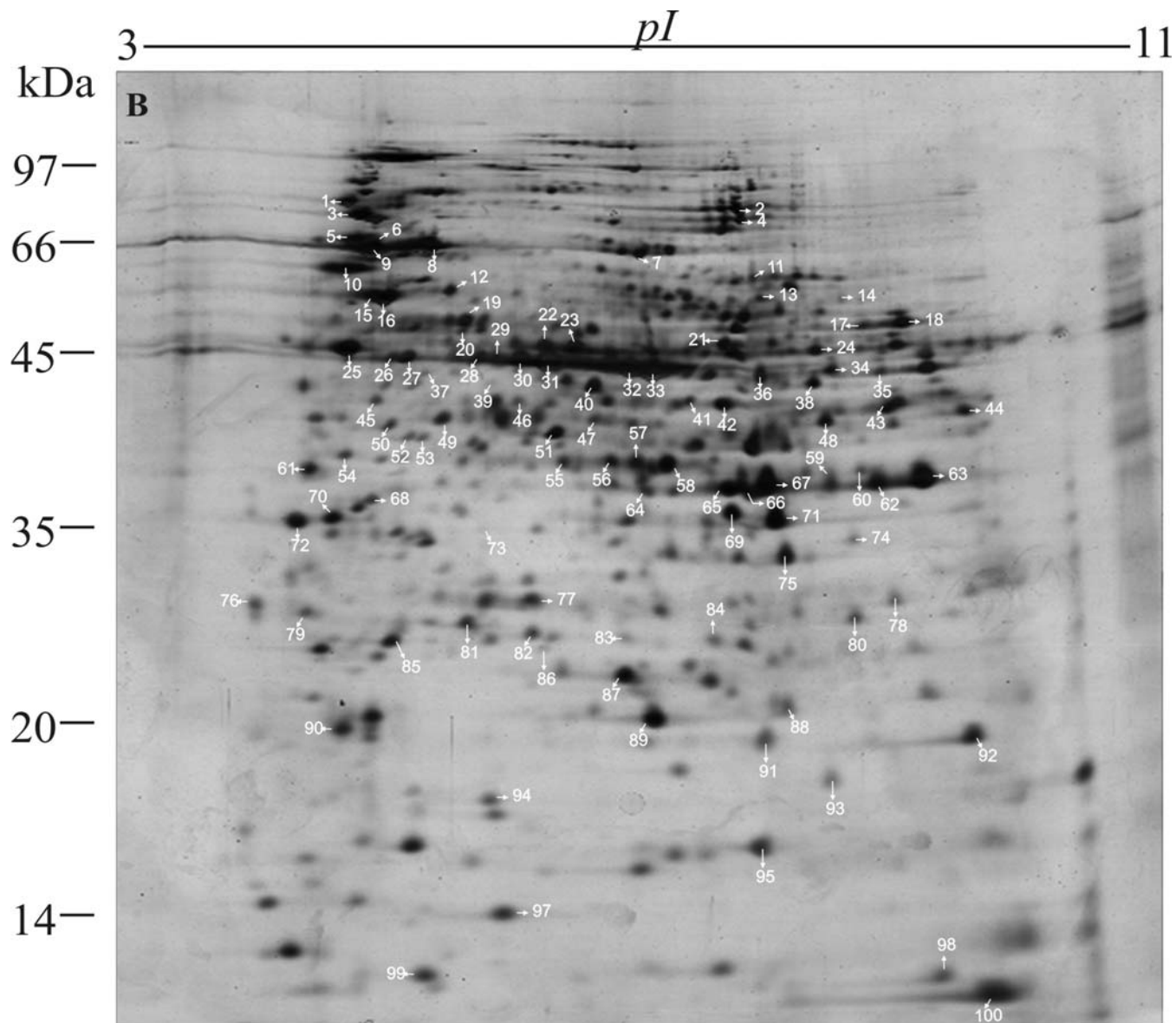


Figura 7 (B) – Perfil de proteínas de *P. brasiliensis* identificadas por espectrometria de massa. Imagem 2-DE da transição de micélio para levedura. Um total de 170 µg de extrato de proteínas foram separadas em tiras de 13 cm (IPG strips), pH 3–11 não linear. As posições das proteínas identificadas por espectrometria de massa estão indicadas pelas setas e números. O gradiente de pH está marcado acima do gel e a massas moleculares do padrão (kDa) estão indicadas à esquerda dos géis.

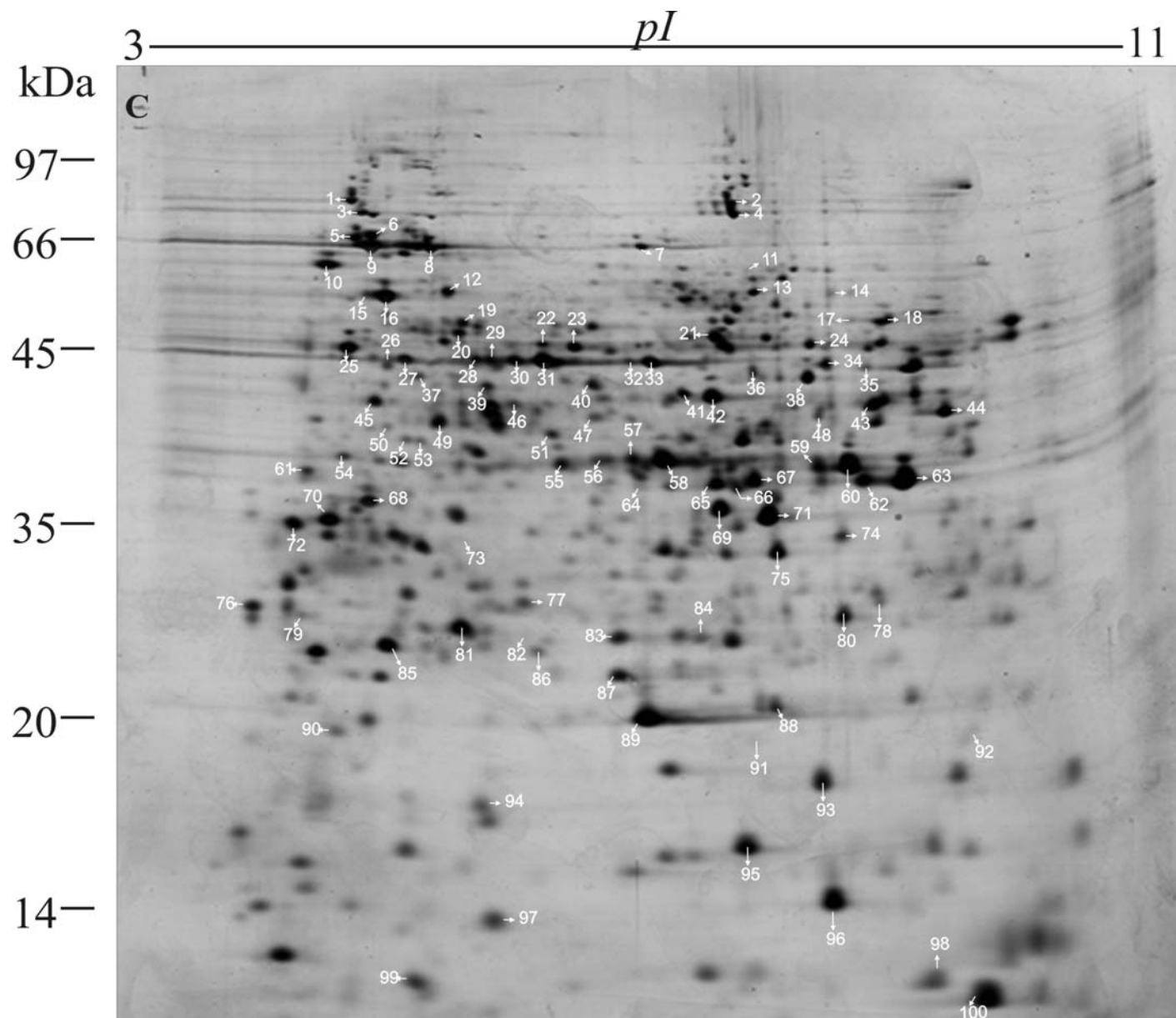


Figura 7 (C) – Perfil de proteínas de *P. brasiliensis* identificadas por espectrometria de massa. Imagem 2-DE de levedura. Um total de 170 µg de extrato de proteínas foram separadas em tiras de 13 cm (IPG strips), pH 3–11 não linear. As posições das proteínas identificadas por espectrometria de massa estão indicadas pelas setas e números. O gradiente de pH está marcado acima do gel e a massas moleculares do padrão (kDa) estão indicadas à esquerda dos géis.

5.4 – Identificações das proteínas do fungo *P. brasiliensis* através de espectrometria de massa

Nesse estudo, foi utilizada uma estratégia proteômica para identificação de proteínas preferencialmente expressas nas duas fases e durante estágios iniciais da transição do fungo *P. brasiliensis*. Os spots de proteínas obtidos dos géis 2-D foram retirados, digeridos com tripsina e os peptídeos foram analisados por PMF e/ou MS/MS. As Tabelas 3-6 mostram a relação de todas as proteínas identificadas obtidas por análises de PMF e MS/MS, bem como o *pI* e a massa molecular teóricos e experimentais de cada spot, o número de peptídeos encontrados, a porcentagem de cobertura de sequência em relação à sequência total e os peptídeos confirmados por MS/MS. Todas as proteínas identificadas foram pesquisadas no banco do NCBI nr com restrição para Fungos. Cada peptídeo apresentado na Tabela obteve um score acima do valor aceitável, indicando identidade confiável ($p < 0,05$). Foram identificadas 100 proteínas/isoformas por espectrometria de massa, sendo 18 com expressão preferencial em micélio, 30 com expressão preferencial durante a transição de micélio para levedura e 33 com expressão preferencial em levedura. Do total de identificações, 19 proteínas/isoformas não tiveram diferença de expressão com significância estatística, como ilustrado na Figura 8.

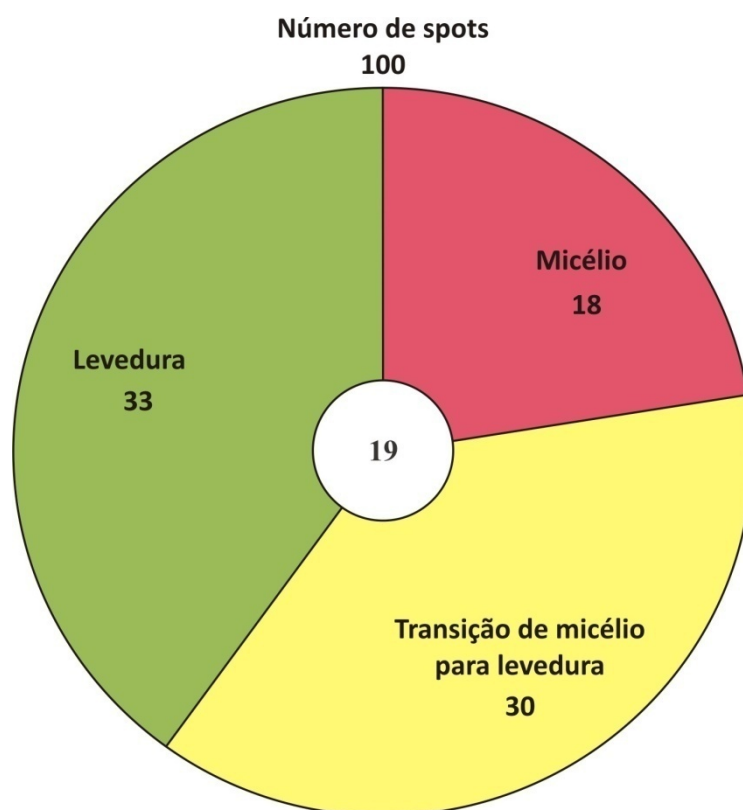


Figura 8 – Diagrama representando as proteínas identificadas em cada fase do fungo. A análise comparativa fornece as proteínas/isoformas preferencialmente expressas e as constitutivas

Tabela 2: Identificação das proteínas de *P. brasiliensis* com expressão preferencial na fase de micélio quando comparada com as fases de transição de micélio para levedura e com levedura

| Categoria funcional ^a | Número de acesso/Descrição da proteína ^b | Número do spot ^c | Probabilidade no Mascot ^d | Cobertura de sequência % ^e | Teo. MM/pi ^f | Exp. MM/pi ^g | Número de peptídeos encontrados (MS/MS) ^h | Anova (p<0,05) ⁱ |
|---|---|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--|-----------------------------|
| Defesa celular e virulência | | | | | | | | |
| | PAAG_03216 peroxiredoxina mitocondrial – prx1 | 85 | 114 | 86 | 24,9/5,28 | 24,9/4,93 | 2 | 0,030 |
| | PAAG_02725 Mn superóxido dismutase – sod | 88 | 81 | 71 | 24,8/8,91 | 20,8/8,05 | | 0,001 |
| Metabolismo de carboidrato | | | | | | | | |
| | PAAG_06473 manitol-1-fosfato 5-desidrogenase – mtdl | 51 | 129 | 62 | 43,1/5,66 | 39,9/6,27 | 5 | 0,006 |
| Energia | | | | | | | | |
| | PAAG_05249 aldeído desidrogenase – aldH | 22 | 121 | 50 | 54,6/5,87 | 45,7/6,19 | 3 | 0,003 |
| | PAAG_05249 aldeído desidrogenase – aldH | 23 | 177 | 58 | 54,6/5,87 | 45,4/6,44 | 8 | 0,001 |
| Metabolismo de aminoácidos | | | | | | | | |
| | PAAG_08910 D-3-fosfoglicerato desidrogenase – phgdH | 11 | 87 | 41 | 64,1/6,55 | 58,1/7,82 | 4 | 0,034 |
| Síntese e endereçamento de proteínas | | | | | | | | |
| | PAAG_03334 peptidil-prolil cis-trans isomerase D – ppiD | 52 | 50 | 43 | 41,4/5,36 | 39,3/5,08 | 3 | 0,003 |
| | PAAG_03334 peptidil-prolil cis-trans isomerase D – ppiD | 53 | 184 | 68 | 41,4/5,36 | 39,2/5,20 | 5 | 0,028 |
| | PABG_00326 subunidade alfa tipo-7 do proteassoma – psma3 | 78 | 98 | 55 | 29,3/8,25 | 27,7/8,92 | 2 | 0,003 |
| | PAAG_03687 componente PUP2 do proteassoma – pup2 | 79 | 136 | 77 | 26,8/4,79 | 27,1/4,24 | 5 | 0,017 |
| Transdução de sinal | | | | | | | | |
| | PABG_07632 vos2/co-chaperona de ligação à Hsp90 | 76 | 78 | 44 | 23,6/4,30 | 27,9/3,83 | 2 | 0,009 |
| Organização celular | | | | | | | | |
| | PAAG_08058 cofilina – cfl | 94 | 123 | 61 | 17,5/5,68 | 17,0/5,72 | | 0,001 |
| Ciclo celular | | | | | | | | |
| | PAAG_06751 proteína do ponto de checagem do dano ao DNA rad24 – rad24 | 72 | 82 | 63 | 29,7/4,68 | 35,0/4,17 | | 0,031 |
| | PAAG_00773 proteína do ponto de checagem do dano ao DNA rad24 – rad24 | 61 | 184 | 52 | 32,5/4,74 | 37,7/4,40 | 9 | 0,025 |
| Proteínas não classificadas | | | | | | | | |
| | PAAG_00503 HAD superfamília hidrolase | 77 | 51 | 60 | 27,3/5,67 | 28,0/6,06 | 2 | 0,001 |
| | PAAG_00340 proteína hipotética conservada | 92 | 134 | 58 | 19,2/8,61 | 19,2/9,58 | | 0,035 |
| | PAAG_00340 proteína hipotética conservada | 91 | 88 | 57 | 19,2/8,61 | 19,0/7,87 | 3 | 0,001 |
| | PAAG_06082 proteína da família NmrA | 73 | 113 | 38 | 27,5/4,90 | 33,9/5,62 | | 0,001 |

^a**Categoria funcional** – baseado no banco de dados de categoria funcional MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/listSearch.html?order=entry>);

^b**Número de acesso/descrição da proteína** – número de acesso da proteína identificada no banco de dados do *P. brasiliensis*; (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html)

^c**Número do spot** – número do spot como descrito na Figura 13 (A-C);

^d**Probabilidade no Mascot** – probabilidade obtida da busca no Mascot;

^e**Cobertura de sequência** – porcentagem de cobertura de sequência do aminoácido em relação à proteína total identificada;

^f**Teo. MM/pI (kDa)** – massa molecular e pI teóricos calculados a partir da sequência de aminoácidos da proteína identificada;

^g**Exp. MM/pI (kDa)** – massa molecular e pI experimental obtidos dos géis 2-DE;

^h**Número de peptídeos encontrados (MS/MS)** – número de peptídeos correspondente às massas da proteína encontrada;

ⁱ**ANOVA** – teste de significância estatística para comparar as diferenças na expressão das proteínas entre as três condições analisadas. Os valores da ANOVA são indicados ($p < 0,05$).

Tabela 3: Identificação das proteínas de *P. brasiliensis* com expressão preferencial na transição de micélio para levedura quando comparado com as fases de micélio e levedura

| Categoria funcional ^a | Número de acesso/Descrição da proteína ^b | Número do spot ^c | Probabilidade no Mascot ^d | Cobertura de sequência % ^e | Teo. MM/pi ^f | Exp. MM/pi ^g | Número de peptídeos encontrados (MS/MS) ^h | Anova (p<0.05) ⁱ |
|---|---|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--|-----------------------------|
| Defesa celular e virulência | | | | | | | | |
| | PAAG_07750 proteína de choque térmico Hsp88 – hsp88 | 1 | 206 | 46 | 80,7/4,92 | 78,6/4,60 | 11 | 0,032 |
| | PAAG_05679 proteína de choque térmico Hsp90 – hsp90 | 3 | 187 | 53 | 78,6/4,91 | 73,8/4,68 | 7 | 0,020 |
| | PAAG_01262 proteína hsp70 – hsp70 | 5 | 92 | 46 | 68,9/5,39 | 66,4/4,62 | 3 | 0,006 |
| | PAAG_01339 proteína de choque térmico SSC1 – ssc1 | 8 | 232 | 65 | 73,8/5,92 | 64,0/5,28 | 9 | 0,002 |
| | PAAG_08003 proteína hsp70 – hsp70 | 9 | 317 | 57 | 70,9/5,08 | 63,4/4,75 | 7 | 0,028 |
| | PAAG_08003 proteína hsp70 – hsp70 | 15 | 252 | 58 | 70,9/5,08 | 54,1/4,75 | | 0,038 |
| Metabolismo de carboidrato | | | | | | | | |
| | PAAG_04444 transcetolase – tkl | 7 | 272 | 50 | 74,9/5,97 | 63,7/6,96 | 6 | 0,014 |
| | PAAG_04166 transaldolase – tal | 64 | 80 | 52 | 35,8/6,47 | 36,9/6,97 | | 0,004 |
| Glicólise | | | | | | | | |
| | PAAG_02011 fosfoglicomutase – pgm | 26 | 74 | 56 | 83,7/6,59 | 44,1/4,93 | | 0,000 |
| | PAAG_00771 enolase – eno | 28 | 105 | 66 | 47,4/5,67 | 44,1/5,64 | 8 | 0,019 |
| | PAAG_00771 enolase – eno | 29 | 160 | 63 | 47,4/5,67 | 44,1/5,79 | 6 | 0,020 |
| | PAAG_04541 álcool desidrogenase – adh1 | 67 | 107 | 44 | 44,8/8,96 | 36,9/7,91 | 3 | 0,013 |
| Ciclo do ácido cítrico | | | | | | | | |
| | PAAG_00053 malato desidrogenase – mdh1 | 71 | 137 | 70 | 36,0/8,99 | 34,8/7,99 | 3 | 0,001 |
| Energia | | | | | | | | |
| | PAAG_04820 ATP sintase subunidade alfa – atp5A1 | 17 | 78 | 53 | 51,0/8,67 | 49,1/8,72 | | 0,014 |
| | PAAG_04820 ATP sintase subunidade alfa – atp5A1 | 18 | 96 | 55 | 51,0/8,67 | 49,2/8,98 | | 0,003 |
| | PAAG_08037 ATP sintase subunidade beta – atp5B | 25 | 251 | 66 | 55,2/5,28 | 45,2/4,58 | | 0,008 |
| Metabolismo de lipídios | | | | | | | | |
| | PAAG_04550 2-metilcitrato sintase – mcs | 35 | 113 | 58 | 51,6/9,02 | 43,8/8,83 | 3 | 0,002 |
| Síntese e endereçamento de proteínas | | | | | | | | |
| | PAAG_00986 disulfeto isomerase – pdi1 | 10 | 208 | 50 | 59,3/4,80 | 59,7/4,51 | 11 | 0,023 |
| | PAAG_08931 glutamato carboxipeptidase | 19 | 77 | 67 | 64,6 /6,23 | 49,2/5,54 | 3 | 0,004 |
| Metabolismo de aminoácidos e de nitrogênio | | | | | | | | |
| | PAAG_07114 argininosuccinato sintase – argG | 27 | 94 | 56 | 46,8/5,18 | 44,1/5,07 | 5 | 0,000 |
| | PAAG_03333 formamidade – fmd | 32 | 91 | 48 | 46,1/6,10 | 44,0/6,86 | 3 | 0,002 |

| | | | | | | | |
|---|----|-----|----|-----------|-----------|---|-------|
| PAAG_03333 formamidase – fmd | 33 | 135 | 49 | 46,1/6,10 | 43,8/7,06 | 4 | 0,020 |
| PABG_04154 glutamato desidrogenase NADP-especifica | 36 | 73 | 51 | 50,3/7,17 | 43,6/7,87 | 4 | 0,042 |
| PAAG_02859 adenosil homocisteinase – ahcy | 40 | 90 | 50 | 49,0/5,83 | 42,7/6,58 | 3 | 0,036 |
| PAAG_06506 aspartato aminotransferase – aat | 48 | 133 | 65 | 50,9/8,39 | 40,7/8,41 | | 0,019 |
| Metabolismo de nucleotídeos | | | | | | | |
| PAAG_03096 timina dioxigenase | 50 | 133 | 43 | 41,5/5,20 | 40,1/4,92 | | 0,001 |
| Transdução de sinal | | | | | | | |
| PAAG_06996 proteína RACK1– rack1 | 66 | 137 | 58 | 35,5/6,59 | 36,7/7,75 | 3 | 0,012 |
| Transporte celular | | | | | | | |
| PAAG_08973 tropomiosina 1 – tpm1 | 90 | 75 | 94 | 18,8/4,99 | 19,7/4,53 | | 0,008 |
| Transcrição | | | | | | | |
| PAAG_04814 proteína de ligação ao ácido nucléico – cnbp | 84 | 94 | 43 | 30,4/9,40 | 25,0/7,52 | | 0,024 |
| Proteínas não classificadas | | | | | | | |
| PAAG_08614 proteína hipotética conservada | 82 | 72 | 56 | 28,1/5,74 | 25,3/6,06 | | 0,008 |

^a**Categoria funcional** – baseado no banco de dados de categoria funcional MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/listSearch.html?order=entry>);

^b**Número de acesso/descrição da proteína** – número de acesso da proteína identificada no banco de dados do *P. brasiliensis*; (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html)

^c**Número do spot** – número do spot como descrito na Figura 13 (A-C);

^d**Probabilidade no Mascot** – probabilidade obtida da busca no Mascot;

^e**Cobertura de sequência** – porcentagem de cobertura de sequência do aminoácido em relação à proteína total identificada;

^f**Teo, MM/pi (kDa)** – massa molecular e pi teóricos calculados a partir da sequência de aminoácidos da proteína identificada;

^g**Exp, MM/pi (kDa)** – massa molecular e pi experimental obtidos dos géis 2-DE;

^h**Número de peptídeos encontrados (MS/MS)** – número de peptídeos correspondente às massas da proteína encontrada;

ⁱ**ANOVA** – teste de significância estatística para comparar as diferenças na expressão das proteínas entre as tres condições analisadas, Os valores da ANOVA são indicados (p < 0,05),

Tabela 4: Identificação das proteínas de *P. brasiliensis* com expressão preferencial na fase leveduriforme quando comparado com as fases de micélio e com a transição de micélio para levedura

| Categoria funcional ^a | Número de acesso/Descrição da proteína ^b | Número do spot ^c | Probabilidade no Mascot ^d | Cobertura de sequência % ^e | Teo, MM/pi ^f | Exp, MM/pi ^g | Número de peptídeos encontrados (MS/MS) ^h | Anova (p<0,05) ⁱ |
|---|---|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--|-----------------------------|
| Defesa celular e virulência | | | | | | | | |
| | PAAG_08059 proteína de choque térmico Hsp60 – hsp60 | 16 | 331 | 75 | 62,3/5,51 | 53,8 /4,91 | 9 | 0,027 |
| | PAAG_01339 proteína de choque térmico SSC1 – ssc1 | 39 | | | 73,8/5,92 | 42,7/5,75 | 4 | 0,000 |
| | proteína Y20 – y20 | 89 | 109 | 64 | 21,6/6,09 | 20,0/7,03 | 6 | 0,001 |
| Metabolismo de carboidrato | | | | | | | | |
| | PAAG_06473 manitol-1-fosfato 5-desidrogenase – mtld | 47 | 130 | 35 | 43,1/5,66 | 40,7/6,59 | 5 | 0,019 |
| Glicólise | | | | | | | | |
| | PAAG_07410 fosfoglicerato mutase independente de 2,3 – bifosfoglicerato – gpm | 12 | 109 | 52 | 57,3/5,37 | 54,7/5,42 | 5 | 0,019 |
| | PAAG_02869 fosfoglicerato quinase – pgk | 46 | 154 | 64 | 45,3/6,48 | 41,7/5,97 | 3 | 0,000 |
| | PAAG_01995 frutose 1,6- bisfosfato aldolase – fba | 57 | 78 | 49 | 39,8/6,14 | 38,2/6,90 | | 0,008 |
| | PAAG_01995 frutose 1,6- bisfosfato aldolase – fba | 58 | 168 | 60 | 39,8/6,14 | 38,6/7,15 | 4 | 0,000 |
| | PAAG_08468 gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase – gapdh | 63 | 246 | 77 | 36,6/8,26 | 37,1/9,13 | 5 | 0,002 |
| | PAAG_00403 álcool desidrogenase – adh2 | 60 | 217 | 78 | 38,0/7,55 | 37,8/8,66 | 8 | 0,000 |
| | PAAG_02585 triosefosfato isomerase – tpi | 81 | 183 | 75 | 27,2/5,39 | 26,1/5,54 | 6 | 0,031 |
| | PAAG_00403 álcool desidrogenase – adh2 | 59 | 111 | 75 | 38,0/7,55 | 38,1/8,40 | | 0,000 |
| Ciclo do ácido cítrico | | | | | | | | |
| | PAAG_05048 aconitase – aco | 4 | 86 | 19 | 79,2/6,49 | 72,9/7,72 | 6 | 0,013 |
| | PAAG_01463 succinil CoA ligase subunidade beta – sucla | 45 | 91 | 62 | 48,6/5,74 | 41,9/4,81 | 1 | 0,000 |
| Ciclo do glioxalato | | | | | | | | |
| | PAAG_06951 isocitrato liase – icl | 13 | 193 | 66 | 60,2/6,79 | 54,1/7,88 | | 0,038 |
| Metabolismo de lipídios | | | | | | | | |
| | PAAG_04559 2-metilcitrato desidratase – mcd | 21 | 99 | 41 | 62,3/8,55 | 46,6/7,57 | | 0,004 |
| | PAAG_03631 12-oxofitodienoato redutase | 44 | 294 | 69 | 43,2/8,69 | 41,2/9,45 | 5 | 0,000 |
| | PAAG_06309 enoil CoA hidratase – ech | 80 | 79 | 52 | 32,1/8,89 | 26,7/8,62 | | 0,006 |
| Síntese e endereçamento de proteínas | | | | | | | | |
| | PADG_05922 dipeptidase citosólica não específica | 20 | 142 | 55 | 53,6/5,35 | 47,2/5,51 | 6 | 0,010 |
| | PAAG_03556 fator de alongação 1-gamma 1 | 43 | 79 | 35 | 45,9/8,20 | 41,3/8,87 | | 0,029 |
| | PAAG_03334 peptidil-prolil cis-trans isomerase D – ppiD | 49 | 86 | 67 | 41,4/5,36 | 40,6/5,35 | | 0,000 |

| | | | | | | | |
|--|----|-----|----|-----------|-----------|---|-------|
| PAAG_03028 fator de alongação 1-beta | 70 | 89 | 65 | 25,9/4,78 | 35,1/4,45 | 2 | 0,012 |
| PAAG_02907 subunidade (Nas6) da partícula regulatória do proteassoma- rpn6 | 86 | 79 | 42 | 26,1/5,80 | 24,3/6,15 | | 0,036 |
| PAAG_00739 peptidil-prolil cis trans isomerase B – ppiB | 93 | 127 | 70 | 22,8/7,88 | 18,0/8,39 | 5 | 0,003 |
| Metabolismo de aminoácidos e de nitrogênio | | | | | | | |
| PAAG_07626 metionina sintase independente da cobalamina – metE | 2 | 254 | 61 | 87,3/6,28 | 77,2/7,69 | 3 | 0,005 |
| PAAG_08100 O-acetil homoserine (tiol)-liase | 41 | 161 | 72 | 47,1/6,24 | 42,0/7,31 | 5 | 0,009 |
| PAAG_01321 proteína da família oxidoreductase 2-nitropropano dioxigenase – nmo | 56 | 77 | 74 | 37,7/6,01 | 38,3/6,70 | 1 | 0,002 |
| PAAG_00966 L-treonina 3-desidrogenase – tdh | 55 | 130 | 75 | 38,1/5,86 | 38,1/6,33 | 3 | 0,008 |
| PAAG_04966 provável proteína da família nitrilase | 74 | 121 | 78 | 32,6/7,70 | 33,0/8,61 | 6 | 0,001 |
| Metabolismo de fosfato | | | | | | | |
| PAAG_00657 pirofosfatase inorgânica – PPases | 68 | 196 | 77 | 33,6/5,13 | 36,1/4,77 | 4 | 0,004 |
| Metabolismo de nucleotídeos | | | | | | | |
| PAAG_04291 nucleosídeo difosfato quinase | 96 | 153 | 57 | 16,8/6,84 | 14,5/6,99 | 2 | - |
| Transcrição | | | | | | | |
| PAAG_04814 proteína de ligação ao ácido nucléico – cnpb | 83 | 214 | 51 | 30,4/9,40 | 25,0/6,80 | 6 | 0,022 |
| Ciclo celular | | | | | | | |
| PAAG_04042 septina – sept1 | 37 | 86 | 52 | 44,2/5,25 | 43,1/5,20 | | 0,019 |

^a**Categoria funcional** – baseado no banco de dados de categoria funcional MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/listSearch.html?order=entry>);

^b**Número de acesso/descrição da proteína** – número de acesso da proteína identificada no banco de dados do *P. brasiliensis*; (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html)

^c**Número do spot** – número do spot como descrito na Figura 13 (A-C);

^d**Probabilidade no Mascot** – probabilidade obtida da busca no Mascot;

^e**Cobertura de sequência** – porcentagem de cobertura de sequência do aminoácido em relação à proteína total identificada;

^f**Teo, MM/pl (kDa)** – massa molecular e pl teóricos calculados a partir da sequência de aminoácidos da proteína identificada;

^g**Exp, MM/pl (kDa)** – massa molecular e pl experimental obtidos dos géis 2-DE;

^h**Número de peptídeos encontrados (MS/MS)** – número de peptídeos correspondente às massas da proteína encontrada;

ⁱ**ANOVA** – teste de significância estatística para comparar as diferenças na expressão das proteínas entre as três condições analisadas. Os valores da ANOVA são indicados ($p < 0,05$),

Tabela 5 - Identificação das proteínas constitutivas de *P. brasiliensis* quando comparadas com as fases de micélio, transição de micélio para levedura e com levedura

| Categoria funcional ^a | Número de acesso/Descrição da proteína ^b | Número do spot ^c | Probabilidade no Mascot ^d | Cobertura de sequência % ^e | Teo, MM/pi ^f | Exp, MM/pi ^g | Número de peptídeos encontrados (MS/MS) ^h | Anova (p<0,05) ⁱ |
|---|---|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--|-----------------------------|
| Defesa celular e virulência | | | | | | | | |
| | PAAG_05292 glutaciona redutase – gsh | 24 | 110 | 46 | 52,0/6,74 | 45,6/8,33 | | 0,979 |
| | PAAG_02364 tioredoxina – trx | 99 | 76 | 92 | 12,9/5,24 | 12,2/5,19 | | 0,259 |
| | PAAG_05142 proteína mitocondrial de choque térmico 10 kDa | 100 | 120 | 71 | 11,2/8,79 | 12,0/9,73 | 4 | 0,096 |
| | PAAG_08003 proteína hsp70 – hsp70 | 6 | 193 | 61 | 70,9/5,08 | 67,0/4,79 | | 0,783 |
| Metabolismo de carboidrato | | | | | | | | |
| | PAAG_04166 transaldolase – tal | 65 | 151 | 48 | 35,8/6,47 | 36,9/7,58 | 7 | 0,154 |
| | PAAG_04181 proteína de utilização de sorbitol – sou2 | 75 | 84 | 37 | 31,5/7,05 | 32,0/8,07 | | 0,806 |
| Glicólise | | | | | | | | |
| | PAAG_00771 enolase – eno | 30 | 141 | 63 | 47,4/5,67 | 44,2/5,98 | 7 | 0,175 |
| | PAAG_00771 enolase – eno | 31 | 137 | 57 | 47,4/5,67 | 44,0/6,21 | 6 | 0,745 |
| | PAAG_02869 fosfoglicerato quinase – pgk | 42 | 222 | 71 | 45,3/6,48 | 41,9/7,57 | 4 | 0,069 |
| | PAAG_08468 gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase – gapdh | 62 | 234 | 89 | 36,6/8,26 | 37,1/8,80 | 7 | 0,081 |
| Ciclo do ácido cítrico | | | | | | | | |
| | PAAG_08075 citrato sintase – cita | 38 | 82 | 45 | 52,2/8,75 | 42,9/8,31 | | 0,075 |
| | PAAG_08449 malato desidrogenase – mdh2 | 69 | 176 | 83 | 34,7/6,36 | 35,6/7,62 | | 0,907 |
| Metabolismo de aminoácidos | | | | | | | | |
| | PAAG_03045 aminometiltransferase – amt | 34 | 71 | 42 | 53,2/9,59 | 43,8/8,46 | | 0,145 |
| Síntese e endereçamento de proteínas | | | | | | | | |
| | PAAG_02111 proteína ribossomal S0 40S– rps0 | 54 | 72 | 53 | 32,1/4,84 | 38,7/4,56 | | 0,158 |
| Metabolismo de nucleotídeos | | | | | | | | |
| | PAAG_04291 nucleosídeo difosfato quinase | 95 | 80 | 57 | 16,9/6,84 | 16,0/7,82 | 5 | 0,104 |
| Transdução de sinal | | | | | | | | |
| | PAAG_06344 rab inibidor de dissociação de GDP– rdi1 | 14 | 87 | 57 | 52,5/5,44 | 54,1/8,54 | | 0,425 |
| Proteínas não classificadas | | | | | | | | |
| | PAAG_07772 proteína hipotética conservada | 87 | 75 | 53 | 23,6/6,21 | 22,6/6,79 | | 0,208 |
| | PABG_01179 proteína hipotética conservada | 97 | 74 | 78 | 13,7/5,87 | 13,9/5,82 | | 0,457 |
| | PAAG_07296 provável proteína de ligação ao ssDNA | 98 | 140 | 64 | 15,0/10,06 | 12,4/9,34 | 4 | 0,959 |

^a**Categoria funcional** – baseado no banco de dados de categoria funcional MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/listSearch.html?order=entry>);

^b**Número de acesso/descrição da proteína** – número de acesso da proteína identificada no banco de dados do *P. brasiliensis*; (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html)

^c**Número do spot** – número do spot como descrito na Figura 13 (A-C);

^d**Probabilidade no Mascot** – probabilidade obtida da busca no Mascot;

^e**Cobertura de sequência** – porcentagem de cobertura de sequência do aminoácido em relação à proteína total identificada;

^f**Teo, MM/pI (kDa)** – massa molecular e pI teóricos calculados a partir da sequência de aminoácidos da proteína identificada;

^g**Exp, MM/pI (kDa)** – massa molecular e pI experimental obtidos dos géis 2-DE;

^h**Número de peptídeos encontrados (MS/MS)** – número de peptídeos correspondente às massas da proteína encontrada;

ⁱ**ANOVA** – teste de significância estatística para comparar as diferenças na expressão das proteínas entre as três condições analisadas, Os valores da ANOVA são indicados ($p < 0,05$),

5.5 – Localização subcelular

Foi utilizado o programa WoLF pSort (Horton et al., 2007) para definição *in silico* da localização subcelular de proteínas (Figura 9). A maior porcentagem das proteínas identificadas foi definida pelas análises *in silico* com provável localização citoplasmática (66,7%), Localizações em diferentes compartimentos celulares tais como mitocôndria (22,2%), núcleo (2%), citoesqueleto (3%), peroxissomo (2%), retículo endoplasmático (1%) e proteínas extracelulares (4%), foram preditos.

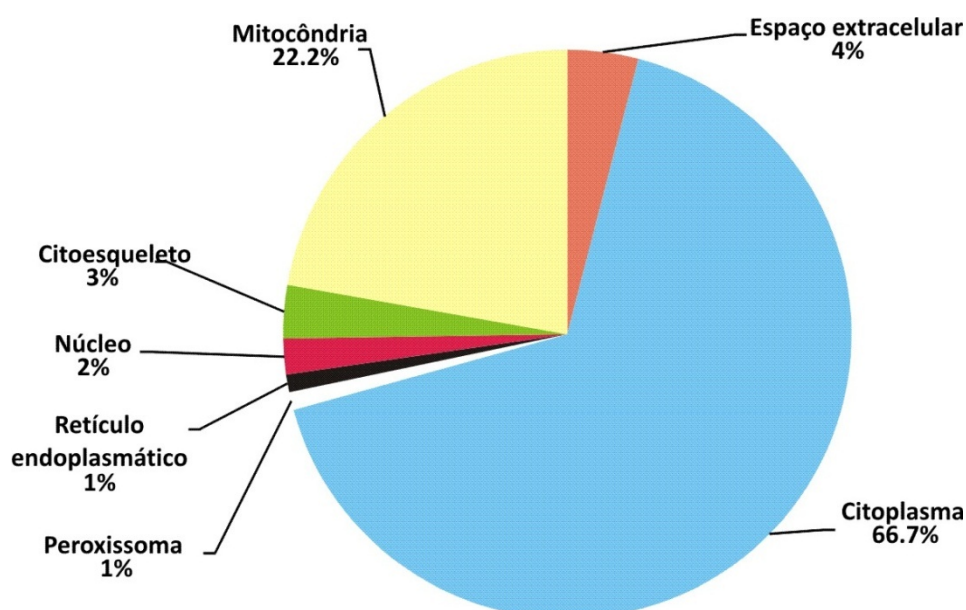
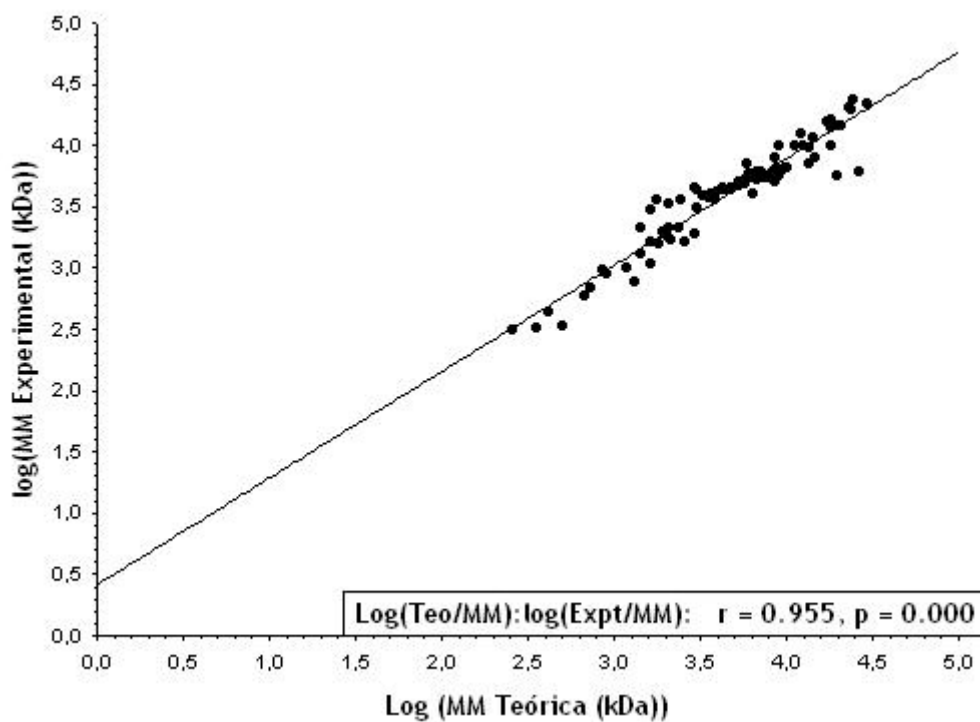


Figura 9 – Análises *in silico* da localização subcelular das proteínas de *P. brasiliensis*

5.6 – Correlação entre valores experimentais e teóricos

Os resultados obtidos após análises no programa Mascot mostraram que a massa molecular e o *pI* teóricos estão em concordância com os valores encontrados nos géis 2-D, mas algumas proteínas apresentaram pequenos desvios no gel 2-D. Esses desvios podem ser devido à técnica ou devidas às modificações pós-traducionais. Foram realizados testes de correlação entre os valores teóricos e experimentais de massas moleculares e entre os valores teóricos e experimentais de *pI*. Notamos que a correlação estatística da massa molecular foi maior (Pearson $r = 0,995$; $p < 0,001$) do que a correlação de *pI* (Pearson $r = 0,852$; $p < 0,001$) (Figura 10). A baixa correlação entre os valores teóricos e experimentais de *pI* pode ser devida a ocorrência de modificações pós-traducionais (MPTs) (Halligan et al., 2004; Charneau et al., 2007).

(A)



(B)

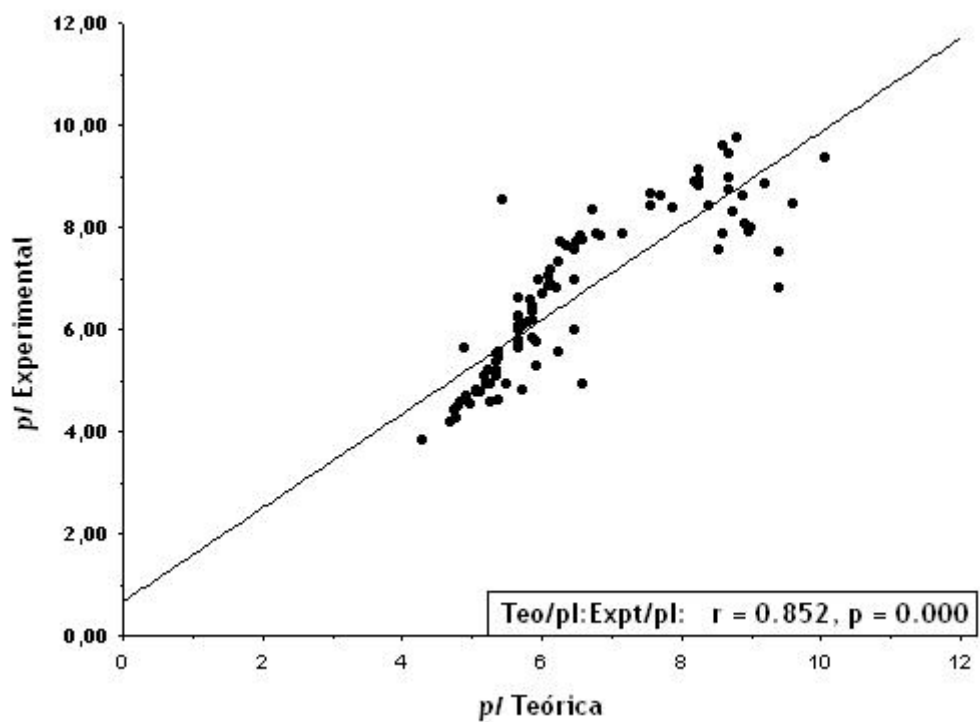


Figura 10 – Gráfico de correlação entre a massa molecular experimental e teórica (A) e entre o *pI* experimental e teórico (B). Os valores foram obtidos pela média dos nove géis das três condições estudadas. Os valores da correlação foram: Pearson $r = 0,995$; $p < 0,001$ para os valores da massa molecular (kDa) e Pearson $r = 0,852$; $p < 0,001$ para os valores de *pI*.

5.7 – Proteínas do fungo *P. brasiliensis* preferencialmente expressas na fase de micélio

Com a espectrometria de massa foi possível identificar-se 100 proteínas/isoformas, sendo 81 com expressão preferencial em uma das três condições analisadas nesse estudo, e 19 proteínas/isoformas não tiveram diferença de expressão com significância estatística. Com relação à fase miceliana, 18 proteínas/isoformas foram identificadas como diferencialmente expressas (Tabela 2), sendo que 12 proteínas/isoformas foram confirmadas por MS/MS, com *score* variando de 50 a 177 para MS e de 51 a 283 para MS/MS. Todas as proteínas identificadas foram submetidas à classificação funcional (MIPS) e agrupadas nas categorias de defesa celular e virulência, metabolismo de carboidrato, energia, metabolismo de aminoácido, síntese e endereçamento de proteínas, tradução de sinal, organização e ciclo celular. As proteínas envolvidas na resposta ao estresse celular, manganês-superóxido dismutase (Mn-SOD) e peroxiredoxina PRX1, estão entre as proteínas preferencialmente expressas em micélio, Isoformas foram identificadas na análise de proteínas diferenciais da fase miceliana, tais como aldeído desidrogenase (*spots* 22 e 23), e uma proteína hipotética nos *spots* 91 e 92. Enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e proteínas relacionadas às vias de transdução de sinal apresentaram expressão preferencial em micélio. A Figura 11 apresenta regiões dos géis de micélio, transição e levedura indicando alguns *spots* identificados com expressão preferencial em micélio, de acordo com a Tabela 2.

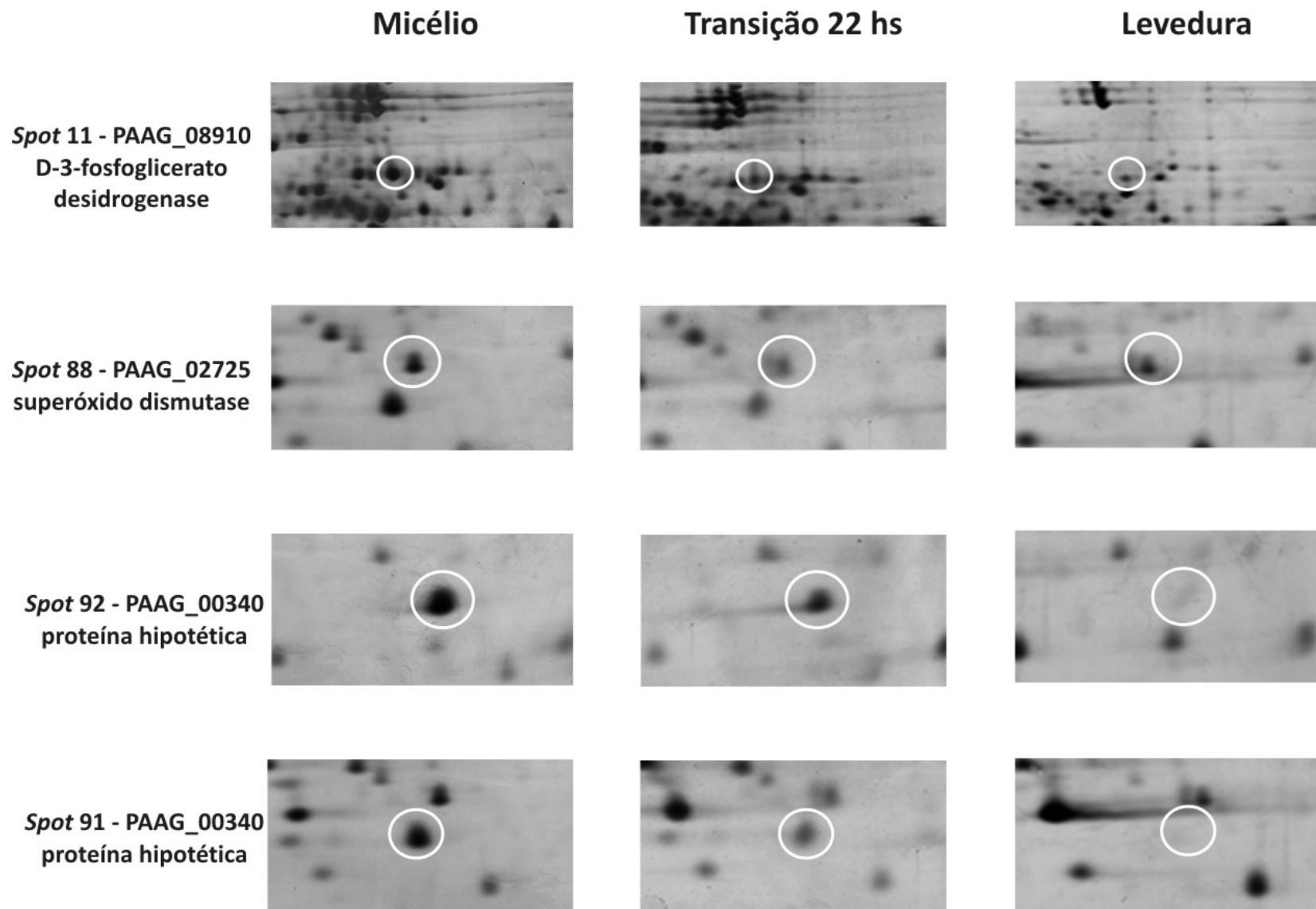


Figura 11 – Ampliação da área dos *spots* mostrando as diferenças na expressão da proteína entre as três condições analisadas: micélio, transição de micélio para levedura e levedura. Os *spots* representando cada proteína estão circulos em branco. O nome da proteína, o número do spot e o número de acesso no genoma estrutural de *P. brasiliensis* estão indicados à esquerda da Figura.

5.8 – Proteínas do fungo *P. brasiliensis* preferencialmente expressas na transição de micélio para levedura

As proteínas de *P. brasiliensis* com expressão preferencial durante a transição de micélio para levedura são mostradas na Tabela 3. Das 30 proteínas/isoformas identificadas, 19 foram confirmadas com 3 a 11 peptídeos por MS/MS. Os valores dos *scores* variaram de 72 a 317 para MS e de 49 a 468 para MS/MS. HSPs são induzidas após a mudança de temperatura (*spots* 1, 3, 5, 8, 9 e 15). Algumas enzimas da via glicolítica como a enolase e a fosfoglicomutase são mais abundantes durante o processo de transição. Enzimas envolvidas na via da pentose fosfato foram também mais abundantes durante a transição, em comparação a micélio e levedura. Ressalte-se ainda a expressão mais abundante de algumas enzimas envolvidas fosforilação oxidativa. A Figura 12 apresenta regiões dos géis de micélio, transição e levedura indicando alguns *spots* identificados com expressão preferencial durante a transição morfológica, de acordo com a Tabela 3.

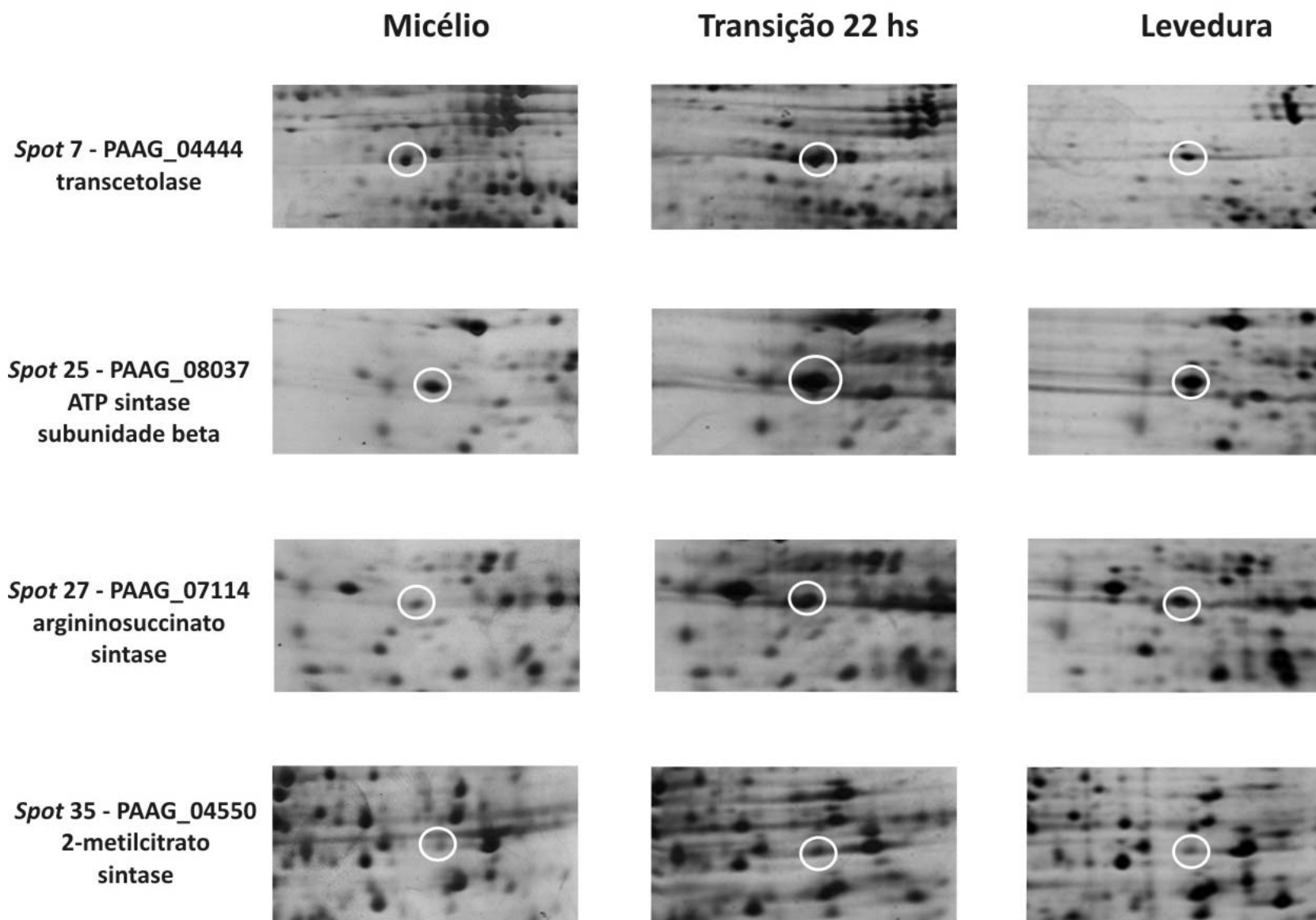


Figura 12 – Ampliação da área dos *spots* mostrando as diferenças na expressão da proteína entre as três condições analisadas: micélio, transição de micélio para levedura e levedura. Os *spots* representando cada proteína estão circulos em branco. O nome da proteína, o número do spot e o número de acesso no genoma estrutural de *P. brasiliensis* estão indicados à esquerda da Figura.

5.9 – Proteínas do fungo *P. brasiliensis* preferencialmente expressas na fase de levedura

Como demonstrado na Tabela 4, foi possível a identificação de 32 proteínas/ isoformas cuja expressão foi maior na fase leveduriforme. Os scores obtidos foram de 77 a 331 para MS e de 50 a 310 para MS/MS e 20 proteínas/isoformas foram confirmadas por MS/MS. Várias enzimas da via glicolítica, como fosfoglicomutase, fosfoglicerato quinase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, triosefosfato isomerase e frutose-1,6-bifosfato aldolase são preferencialmente expressas na fase leveduriforme. Uma isoforma da enzima álcool desidrogenase (ADH2) foi mais expressa na fase leveduriforme. Algumas enzimas do metabolismo de lipídeos foram induzidas na fase leveduriforme, como metilcitrato desidratase, enoil-CoA hidratase e a 12-oxofitodienoato redutase. Aconitase e succinyl CoA ligase, enzimas do ciclo de Krebs, assim como isocitrato liase, membro do ciclo do glioxilato, foram mais expressas na fase leveduriforme do fungo. Outras proteínas classificadas como defesa celular e virulência e identificadas como mais expressas na fase leveduriforme incluem: uma proteína homologa à flavodoxina, a Y20 e proteínas de choque térmico, tais como Hsp60 e SSC1. A Figura 13 apresenta regiões dos géis de micélio, transição e levedura indicando alguns *spots* identificados com expressão preferencial em levedura, de acordo com a Tabela 4.

Uma análise detalhada das funções biológicas das proteínas identificadas nos permitiu reconstruir as vias metabólicas que estão esquematizadas na Figura 14.

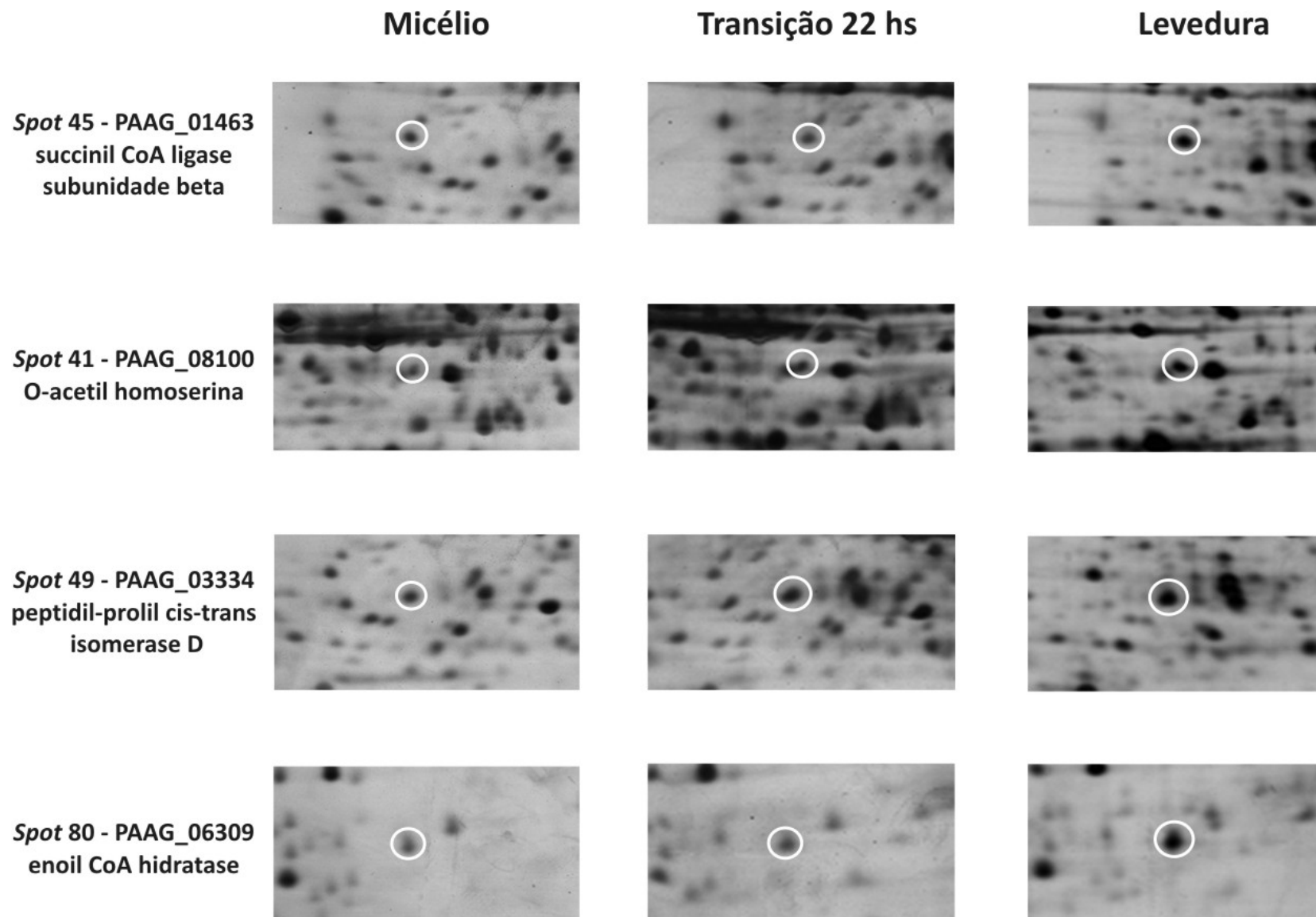


Figura 13 – Ampliação das regiões dos géis que mostram as diferenças na expressão da proteína entre as três condições analisadas: micélio, transição e levedura, Os spots representando cada proteína estão circulado em branco. O nome da proteína, o número do spot e o número de acesso no genoma estrutural de *P. brasiliensis* estão indicados à esquerda da Figura.

5.10 – Proteínas do fungo *P. brasiliensis* constitutivamente expressas nas condições analisadas

Dentre as proteínas/isoformas analisadas, dezenove não apresentaram diferença de expressão com significância estatística (ANOVA; $p > 0,05$) entre as três condições estudadas (Tabela 5). A cobertura de sequência foi de 42 a 92% e *score* no Mascot variando de 71 a 234 para MS e de 120 a 289 para MS/MS. Entre as proteínas com expressão constitutiva destacam-se isoformas de moléculas diferencialmente expressas em fases morfológicas do fungo tais como HSP70, enolase e transaldolase.

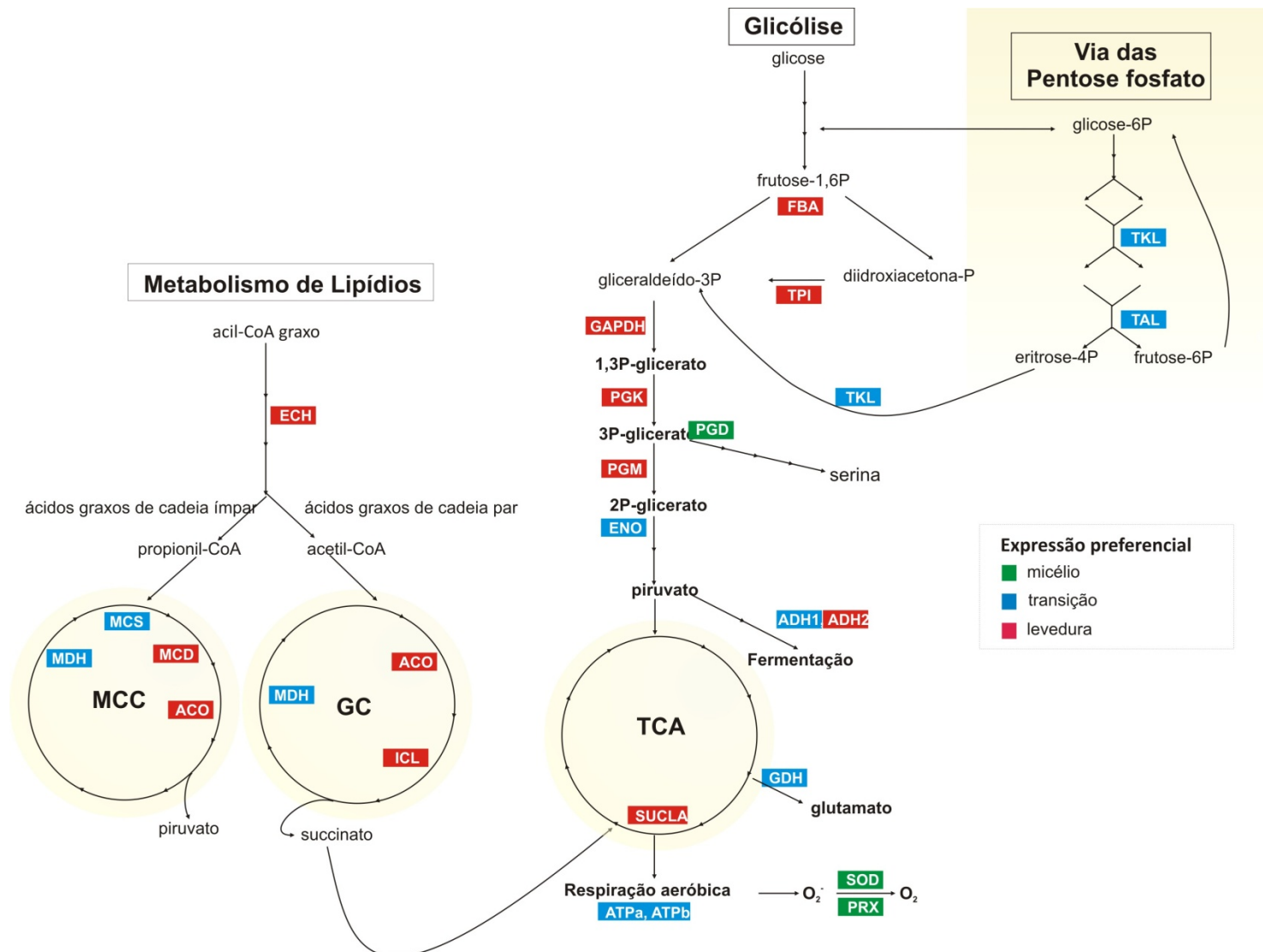


Figura 14 – Modelo proposto para as alterações metabólicas que ocorrem durante a transição de micélio para levedura. A expressão diferencial das proteínas é indicada pelas cores, verde, azul ou vermelha, indicando que são mais abundantes em micélio, transição de micélio para levedura e levedura, respectivamente. As vias metabólicas esquematizadas acima são baseadas nas vias disponíveis no banco de dados KEGG, **CAT** – ciclo do ácido tricarbóxico; **MCC** – ciclo do metilcitrato; **GC** – ciclo do glioxalato. As enzimas hiper reguladas são: **ACO** – Aconitase; **ADH1** – álcool desidrogenase 1; **ADH2** – álcool desidrogenase 2; **FBA** – frutose bifosfato 1,6-aldolase; **ECH** – enoil-CoA hidratase; **ENO** – enolase; **GAPDH** – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; **GDH** – glutamato desidrogenase; **ICL** – isocitrato liase; **MCD** – metilcitrato desidrogenase; **MCS** – metilcitrato sintase; **MDH** – malato desidrogenase; **PGD** – 3 – fosfoglicerato desidrogenase; **PGK** – fosfoglicerato quinase; **PGL** – fosfoglicomutase; **PGM** – fosfoglicerato mutase; **PRX** – peroxirredoxina mitocondrial; **SOD** – Mn superóxido dismutase; **SUCLA** – succinil-CoA ligase; **TAL** – transaldolase; **TKL** – transcetolase; **TPI** – triose fosfato isomerase; **ATPa** – ATPase subunidade alfa; **ATPb** – ATPase subunidade beta.

5.11 – Modificações pós-traducionais (MPTs): análises de acetilação, oxidação e fosforilação,

Nesse estudo foram identificados 34 spots de proteínas que são representados por mais de uma isoforma com diferentes massas moleculares (MMs) e *PIS*. Essas isoformas geralmente originam-se de modificações pós-transducionais (MPTs) como fosforilação, glicosilação, acetilação, acilação, ubiquitinação ou clivagem proteolítica (Görg et al., 2004). Para investigar as MPTs, foram selecionados os espectros MS da proteína de interesse e realizadas as buscas no MASCOT com adição de algumas modificações variáveis, como: oxidação de histidina/triptofano (HW), acetilação de lisina (K) e fosforilação de serina/tirosina/treonina (S-T-Y). As análises indicaram um aumento na cobertura de sequência das proteínas e dos valores de massas encontradas (Tabelas 6 e 7). Os resultados mostraram que muitas isoformas seriam decorrentes de MPTs, especificamente fosforilação de serina/tirosina/triptofano bem como a acetilação de lisina.

Tabela 6 – Predição das modificações pós-traducionais das isoformas das proteínas identificadas

| Descrição da proteína | Número de acesso | Número do spot | Expressão preferencial* | Teo, MM (kDa)/pI | Exp, MM (kDa)/pI | MPTs† | Cobertura de sequência % | Nº de massas encontradas |
|-----------------------------|------------------|----------------|-------------------------|------------------|------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| proteína hsp70 | PAAG_08003 | 9 | T | 70,9/5,08 | 63,4/4,75 | - acet(k) | 57 69 | 39 51 |
| | | 6 | C | 70,9/5,08 | 67,0/4,79 | - fosfo (S-T) | 54 66 | 36 45 |
| | | 28 | T | 47,4/5,67 | 44,1/5,64 | - fosfo (S-T) | 66 71 | 24 39 |
| enolase | PAAG_00771 | 29 | T | 47,4/5,67 | 44,1/5,79 | - fosfo (Y) | 63 68 | 24 32 |
| | | 30 | C | 47,4/5,67 | 44,2/5,98 | - acet(k) | 63 66 | 23 28 |
| | | 31 | C | 47,4/5,67 | 44,0/6,21 | - acet(k) | 57 64 | 21 27 |
| | | 46 | L | 45,3/6,48 | 41,7/5,97 | - fosfo (Y) | 64 80 | 27 44 |
| fosfoglicerato quinase | PAAG_02869 | 63 | L | 36,6/8,26 | 37,1/9,13 | - fosfo (S-T) | 77 85 | 27 31 |
| | | 62 | C | 36,6/8,26 | 37,1/8,80 | - fosfo (S-T) | 89 93 | 29 35 |
| formamidase | PAAG_03333 | 32 | T | 46,1/6,10 | 44,0/6,86 | - acetyl (k) | 48 57 | 17 22 |
| | | 53 | M | 41,4/5,36 | 39,2/5,20 | - acet(k)+phospo (S-T) | 68 72 | 22 32 |
| ATP sintase subunidade alfa | PAAG_04820 | 18 | T | 51,0/8,67 | 49,2/8,98 | - phospo(Y) acet(k) | 55 62 57 | 26 30 46 |
| | | 8 | T | 73,8/5,92 | 64,0/5,28 | - phospo(S-T) | 65 69 | 41 50 |

*Expressão preferencial em: micélio (M), transição (T) e levedura (L); C: proteínas constitutivas;

†MPTs – modificações pós-transducionais: acet (K) – acetilação de lisina; fosfo (S-T-Y) – fosforilação de serina, treonina e tirosina;

Valores obtidos na busca pelo MASCOT utilizando-se modificações variáveis.

Tabela 7 – identificação dos espectros das modificações pós-traducionais das isoformas das proteínas identificadas

| Descrição da proteína | Número do spot | MPTs† | Sequência do peptídeo | Localização do peptídeo§ | Massa teórica* | Massa obtida# |
|--|----------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------|---------------|
| Proteína hsp70 | 9 | acet(K) | TTPSFVAFTDTERLIGDAAK | 35-54 | 2139,08 | 2181,09 |
| | | acet(K) | QFTPEEISSMVLTK | 111-124 | 1608,81 | 1650,82 |
| | | acet(K) | DNNLLGKFELTGIPPAPR | 451-468 | 1951,05 | 1993,06 |
| | | acet(K) | ELESVANPIMMK | 597-608 | 1360,67 | 1402,68 |
| | 6 | fosfo (S-T) | IQKLVSDFFNGK | 344-355 | 1394,76 | 1474,72 |
| | | fosfo (S-T) | TEIDKTVSWLDENQTATK | 571-588 | 2078,02 | 2397,88 |
| Enolase | 28 | fosfo (S-T) | SKWLTYEQLADLYK | 272-285 | 1756,90 | 1836,86 |
| | 29 | 2 fosfo (Y) | WLTYEQLADLYK | 274-285 | 1541,78 | 1701,70 |
| | 30 | acet(K) | SKWLTYEQLADLYK | 272-285 | 1756,90 | 1798,91 |
| | | acet(K) | WLTYEQLADLYK | 274-285 | 1541,78 | 1583,78 |
| | 31 | acet(K) | SKWLTYEQLADLYK | 272-285 | 1756,90 | 1798,91 |
| Fosfoglicerato quinase | 46 | fosfo (Y) | KQLTTLGDIYINDAFGTAHR | 152-171 | 2233,15 | 2313,11 |
| | | fosfo (Y) | KELEYFAK | 192-199 | 1026,54 | 1106,50 |
| GAPDH | 63 | fosfo (S-T) | VIISAPSADAPMFVMGVNEK | 119-138 | 2075,04 | 2155,00 |
| | | fosfo (S-T) | VIISAPSADAPMFVMGVNEK | 119-138 | 2075,04 | 2155,00 |
| GAPDH | 62 | 2 fosfo (S-T) | VIISAPSADAPMFVMGVNEK | 119-138 | 2075,04 | 2234,97 |
| | | fosfo (S-T) | GILGYSEDALVSTDLDNGDPR | 272-291 | 2091,01 | 2170,97 |
| Formamidase | 32 | acet(K) | VVAKPPEPINVHAGSASDAIKAK | 188-210 | 2340,28 | 2298,27 |
| Peptidil-prolil-cis-trans isomerase D | 53 | acet(K) + 2 fosfo (S-T) | RFDDAQTWAGFALETATAAQAK | 284-305 | 2368,14 | 2570,08 |
| ATP sintase cadeia alfa | 18 | 2 fosfo (Y) | EAYPGDVFYLHSRLLER | 338-354 | 2064,04 | 2223,97 |
| | | acet(K) | WNDTGDETK | 235-243 | 1064,44 | 1106,45 |
| Proteína de choque | 8 | fosfo (S-T) | SSSRSSAYK | 20-28 | 971,47 | 1051,43 |

| | | | | | |
|---------------------|---------------|--------------------|---------|---------|---------|
| térmico SSC1 | 2 fosfo (S-T) | YSPSQIGGFVLQK | 157-169 | 1422,75 | 1582,68 |
| | 2 fosfo (S-T) | AAIEAANRADSVLNDTEK | 573-590 | 1886,93 | 2046,86 |

†MPTs – Modificações pós-traducionais: acet(K) – acetilação de lisina; fosfo (S-T-Y) – fosforilação de serina, treonina e tirosina;

§ Localização do peptídeo na sequência da proteína;

*Massa molecular teórica sem qualquer MPT;

#Massa experimental obtida nas análises dos espectros.

5.12 – Análises de transcritos por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)

Para análise de possível correlação entre os perfis protéicos e padrões transcricionais, foram realizadas análises de expressão de transcritos selecionados, cDNAs foram sintetizados e a quantidade de transcritos foi analisada por qRT-PCR, com oligonucleotídeos amplificadores específicos. Foram investigados perfis de expressão de genes nos estágios de micélio e levedura, assim como durante a transição de micélio e conídios para levedura. A Figura 15 apresenta uma visão morfológica do processo de transição dimórfica de micélio para levedura e de conídio-levedura. Como pode ser observado, após 22 h de transição de micélio para levedura verifica-se a presença de células com morfologia arredondada, padrão similar verificado para a transição conídio-levedura, (Figura 15, painéis A e B, respectivamente).

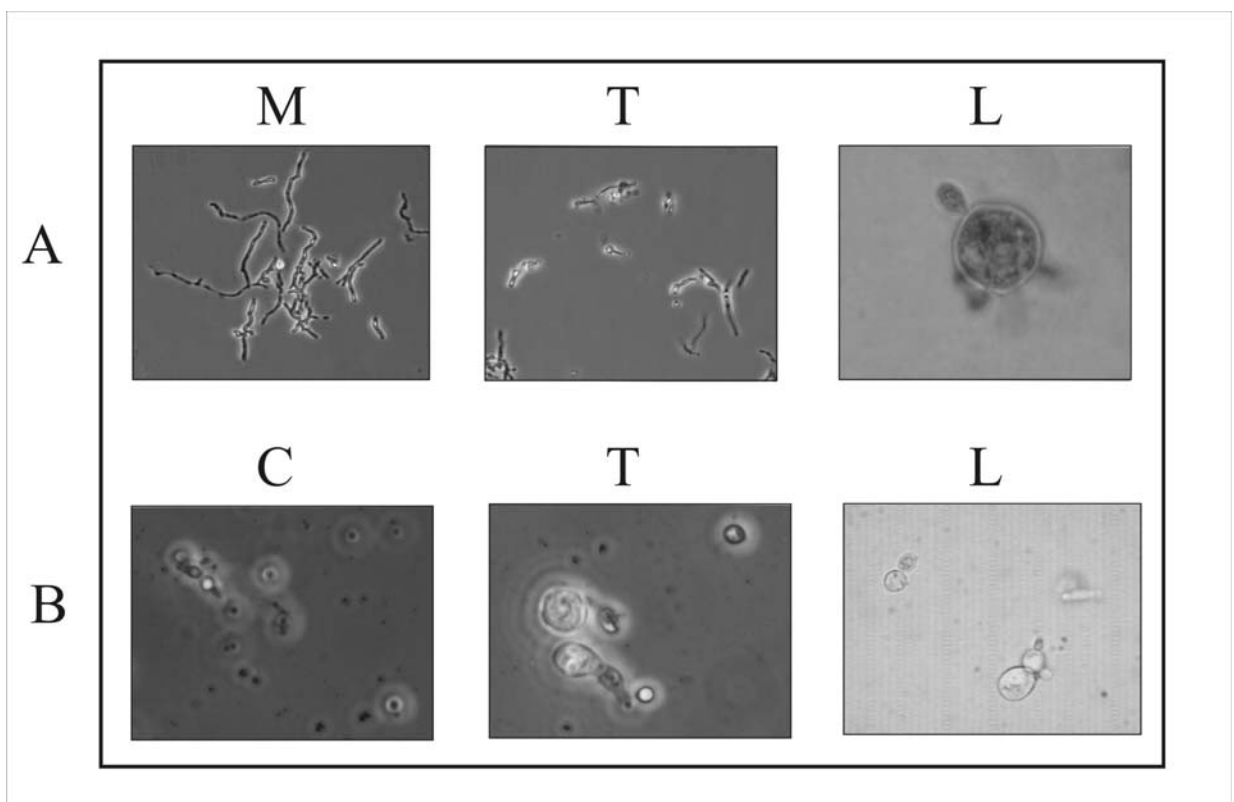


Figura 15 – Transição dimórfica em *P. brasiliensis*, Micélio após crescimento – 22 °C por 5 dias (M) foi transferido para a temperatura de 36 °C durante 22 h (T) e 15 dias (L), (B) – Conídios foram obtidos (C) e transferidos para 36 °C por 22 h (T) e 15 dias (L), As imagens foram obtidas em microscópio (Eclipse TE 2000S, NIKON), com uma ampliação de 40x.

A comparação entre os níveis de mRNA e de proteínas foi realizado por qRT-PCR de cinco genes selecionados, como demonstrado na Figura 16 painéis I e II, respectivamente.

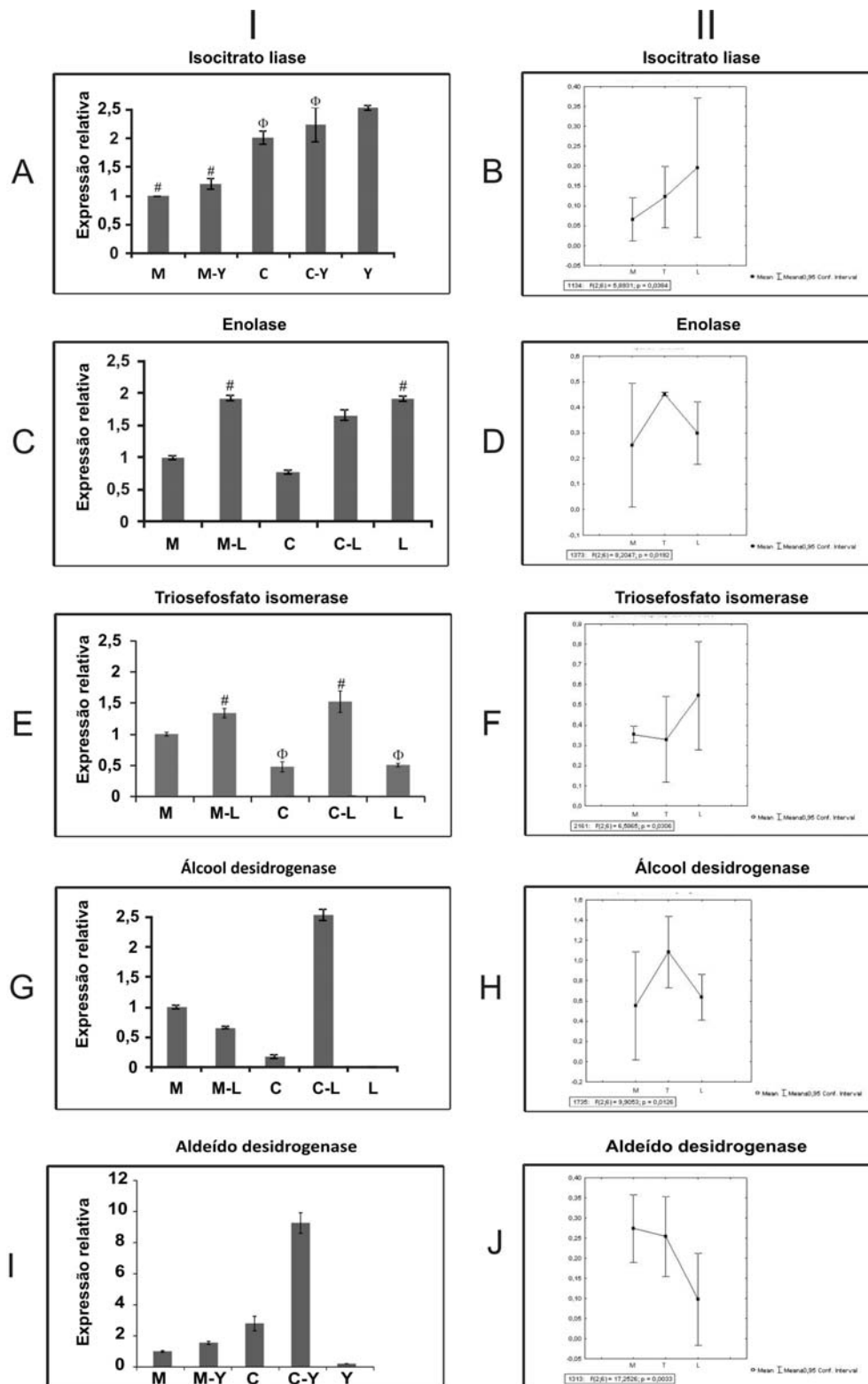


Figura 16 – (I) Análises de transcritos por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR). Análises de qRT-PCR foram realizadas com RNAs derivados de micélio (M), transição de micélio para leveduras (T), conídio (C), transição conídio-leveduras (C-L) e leveduras (L). Transcritos codificando para isocitrato liase, enolase, triosefosfato isomerase, álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase foram analisados. As reações foram realizadas em triplicatas. Para a normalização de cada transcrito foi utilizado o gene codificante de tubulina alfa. A barra de erros indica o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicatas. Os dados foram analisados estatisticamente por one-way ANOVA e comparações múltiplas do teste de Tukey. Os símbolos indicam ausência de diferença de expressão com significância estatística ($p < 0,05$) entre as amostras. **(II) – Níveis de expressão das proteínas com a variação da porcentagem de volume dos spots em micélio (M), transição de micélio para levedura após 22 h (T) e levedura (L).** A média das três replicatas biológicas do experimento e o teste one-way ANOVA ($p < 0,05$) são mostrados.

Os níveis dos transcritos codificantes da isocitrato liase (Figura 16A) são correlacionados com os níveis da proteína, com um aumento da expressão na fase leveduriforme (Figura 16B). Os níveis dos transcritos da enolase (Figura 16C) na transição de micélio para levedura e na transição de conídio para levedura também são correlacionados com o aumento da expressão da proteína, como demonstrado por análises proteômicas (Figura 16D). Com relação à triosefosfato isomerase, o transcrito foi mais abundante durante a transição de micélio para levedura e durante a transição de conídio para levedura (Figura 16E); análises proteômicas mostraram expressão preferencial em levedura (Figura 16F). Os níveis dos transcritos codificante para álcool desidrogenase aumentaram principalmente na transição de conídio para levedura (Figura 16G). Os transcrito codificante para aldeído desidrogenase mostrou uma maior expressão em micélio, comparado com levedura, o que também é correlacionado com as análises proteômicas (Figura 16H), embora um significativo aumento na expressão do transcrito foi observado durante a transição de conídio para levedura.

5.13 – Análises por *Western blotting*

Para corroborar a abundância de algumas proteínas identificadas, análises de *Western blot* foram realizadas com seis proteínas do *P. brasiliensis*, no qual extratos de micélio, transição de micélio para levedura e de levedura foram utilizados (Figura 17). Como demonstrado por análises de *Western blot*, a expressão das enzimas triosefosfato isomerase, frutose 1,6-bifosfato aldolase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, aconitase e enolase corroboram as análises proteômicas.

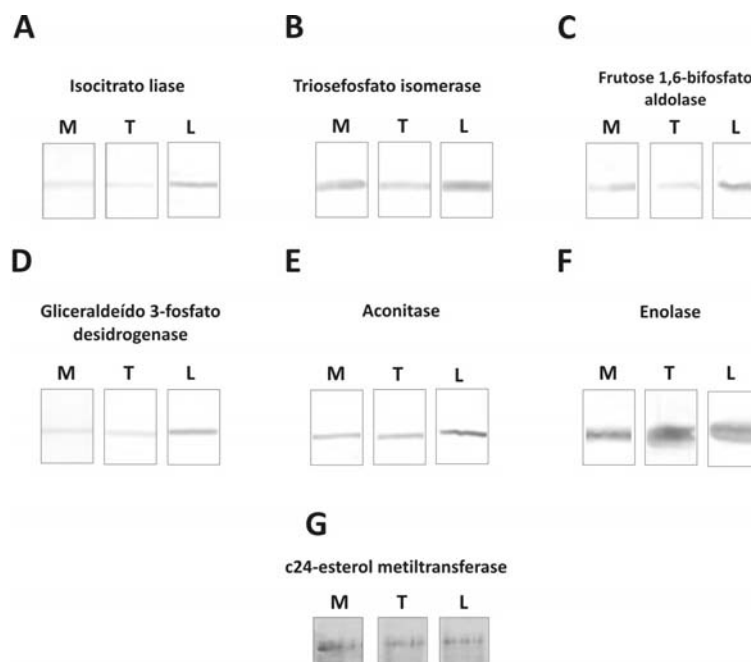


Figura 17 – Análises por *Western blotting*. (A) – Um total de 30 µg de proteínas extraídas de micélio (M), transição de micélio para levedura após 22 h (T) e de levedura (Y) foram fracionadas por SDS-PAGE (12%) e transferidas para membrana de nitrocelulose. Extratos de proteínas de M, T and L após a reação com anticorpo policlonal anti- isocitrato liase (ICL), triosefosfato isomerase (TPI), frutose 1,6-bifosfato aldolase (FBA), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), aconitase (ACO) e enolase (ENO). A proteína c24-esterol metiltransferase foi utilizada como controle da reação. As bandas reativas reagiram com anticorpos policlonais de camundongos ou de coelho acoplados à fosfatase alcalina e reveladas com BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) e NBT (nitro azul de tetrazol).

Discussão 6

***“Não siga a estrada, apenas;
ao contrário, vá por onde não haja
estrada e deixe uma trilha”***

Ralph Waldo Emerson

VI – DISCUSSÃO

O nosso objetivo foi investigar possíveis alterações no proteoma de *P. brasiliensis* nas diferentes fases de desenvolvimento. Abaixo estão discutidas as principais alterações detectadas por análises proteômicas durante as fases de transição do fungo.

6.1 – Proteínas com expressão preferencial em micélio

A formação de intermediários reativos de nitrogênio (RNI) e oxigênio (ROI) é um dos mais importantes mecanismos de defesa contra os microorganismos e constitui um dos principais fatores de virulência entre as espécies resistentes aos ROS (espécies reativas ao oxigênio) (Nathan and Shiloh, 2000). Nesse estudo, foram identificadas duas proteínas antioxidantes de defesa contra os ROS, a Mn superóxido dismutase (MnSOD) e a peroxiredoxina mitocondrial PRX1, ambas abundantes na fase miceliana. Em células eucarióticas, a MnSOD é sintetizada no citosol e depois transportado para as mitocôndrias. Como os RNI e ROI são produzidos por células aeróbicas, a identificação dessas duas enzimas na fase de micélio é consistente com os dados de Felipe (2005) e Nunes (2005) de que micélio apresenta um metabolismo mais aeróbio em comparação com a forma leveduriforme. A detecção dessas proteínas em micélio também sugere uma possível função de proteger o *P. brasiliensis* de danos causados pelos intermediários reativos do oxigênio.

Proteínas envolvidas na transdução de sinal, organização do citoesqueleto e no ciclo celular mostraram uma expressão preferencial em micélio. A *Wos2* - uma co-chaperona de associação à *Hsp90* - codifica uma proteína com homologia à p23 humana, e tem sido descrita como uma proteína relacionada com a proliferação celular e interage com a proteína quinase *Cdc2*, que é uma proteína de controle mitótico em todas as células eucarióticas (Muñoz et al., 1999). Outra proteína identificada em micélio é a cofilina, uma proteína de baixo peso molecular e de ligação à actina. Os fatores de despolimerização da actina (ADFs, também conhecidos como destrinas) e as cofilinas são chamados de ADF/cofilinas (Maciver & Hussey, 2002). Experimentos realizados na levedura *Saccharomyces cerevisiae* demonstram que a cofilina despolimeriza e separa os filamentos de actina devido a sua habilidade de se ligar à tropomiosina (Fan et al., 2008). Dois spots de proteínas representando dois genes diferentes da proteína do ponto de checagem do dano ao DNA *rad24* foram identificados como mais abundantes em micélio. No fungo *Schizosaccharomyces pombe* o gene *rad24* codifica o homólogo 14-3-3 (Oowatari et al., 2009) e é necessário para reparar erros de recombinação antes da fase de mitose (Ford et al., 1994). As proteínas 14-3-3 fazem parte de uma grande família de proteínas conservadas que se ligam a diversas proteínas de sinalização, incluindo quinases, fosfatases e receptores transmembrana (Fu, 2000). Em *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 os genes ortólogos, *Bmh1* e *Bmh2*, estão envolvidos na regulação do ciclo celular, transdução de sinal, crescimento celular e morfogênese (Nicola et al., 2005). Maior expressão das proteínas *Wos2*, cofilina e 14-3-3 sugerem uma importante função na organização/manutenção da estrutura celular em micélio.

6.2 – Proteínas com expressão preferencial na transição de micélio para levedura

O aumento na expressão das enzimas álcool desidrogenase (*ADH1*), fosfoglicomutase e a enolase, as duas últimas envolvidas na via glicolítica, sugerem um aumento dessa etapa metabólica

durante a transição dimórfica, contribuindo para a produção de moléculas de ATP. Igualmente, a expressão de enzimas da via pentose-fosfato, transaldolase e transcetolase, poderiam levar a um aumento na produção de gliceraldeído-3-fosfato a ser utilizado na glicólise. Outra importância da via pentose-fosfato refere-se à produção de NADPH, um doador de elétrons para manutenção glutatona redutase num estado reduzido, mantendo os grupos sulfidrilas reduzidos e protegendo as células de radicais livres de oxigênio. A enzima glutatona redutase apresentou expressão constitutiva quando comparada com a três condições analisadas.

A proteína fosfoglicomutase foi induzida durante a transição de micélio para levedura, Monteoliva et al., (2010) identificaram, dentre as proteínas induzidas durante a transição do fungo *Candida albicans* a enzima fosfoglicomutase. Os autores sugerem que a fosfoglicomutase esteja envolvida na conversão de glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato, que depois poderia ser convertida em UDP-glicose. A glicose pode então ser utilizada na síntese de proteínas N-glicosiladas e de β -glicana. Estudos transcricionais realizados em nosso laboratório por Bastos et al., (2007) identificaram que o transcrito codificante da enzima fosfoglicomutase é induzido na transição de micélio para levedura, corroborando os resultados de proteoma, reforçando a hipótese de que a fosfoglicomutase poderia estar envolvida na síntese de componentes da parede celular do fungo *P. brasiliensis*. Ressalte-se que os dados transcricionais apontam para intensa síntese/remodelamento da parede celular durante a transição dimórfica (Bastos et al., 2007).

O catabolismo de ácidos graxos em microorganismos patogênicos é de importância para a sua virulência e sobrevivência (Muñoz-Elias et al., 2006). O aumento da expressão da enzima metilcitrato sintase indica que *P. brasiliensis* utiliza o ciclo do metilcitrato durante a fase de transição para oxidar o propionil-CoA a piruvato. Foi demonstrado que a deleção do gene metilcitrato sintase no fungo *Aspergillus fumigatus* levou a atenuação da virulência (Brock et al., 2004).

Um aumento de enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos foi identificado durante estágios iniciais da transição do *P. brasiliensis*. Análises do fungo *P. brasiliensis* detectaram que o transcrito codificante da enzima argininosuccinato sintase é diferencialmente expresso durante a transição de micélio para levedura (Arraes et al, 2005), confirmando os resultados obtidos nas análises proteômicas. Outra enzima identificada durante a transição dimórfica foi a formamidase, Borges et al., (2010) detectaram a formamidase no citoplasma e na parede celular de *P. brasiliensis*. A localização na parede celular sugere que essa enzima possa contribuir para a virulência do fungo, uma vez que a produção de amônia pode danificar tecidos do hospedeiro, além de ser uma fonte de nitrogênio.

Durante a transição do fungo *Histoplasma capsulatum* o aminoácido cisteína é necessário para completar a transição para a forma leveduriforme (Maresca et al., 1981). Igualmente, a enzima adenosil homocisteinase, envolvida com a síntese dos aminoácidos metionina e cisteína, foi identificada durante a transição de micélio para levedura. Ambos os fungos, *Histoplasma capsulatum* e *P. brasiliensis*, utilizam a cisteína e outros compostos sulfidrílicos para reativar o sistema de transporte de elétrons que estão bloqueados durante a transição (Medoff et al., 1987). Em adição, enzimas da fosforilação oxidativa, as ATP sintases, são induzidas durante a transição de micélio para levedura.

Durante a adaptação celular de *P. brasiliensis* às mudanças de temperatura, como ocorre na transição de micélio para levedura, ocorre a indução de proteínas relacionadas ao choque térmico (HSPs). Como esperado, identificamos várias HSPs, incluindo HSP70, HSP88, HSP90 e HSP SSC1. As proteínas HSP70 identificadas na transição (*spots* 5, 9 e 15) apresentaram o mesmo perfil de acúmulo, ou seja, com progressivo aumento no início da transição seguido de um leve decréscimo durante a fase leveduriforme. Goldman et al., (2003) mostraram que o gene codificante da HSP70 tem um progressivo aumento após 5 h de transição de micélio para levedura, e declina após 48 h e 120 h. Dados similares foram relatados em estudos anteriores de nosso laboratório (Silva et al., 1994). Outra proteína de choque térmico com expressão preferencial na transição é a HSP90. Essa chaperona auxilia no enovelamento e na estabilização de polipeptídeos e, em alguns fungos patogênicos tem importante função, atuando como um antígeno imunodominante, sendo um potencial alvo para antifúngicos (Nicola et al., 2008). Os autores testaram dois inibidores da HSP90, o radicicol e a geldanamicina, Os dois fármacos foram letais para o crescimento das células leveduriformes do *P. brasiliensis* 01, confirmando a importância dessa proteína na fisiologia do fungo. A Hsp90 foi detectada como uma proteína abundante nas hifas do fungo *C. albicans* em estudos proteômicos realizados durante a transição levedura-hifa (Monteoliva et al., 2010) e, recentemente, foi descrita como uma proteína que orquestra a morfogênese em *C. albicans* sob condições de mudança de temperatura (Shapiro et al., 2009).

A proteína disulfeto isomerase (Pdi) também foi identificada durante a fase de transição morfológica; essa molécula promove a formação de ligação dissulfeto nas proteínas endereçadas ao retículo endoplasmático (Freedman et al., 1994). As Pdis têm sido descritas como proteínas de enovelamento de antígenos/alérgenos dos fungos *Aspergillus niger* e *A. fumigatus* isolados de pacientes com aspergilose broncopulmonar alérgica (Liang et al., 2005 & Nigam et al., 2001). Na busca por proteínas candidatas a vacinas e alérgenos, Asif (2005) identificaram uma provável Pdi na superfície de conídios do fungo *A. fumigatus*, No fungo *Ustilago maydis* as Pdis tem sido relacionadas com a transição dimórfica do fungo (Böhmer et al., 2007). Os resultados obtidos no proteoma do fungo *P. brasiliensis*, confirma a importância da Pdi na estabilização das proteínas em condições de estresse térmico.

Outras proteínas identificadas na transição de micélio para levedura estão associadas com funções de transcrição, transporte celular e sinalização. Nesse grupo está uma isoforma da proteína de ligação ao ácido nucléico, bem como a tropomiosina e a proteína RACK1.

A polarização celular é importante para diversas atividades celulares, como transição morfológica, migração celular, crescimento polarizado, divisão celular e endocitose. A identificação da enzima tropomiosina é compatível com as alterações na morfologia das células do *P. brasiliensis* durante a transição.

A Rack1 (receptor for activated C kinases) é uma proteína que atua como um conjunto de complexos de sinalização, o que leva a uma diversidade funcional, incluindo regulação em nível transcricional e traducional, regulação do tráfico de membranas, regulação da transdução de sinal e adesão celular (Sklan et al., 2006). Em *Caenorhabditis elegans* a Rack1 atua como um componente de uma nova via de sinalização envolvendo Rac GTPases e sugere-se que possa estar envolvida na

regulação do citoesqueleto da actina (Demarco & Lundquist, 2010) e na citocinese, e como consequência, a perda da rack1 pode levar a defeito na separação dos cromossomas (Ai et al., 2009).

6.3 – Proteínas com expressão preferencial na fase leveduriforme

Como já evidenciado por estudos transcricionais, duas isoformas da enzima fermentativa álcool desidrogenase (ADH2) foram abundantes na fase leveduriforme. Ao contrário, um aumento de várias enzimas da via glicolítica como, frutose 1,6-bifosfato aldolase, triosefosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase e fosfoglicerato mutase foram detectadas em leveduras. Em adição, uma enzima do ciclo de ácidos tricarbóxicos, a succinil CoA ligase também foi induzida em levedura, sugerindo que tanto a fermentação quanto a respiração aeróbica estão presentes na forma leveduriforme.

A importância do ciclo do metilcitrato para eliminar o propionil-CoA, tem sido demonstrada por patógenos (Muñoz-Elías et al., 2006). As enzimas metilcitrato sintase e metilcitrato desidratase foram identificadas no proteoma do *P. brasiliensis* com expressão preferencial durante a transição de micélio para levedura e em levedura, respectivamente. Em adição, o ciclo do glioxalato tem sido relatado como um importante fator de virulência em patógenos (Piekarska et al., 2008). Uma grande vantagem do ciclo do glioxalato é de evitar as etapas de descarboxilação que ocorrem no ciclo do ácido tricarbóxico (Gould et al., 2006). Nossos estudos proteômicos demonstram que a enzima isocitrato liase foi mais expressa durante a fase patogênica do fungo, como demonstrado em estudos realizados com o patógeno *C. albicans* (Lorenz MC & Fink GR, 2001, 2001).

Outra enzima identificada em levedura e com função predita no metabolismo de aminoácidos é a metionina sintase independente da cobalamina (metE), que está envolvida na síntese de metionina a partir da transferência de um grupo tetrahydrofolato para a homocisteína. No patógeno oportunista *Candida albicans* a disrupção do gene metE por recombinação homóloga inibiu o crescimento do fungo, mostrando que a metE é essencial para o fungo *Candida albicans* e um interessante alvo para desenvolvimento de drogas antifúngicas (Suliman et al., 2007).

A HSP60 é uma chaperona mitocondrial, homólogo à GroEL de *Escherichia coli*, que além de estar envolvida na proteção contra o estresse oxidativo (Cabiscol et al., 2002) promove o correto enovelamento de várias proteínas na matriz mitocondrial (Bukau & Horwich, 1998) e que mostrou um aumento preferencial na fase leveduriforme. Esse resultado com a HSP60 tem sido relatados em estudos anteriores, os quais confirmam a expressão diferencial dessa chaperona na fase leveduriforme (Izacc et al., 2001).

Nas mitocôndrias, o gene SSC1 codifica uma espécie de HSP70 e foi mostrado que a deleção da SSC1 é letal (Krimmer et al., 2000). Em nosso estudo, os dados confirmam os resultados de Felipe et al, (2005), que mostraram que a SSC1 é mais expressa em levedura. Em adição, uma enzima antioxidante homóloga à flavodoxina Y20 e envolvida no choque térmico e no estresse oxidativo foi mais expressa em levedura quando comparado com as fases micélio e transição de micélio para levedura, confirmando os resultados de Daher et al, (2005) e de Felipe et al, (2005).

Proteínas envolvidas no controle do ciclo celular foram identificadas, Septinas são GTPases que formam filamentos em fungos e animais, controlando a citocinese e coordenando a divisão nuclear (Lindsey and Momany, 2006). Em *C. albicans*, a mutação dos genes homólogos à septina, *cdc10Δ* and *cdc11Δ*, foram capazes de crescer como hifas, mas mostraram defeito no crescimento invasivo e tiveram a virulência atenuada em experimentos realizados em camundongos (Warena et al., 2003). Baseado nisto, podemos sugerir que os níveis aumentados da septina durante a fase patogênica do fungo seja uma proteína candidata a determinante de virulência em *P. brasiliensis*.

6.4 – Modificações Pós-Traducionais (MPTs)

As MPTs das proteínas controlam os mecanismos de regulação biológica e sinalização nas células e a técnica de eletroforese bidimensional é capaz de resolver muitas isoformas induzidas por MPTs (Halligan et al., 2004). As análises de MPTs são importantes para entender os processos fisiológicos, especificamente em organismos eucarióticos (Salzano & Crescenzi, 2005).

Nesse estudo foi identificada a enzima enolase que cataliza a desidratação reversível da 2-fosfo-D-glicerato a fosfoenolpiruvato na segunda metade da via glicolítica. A enolase está presente em quatro isoformas e as MPTs encontradas foram, possivelmente, resultantes de fosforilação. Similarmente, em *Plasmodium yoelii*, foram identificadas sete isoformas de enolase, as quais estavam localizadas no citosol, citoesqueleto, membranas e no núcleo (Pal-Bhowmick et al., 2007). Os autores sugerem que as PTMs e a localização em diferentes compartimentos celulares levam a enolase a desempenhar funções não glicolíticas. No fungo *P. brasiliensis* a enolase tem sido encontrada tanto no citosol quanto na superfície celular do fungo e também tem sido relacionada à virulência por atuar como receptor do plasminogênio, aumentando a colonização e invasão (Veloso et al., 2010). Além do plasminogênio, foi demonstrado por Donofrio et al., (2009) a capacidade da enolase em se ligar ao fibrinogênio do hospedeiro, o que facilitaria a disseminação do patógeno em tecidos do hospedeiro, estabelecendo o processo de infecção. Outra exemplo de enzima glicolítica identificada nesse estudo com isoformas é a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Dois diferentes spots (62 e 63) da enzima GAPDH com *pI*s experimentais de 8,80 e 9,13, respectivamente, foram observados com modificação pós-traducional devido, possivelmente, à fosforilação. A GAPDH foi identificada como induzida em levedura e seu envolvimento na virulência do fungo *P. brasiliensis* já foi sugerido por nosso grupo, Barbosa et al., (2006) demonstraram que a GAPDH é uma molécula localizada na parede celular do fungo e seu envolvimento na patogênese tem sido relatado, visto que essa proteína tem função de adesina e liga-se a componentes da matriz extracelular mediando a internalização do *P. brasiliensis*.

A proteína HSP70 foi identificada como três isoformas (*spots* 6, 9 e 15). Duas isoformas (*spots* 9 e 15) apresentaram o mesmo perfil de expressão, enquanto outra isoforma (*spot* 6) da mesma proteína, apresentou perfil diferente. As isoformas dos *spots* 6 e 9 foram submetidas à análises no banco de dados do NCBI com adição de modificações variáveis. O *pI* experimental do *spot* 6 é 4,79, enquanto que o do *spot* 9 é 4,75. Uma mudança para um *pI* mais ácido no gel 2-D indica que a isoforma pode ter sido fosforilada, o que tem sido confirmado na literatura (Kumar et al, 2004).

Outra proteína que apresentou MPT foi a ATP sintase subunidade alfa (*spot* 18). Uma diferença de 42 Da entre a massa experimental e a massa teórica é encontrada na sequência da proteína, indicando acetilação no resíduo de lisina. Em adição, a acetilação na extremidade N-terminal e na cadeia lateral remove grupo(s) amino causando um desequilíbrio ácido-básico (Zhu et al., 2005), e como consequência, resultou num desvio do *pI* para a região mais ácida do gel 2-D. Como a mudança de *pI* causada pela acetilação geralmente é pequena (< 0,2 pH), sugerimos que diferença no *pI* encontrada pode ser devido à fosforilação de dois resíduos de tirosina encontrados. A tabela 7 mostra o espectro com a sequência do peptídeo. Proteínas quinases são família de enzimas que catalizam reação de fosforilação. Como mostrado na tabela 7, a proteína fosfoglicerato quinase (*spots* 42 e 46), também tem uma fosforilação detectada.

Nesse estudo, identificamos 34 spots de proteínas, algumas delas exibindo padrões de expressão que são diferentes de outras isoformas, representando a mesma proteína. Nossos resultados mostraram um aumento na cobertura de sequência das proteínas e dos valores de massas das proteínas (Tabelas 6 e 7) na busca pelo MASCOT, confirmando que a espectrometria de massa é a técnica de escolha para identificar e caracterizar modificações pós-traducionais das proteínas separadas em géis bidimensionais (Larsen & Roepstorff, 2000).

Conclusões 7

*“Inteligência é a capacidade
de se adaptar à mudanças”*

Stephen Hawking

VII – CONCLUSÕES

Nesse estudo, foram utilizadas análises proteômicas para estudar os eventos moleculares associados com o dimorfismo no fungo patogênico *P. brasiliensis*. Este trabalho foi o primeiro a utilizar a estratégia proteômica na identificação de proteínas que possam estar relacionadas com a indução da transição morfológica. Foi utilizada a técnica de eletroforese bidimensional para comparar o proteoma de micélio, transição de micélio para levedura (T) e levedura. Um total de 100 proteínas foi identificado, sendo 81 diferencialmente expressas. Nesse estudo foi evidenciado que uma mudança da temperatura ambiente para a temperatura corporal, encontrada em mamíferos, altera significativamente o proteoma do fungo *P. brasiliensis*. A detecção de enzimas antioxidantes aumentadas na fase de micélio indica que a cadeia respiratória está ativa. Na fase de transição (T) encontramos um aumento na expressão das enzimas fosfoglicomutase, ATP sintase e álcool desidrogenase, indicando que ambos, respiração e fermentação são funcionais. A fase leveduriforme está associada com a presença de enzimas glicolíticas e com o ciclo do glioxalato. Baseado nisto, sugerimos que o *P. brasiliensis* pode promover um remodelamento do seu metabolismo durante a fase de transição para a fase leveduriforme.

Bibliografia 8

*“Os homens geniais são admirados.
Os ricos são invejados. Os poderosos
são temidos, mas só os homens de
caráter despertam confiança”*

Arthur Friedman

VIII – BIBLIOGRAFIA

- Abbott A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature* 1999 Dec 16;402(6763):715-20.
- Ai E, Poole DS, Skop AR. RACK-1 directs dynactin-dependent RAB-11 endosomal recycling during mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*, 2009 Mar;20(6):1629-38. Epub 2009 Jan 21.
- Albornoz MB: Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia* 1971, 9:248-252.
- Albrecht D, Guthke R, Brakhage AA, Kniemeyer O. Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*, *BMC Genomics*. 2010 Jan 15;11:32.
- Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 1997 Mar-Apr;18(3-4):533-7.
- Anjos AR, Calvi SA, Ferracini R, Peraçoli MT, Silva CL, Soares AM. Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. *Med Mycol* 40:377-82.
- Ajello L and Polonelli L (1985). Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas, *Eur J Epidemiol* 1(3): 160-5.
- Almeida AJ, Cunha C, Carmona JÁ, Sampaio-Marques B, Carvalho A, Malavazi I, Steensma HY, Johnson DI, Leão C, Logarinho, E, Goldman GH, Castro AG, Ludovico P, Rodrigues, F. Cdc42p controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 2009 Dec;46(12):919-26, Epub 2009 Aug 15.
- Apweiler R, Bairoch A and Wu CH. Protein sequence databases. *Curr Opin Chem Biol* 2004; 8(1): 76-80.
- Aristizabal BH, Clemons KV, Cock AM, Restrepo A, Stevens DA. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med Mycol*, 40: 169-178, 2002.
- Asif AR, Oellerich M, Armstrong VW, Riemenschneider B, Monod M, Reichard U, Proteome of conidial surface associated proteins of *Aspergillus fumigatus* reflecting potential vaccine candidates and allergens. *J Proteome Res*. 2006 Apr. 5 (4) : 954-62.
- Asif AR, Oellerich M, Armstrong VW, Gross U, U Reichard. Analysis of the cellular *Aspergillus fumigatus* proteome that reacts with sera from rabbits developing an acquired immunity after experimental aspergillosis. *Eletroforese*, 2010 Jun; 31 (12):1947-58.
- Arraes FB, Benoliel B, Burtet RT, Costa PL, Galdino AS, Lima LH, Marinho-Silva C, Oliveira Pereira-L, P Pfrimer, Procópio-Silva L, Reis VC, Felipe MS. General metabolism of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genet Mol Res*, 2005 Jun 30; 4(2):290-308.
- Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, Hebler-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol* 2003, 41:217-223.
- Barbosa MS, Felipe MSS, Jesuíno RSA, Pereira M, Soares CMA. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. *Fungal Genet Biol*. 2004 Jul;41(7):667-75.
- Barbosa MS, Bão SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, Mendes-Giannini MJ, Soares CM. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a Cell Surface Protein Involved in Fungal Adhesion to Extracellular Matrix Proteins and Interaction with Cells, *Infect Immun*. 2006 Jan;74(1):382-9.

- Barrozo LV, Mendes RP, Marques SA, Benard G, Silva MES and Bagagli E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *International Journal of Epidemiology* 2009;1–8 doi:10.1093/ije/dyp207.
- Bastos KP, Bailão AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MS, Silva MG, Martins WS, Fiuza RB, Pereira M, Soares CMA, 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiology* 7: 29.
- Bhadauria V, Zhao WS, Wang LX, Zhang Y, Liu JH, Yang J, Kong LA, Peng YL. Advances in Fungal proteomics. *Microbiol Res.* 2007;162 (3):193-200, Epub 2007 May 9.
- Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, Najvar LK, Fothergill AW, Knobloch J and Graybill JR (2000). Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol.* 38(8): 2940-2.
- Bjellqvist B, Sanchez JC, Pasquali C, Ravier F, Paquet N, Frutiger S, Hughes GJ, Hochstrasser D. Micropreparative two-dimensional gel electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis.* 1993 Dec;14(12):1375-8.
- Böhmer M, Colby T, Böhmer C, Bräutigam A, Schmidt J, Bölker M, Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics.* 2007 Mar;7(5):675-85.
- Boyce KJ, Hynes MJ, Andrianopoulos A. The CDC42 homolog of the 523 dimorphic fungus *Penicillium marneffeii* is required for correct cell polarization 524 during growth but not development. *J Bacteriol.* 2001 Jun;183(11):3447-57.
- Bookout AL, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Pesola JM, Kramer MF. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Curr Protoc Mol Biol.* 2006 Feb; Chapter 15:Unit 15,8.
- Borges CL, Parente JA, Barbosa MS, Santana JM, Bao SN, MV de Sousa, de Almeida Soares CM, Detection of a homotetrameric structure and protein – protein interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* formamidase lead to new functional insights. *FEMS Yeast Res.* 2010; 10(1).
- Borelli D. Some ecological aspects of paracoccidioidomycosis. *Paracoccidioidomycosis.* Medellin, Pan Amer Hlth Org Scient. 1972. Publ: 59-64.
- Brito WA, Rezende TCV, Parente AF, Ricart CAO, de Souza MV, Bao SN, Soares CMA, Identification. Characterization and Regulation Studies of the Aconitase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Biol.* 2011 Aug;115 (8):697-707, Epub 2011 Feb 22.
- Brown AJ, Gow NA, Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* 1999 Aug;7(8):333-8.
- Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity.* 2003,19:311-5.
- Brummer E, Castañeda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycose: an Update, *Microbiol Rev.* 1993. 6: 89-117.
- Bruneau JM, Magnin T, Tagat E, Legrand R, Bernard M, Diaquin M, Fudali C, Latgé JP, Proteomics analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell biosynthesis. *Electrophoresis.* 2001 Aug; 22(13):2812-23.
- Brock M, Buckel W, On the mechanism of action of the antifungal agent propionate, *Eur J Biochem,* 2004 Aug;271(15):3227-41,
- Bukau B, Horwich AL The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines, *Cell,* 1998 Feb 6;92(3):351-66,

Cabiscol E, G Belli, Tamarit J, P Echave, Herrero E, J Ros. Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 2002 Nov 15; 277(46):44531-8, Epub 2002 Aug 27.

Cantú MD, Carrilho E, Wulff NA, Palma MS. Seqüenciamento de Peptídeos usando Espectrometria de Massa: Um Guia Prático. Quim. Nova. Vol, 31, No, 3, 669-675, 2008.

Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJ, Soares CM, Pereira M, Jesuino RS, McEwen JG, Mendoza L, Taylor JW, Felipe MS and San-Blas G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen, Fungal Genet Biol 2008, 45(5): 605-12.

Carberry S, Neville CM, Kavanagh KA, Doyle S. Analysis of major intracellular proteins of *Aspergillus fumigatus* by MALDI mass spectrometry: Identification and characterisation of an elongation factor 1B protein with glutathione transferase activity. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Mar 24;341(4):1096-104. Epub 2006 Jan 26.

Cash, P. Proteomics: the protein revolution. Biologist (London). 2002 Apr;49(2):58-62.

Castro NS, Barbosa MS, Maia ZA, Bão SN, Felipe MS, Santana JM, Soares Mendes-Giannini MJ, Pereira M, de Almeida Soares CM. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* PbDfg5p, a cell-wall protein implicated in filamentous growth. Yeast. 2008 Feb;25(2):141-54.

Caviston, J.P. Tcheperegine, S,E, Bi, E. 2002, Singularity in budding: a role for the evolutionarily conserved small GTPase Cdc42p, Proc, Natl, Acad, Sci, USA 99, 12185–12190.

Chagas RF, Bailão AM, Pereira M, Winters MS, Smullian AG, Deepe GS Jr, de Almeida Soares CM, The catalase family of *Paracoccidioides brasiliensis* is differentially regulated: Protein activity and transcript analysis, Fungal Genet Biol, 2008 Nov;45(11):1470-8, Epub 2008 Aug 30,

Chandler JM, Treece ER, Trenary HR, Breneman JL, Flickner TJ, Frommelt JL, Oo ZM, Patterson MM, Rundle WT, Valle OV, Kim TD, Walker GR, Cooper CR Jr. Protein profiling of the dimorphic, pathogenic fungus, *Penicillium marneffe*. Proteome Sci. 2008 Jun 4;6:17.

Charneau S, Junqueira M, Costa C M, Pires D L, Bussacos A C, Sousa M V, Ricart C A O, Shevchenko A & Teixeira A R L. The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors, Int J Mass Spectrom. v, 268 n. p, 265-276, 2007.

Chen D, Janganan TK, Chen G, Marques ER, Kress MR, Goldman GH, Walmsley AR, Borges-Walmsley MI. The cAMP pathway is important for controlling the morphological switch to the pathogenic yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. Mol Microbiol. 2007 Aug;65(3):761-79.

Clemons KV, Feldman D and Stevens DA. Influence of oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*, J Gen Microbiol, 1989 Jun;135(6):1607-17.

Costa AA, Gómez FJ, Pereira M, Felipe MS, Jesuino RS, Deepe GS Jr, de Almeida Soares CM. Characterization of a gene which encodes a mannosyltransferase homolog of *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbes Infect. 2002 Aug;4(10):1027-34.

Cruz AH, Brock M, Zambuzzi-Carvalho PF, Santos-Silva LK, Troian RF, Góes AM, Soares CM, Pereira M. Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. FEBS J. 2011 Jul; 278(13):2318-32, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08150.x, Epub 2011 May 31.

Cunha AF, Sousa MV, Silva SP, Jesuino RS, Soares CM, Felipe MS. Identification, N-terminal region sequencing and similarity analysis of differentially expressed proteins in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 1999 Apr;37(2):115-21.

Cunha DA, Zancopé-Oliveira RM, Sueli M, Felipe S, Salem-Izacc SM, Deepe GS Jr, Soares CM. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*, *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002 Mar;9(2):374-7.

Daher BS, Venâncio EJ, SM de Freitas, SN Bao, Vianney PV, Andrade RV, Dantas AS, Soares CM, Silva-Pereira Eu, Felipe MS. The highly expressed yeast gene pby20 from *Paracoccidioides brasiliensis* encodes a flavodoxin-like protein. *Fungal Genet Biol*. 2005 May;42(5):434-43.

Dawson JHJ, Guilhaus M. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 1989, 3, 155.

de Carvalho MJ, Amorim Jesuino RS, Daher BS, Silva-Pereira I, de Freitas SM, Soares CM, Felipe MS. Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 2003 Aug;39(3):204-10.

de Groot PW, Ram AF, Klis FM. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol* 2005, 42:657-75.

Demarco RS, Lundquist EA. RACK -1 Acts with Rac GTPase Signaling and UNC-115/abLIM in *Caenorhabditis elegans* Axon Pathfinding and Cell Migration *PLoS Genet*, 2010 Nov 18; 6 (11):e1001215.

de Voss JJ, Rutter K, Schroeder BG, Su H, Zhu Y, Barry CE 3rd. The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 1;97(3):1252-7.

Donofrio FC, Calil AC, Miranda ET, Almeida AM, Benard G, Soares CP, Veloso SN, Soares CM, Mendes Giannini MJ. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *J Med Microbiol*. 2009 Jun;58(Pt 6):706-13.

Dunn MJ and Görg. A two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for proteome analysis, in *Proteomics, From Protein Sequence to Function* (Pennington, S, R, and Dunn, M, J, eds,) . BIOS Scientific Publishers, Oxford, 2001 pp, 43–63.

El Aneed, A, Cohen AM, Baboub JH. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2009, 44,210-230.

Etienne-Manneville S. Cdc42: the centre of polarity, *J Cell Sci*, 2004 Mar 15; 117(Pt 8):1291-300,

Fan X, Martin-Brown S, Florens L, Li R. Intrinsic capability of budding yeast cofilin to promote turnover of tropomyosin-bound actin filaments. *PLoS One*, 2008; 3 (11): e 3641, Epub 2008 04 de novembro.

Felipe MS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhão AQ, Torres FA, Albuquerque P, Arraes FB, Arruda M, Azevedo MO, Baptista AJ, Bataus LA, Borges CL, Campos EG, Cruz MR, Daher BS, Dantas A, Ferreira MA, Ghil GV, Jesuino RS, Kyaw CM, Leitão L, Martins CR, Moraes LM, Neves EO, Nicola AM, Alves ES, Parente JA, Pereira M, Poças-Fonseca MJ, Resende R, Ribeiro BM, Saldanha RR, Santos SC, Silva-Pereira I, Silva MA, Silveira E, Simões IC, Soares RB, Souza DP, De-Souza MT, Andrade EV, Xavier MA, Veiga HP, Venancio EJ, Carvalho MJ, Oliveira AG, Inoue MK, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Brígido MM. Transcriptome Characterization of the Dimorphic and Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*, 2003 Feb;20(3):263-71.

Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jesuino RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Carvalho MJ, Brígido MM; PbGenome Network. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem*. 2005 Jul 1;280(26):24706-14. Epub 2005 Apr 22.

- Fonseca CA, Jesuino RSA, Felipe MSS, Cunha DA, Brito WA & Soares CMA. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Microbes Infect*, 2001 **3**, 535-542.
- Ford JC, al-Khodairy F, Fotou E, Sheldrick KS, Griffiths DJ, Carr AM. 14-3-3 protein homologs required for the DNA damage checkpoint in fission yeast, *Science*. 1994 Jul 22; 265(5171):533-5.
- Franco M, Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol*. 1987 Feb;25(1):5-18.
- Franco M, Sano A, Kera K, Nishimura K, Takeo K, Miyaji M. Clamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1989 May-Jun;31(3):151-7.
- Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol*. 1993; 5:115-49.
- Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci*, 1994 Aug;19(8):331-6.
- Fu H, Subramanian RR, SC Mestres. 4-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000; 40:617-47.
- Gharahdagh F, Weinberg CR, Meagher DA, Imai BS, Mische SM. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity, *Electrophoresis*. 1999 Mar; 20(3): 601-5.
- Giles SS, Stajich JE, Nichols C, Gerrald QD, Alspaugh JA, Dietrich F, Perfect JR. The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense, *Eukaryot Cell*. 2006 Sep;5(9):1447-59.
- Glish, GL, McLuckey AS, McKown HS. Improved performance of a tandem quadrupole time-of-flight Mass Spectrometer, *Anal Instrum*. 1984, 16,191-206.
- Goldman GH, dos Reis Marques E, Duarte Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, de Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaiia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH. EST analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence/pathogenicity genes. *Eukaryot Cell*. 2003 Feb;2(1):34-48.
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000 Apr; 21(6):1037-53.
- Görg A, Weiss W and Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004, 4, 3665–3685.
- Gould TA, van de Langemheen H, Muñoz-Elías EJ, McKinney JD, Sacchettini JC. Dual role of isocitrate lyase 1 in the glyoxylate and methylcitrate cycles in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 2006 Aug;61(4):940-7.
- Graves PR, Haystead TA. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002 Mar;66(1):39-63; table of contents. *Molecular biologist's guide to proteomics*.
- Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):1720-30.
- Halligan BD, Ruotti V, Jin W, Laffoon S, Twigger SN, Dratz EA. ProMoST (Protein Modification Screening Tool): a web-based tool for mapping protein modifications on two-dimensional gels. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul 1;32 (Web Server issue): W638-44.

Han X, Aslanian A and Yates JR. Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* 2008, 12:483–490.

Hogan LH, Klein BS. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. *Infect. Immun*, 1994 Aug;62(8):3543-6.

Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K, WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jul;35 (Web Server issue):W585-7, Epub 2007 May 2,1.

Hung CY, Yu JJ, Seshan KR, Reichard U, Cole GT. A Parasitic Phase-Specific Adhesin of *Coccidioides immitis* Contributes to the Virulence of This Respiratory Fungal Pathogen. *Infection and Immunity*. July 2002, p, 3443–3456.

Ideker T, Thorsson V, Ranish JA, Christmas R, Buhler J, Eng JK, Bumgarner R, Goodlett DR, Aebersold R, Hood L. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* 2001 May 29;292(5518):929-34.

Izacc SM, Gomez FJ, Jesuino RS, Fonseca CA, Felipe MS, Deepe GS, Soares CM. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2001 Oct;39(5):445-55.

James SA, Collins MD and Roberts IN (1996). Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulasporea*. *Int J Syst Bacteriol* 46(1): 189-94.

Jesuino RS, Azevedo MO, Felipe MS, Pereira M, De Almeida Soares CM, Characterization of a chaperone ClpB homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast.*, 2002 Aug;19(11):963-72,

Joseph EA, Mare A, Irving WR Jr, Oral South American blastomycosis in the United States of America. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966 Jun;21(6):732-7,

Johnson RS, Mathews WR, Biemann K, Hopper S, Amino acid sequence of thioredoxin isolated from rabbit bone marrow determined by tandem mass spectrometry, *J Biol Chem*, 1988 Jul 15;263(20): 9589-97.

Johnson CH, Klotz MG, York JL, Kruff V, McEwen JE. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. *Microbiology.* 2002 Apr;148(Pt 4):1129-42.

Kanetsuna F, Carbonel LM, Restrepo RE, Rodriguez J. Cell Wall Composition of Yeast and Mycelial Forms of *Paracoccidioides brasiliensis*: *Journal of Bacteriology.* 1969 V. 97, P, 1036.

Karas M, Hillenkamp F, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988 Oct 15;60(20):2299-301.

Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR. Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. *Fungal Genet Biol*, 2007 Sep; 44(9):886-95, Epub 2007 Jan 26.

Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR, Proteomics of filamentous fungi. *Trends Biotechnol.* Sep;25(9):395-400, Epub 2007 Aug 3, Review.

Kniemeyer O, Lessing F, Scheibner O, Hertweck C, Brakhage AA, Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet.* 2006 Mar;49(3):178-89, Epub 2005 Dec 17.

Krimmer T, Rassow J, Kunau WH, Voos W and Pfanner N. Mitochondrial protein import motor: the ATPase domain of matrix Hsp70 is crucial for binding to Tim44, while the peptide binding domain and the carboxy-terminal segment play a stimulatory role. *Mol Cell Biol.* 2000 Aug;20(16):5879-87.

Lacaz CS, Martins JEC. Paracoccidioidomycosis. *Micologia Médica*. São Paulo, Sarvier Editora: 248-261, 1991.

Lacaz CS. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy. 1994 In: Franco.

Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, **227**:680-685,

Larsen MR, Roepstorff P. Mass spectrometric of proteins and characterization of their post-translational modifications in proteome analysis. *Fresenius J Anal Chem*, 2000 Mar-Apr;366(6-7):677-90.

Leclerc MC, Philippe H and Gueho E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J Med Vet Mycol*. 1994;32(5):331-41.

Lengeler KB, Davidson RC, D'souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J, Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000 Dec;64(4):746-85.

Lim D, Hains P, Walsh B, Bergquist P, Nevalainen H. Proteins associated with the cell envelope of *Trichoderma reesei*: A proteomic approach, *Proteomics*, 2001 Jul;1(7):899-909.

Lindsey R, Momany M. Septin localization across kingdoms: three themes with variations. *Curr Opin Microbiol* 2006, 9:559-565.

Loose DS, Stover EP, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983 Dec; 80(24):7659-63.

Lorenz MC, Fink GR. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*, 2001 Jul 5;412(6842):83-6.

Lorenz MC, Fink GR. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell*, 2002 Oct;1(5):657-62.

Maciver SK, Hussey PJ. The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genoma Biol*, 2002; 3 (5): reviews3007, Epub 2002 26 de abril.

Mamyrin BA, and Shikk DV. *Sob. Phys. JETP (Engl. Transl.)* 1979, 49,762,

McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol*, 1987 Jun;25(3):165-75.

Macfarlane RD, Torgerson DF. Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy. *Science*, 1976 Mar 5;191(4230):920-5.

Maeda M, Mori H, Wada C. Proteome analysis using MALDI-TOF MS. *Seikagaku*, 2003 May;75(5):401-6.

Mann M, Meng CK. *Fenn JB. Anal. Chem.* 1989, 61, 1702.

Mann M, Højrup P, Roepstorff P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol Mass Spectrom*. 1993 Jun;22(6):338-45.

Maresca B, Lambowitz AM, Kumar VB, Grant GA, Kobayashi GS, G Medoff. Role of cysteine in regulating morphogenesis and mitochondrial activity in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981 Jul;78(7):4596-600.

Marion CL, Rappleye CA, Engle JT, Goldman WE. An alpha-(1,4)- amylase is essential for alpha-(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum*. *Mol Microbiol* 2006;62:970-983.

Marques SA, Franco MF, Mendes RP, Silva NC, Baccili C, Curcelli ED, Feracin AC, Oliveira CS, Tagliarini JV, Dillon NL, [Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic area of Botucatu (São Paulo - Brazil)]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1983 Mar-Apr;25(2):87-92.

Marques SA, Paracoccidioidomycose, *An Bras Dermatol* 1998;73(5):455–69 (in Portuguese).

Marques ER, Ferreira ME, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Carvalho KC, Goldman MH, Goldman GH. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis* using suppression subtraction hybridization and macroarray differential analysis. *Mol Genet Genomics*, 2004 Jul;271(6):667-77. Epub 2004 May 8.

Martinez R. Blastomicose-Sul-Americana (Paracoccidioidomycose) - Etioepidemiologia e Ecologia, *Tratado de Infectologia*, R, Veronesi and R, Focaccia, 1997 Ateneu: 1082.

Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Nino-Veja G, and Taylor JW. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol, Biol, Evol*, 2006; 23: 65–73.

Matute DR, Sepulveda VE, Quesada LM, Goldman GH, Taylor JW, Restrepo A, McEwen JG. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*, 2006 Jun; 44(6): 2153-7.

McKinney JD, Höner zu Bentrup K, Muñoz-Elías EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, Swenson D, Sacchetti JC, Jacobs WR Jr, Russell DG. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 2000 Aug 17;406(6797):735-8.

Medoff, G, Painter, A, Kobayashi, GS. Mycelial - to yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 1987; 169(9): p, 4055-60.

Medzihradzky KF, Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML, Burlingame AL. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer, *Anal Chem*, 2000 Feb 1; 72(3):552-8,

Melin P, Schnürer J, Wagner EG. Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. *Mol Genet Genomics*, 2002 Aug;267(6):695-702, Epub 2002 Jul 4.

Miyazaki S, Sugawara H, Gojobori T, Tateno Y. DNA Data Bank of Japan (DDBJ) in XML. *Nucleic Acids Res*, 2003 Jan 1;31(1):13-6.

Monteoliva L, Martinez-Lopez R, Pitarch A, Hernaez ML, Serna A, Nombela C, Albar JP, Gil C. Quantitative proteome and acidic subproteome profiling of *Candida albicans* yeast-to-hypha transition. *J Proteome Res*, 2010 Feb 4;10(2):502-17, Epub 2010 Dec 31.

Moreira SF, Bailão AM, Barbosa MS, Jesuino RS, Felipe MS, Pereira M, de Almeida Soares CM. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis, *Yeast*, 2004 Jan 30;21(2):173-82.

Muñoz MJ, Bejarano ER, Daga RR, Jimenez J. The Identification of Wos2, a p23 Homologue That Interacts With Wee1 and Cdc2 in the Mitotic Control of Fission Yeasts. *Genética* 1999 Dec; 153 (4):1561-72.

Muñoz-Elías EJ, Upton AM, Cherian J, McKinney JD, Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. *Mol Microbiol*. 2006 Jun;60(5):1109-22.

Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000 Aug 1;97(16):8841-8.

Nda S Castro, de Castro KP, Orlandi Eu, Feitosa LDOs S, Rosa e Silva LK, Vainstein MH, Bao SN, Vai M, Soares CM. Characterization and functional analysis of the beta-1,3-glucanosyltransferase 3 of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*.

Nemecek JC, Wüthrich M, Klein BS. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science*, 2006, Apr 28; v,312, p 583-588.

Nemecek JC, Wüthrich M, Klein BS. Detection and Measurement of Two-Component Systems That Control Dimorphism and Virulence in Fungi. *Methods in Enzymology*. VOL, 422, Copyright 2007, Elsevier Inc. All rights reserved.

Nicola AM, Andrade RV, Silva-Pereira I. Molecular chaperones in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res*, 2005 Jun 30;4(2):346-57. Review.

Nicola AM, Andrade RV, Dantas AS, Andrade PA, Arraes FB, Fernandes L, Silva-Pereira I, Felipe MS. The stress responsive and morphologically regulated hsp90 gene from *Paracoccidioides brasiliensis* is essential to cell viability. *BMC Microbiol*, 2008 Set 22; 8:158.

Niño-Vega GA, Buurman ET, Gooday GW, San-Blas G, Gow NA. Molecular cloning and sequencing of a chitin synthase gene (CHS2) of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*, 1998 Jan 30;14(2):181-7.

Niño-Vega GA, Munro CA, San-Blas G, Gooday GW, Gow NA. Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 38:31-9.

Niño-Vega GA, Carrero L, San-Blas G. Isolation of the CHS4 gene of *Paracoccidioides brasiliensis* and its accommodation in a new class of chitin synthases. *Med Mycol*, 2004 Feb;42(1):51-7.

Niño-Vega G, Pérez-Silva C, San-Blas G. The actin gene in *Paracoccidioides brasiliensis*: organization, expression and phylogenetic analysis. *Mycol Res* 2007;111:363–9.

Nogueira SV, Fonseca FL, Rodrigues ML, Mundodi V, Abi-Chacra EA, Winters MS, Alderete JF, Soares CMA. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells, *Infection and immunity* 78: 4040-4050.

Nunes LR, Costa de Oliveira R, Leite DB, da Silva VS, dos Reis Marques E, da Silva Ferreira ME, Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Goldman MH, Puccia R, Travassos LR, Batista WL, Nóbrega MP, Nobrega FG, Yang DY, de Bragança Pereira CA, Goldman GH. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell*, 2005 Dec;4(12):2115-28.

Oowatari Y, Toma K, F Ozoe, Kawamukai M. Identification of sam4 as a rad24 allele in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009 Jul; 73 (7): 1591-8.

Orsborn KI, Shubitz LF, Peng T, Kellner EM, Orbach MJ, Haynes PA, Galgiani JN. Protein Expression Profiling of *Coccidioides posadasii* by Two-Dimensional Differential In-Gel Electrophoresis and Evaluation of a Newly Recognized Peroxisomal Matrix Protein as a Recombinant Vaccine Candidate. *Infect Immun*, 2006 Mar;74(3):1865-72.

O'Farrell PH. Hight two dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975 May 25;250(10):4007-21.

Pal-Bhowmick I, Vora HK, Jarori GK. Sub-cellular localization and post-translational modifications of the *Plasmodium yoelii* enolase suggest moonlighting functions. *Malar J*, 2007 Apr 16;6:45.

Parente AF, Bailão AM, Borges CL, Parente JA, Magalhães AD, Ricart CA, Soares CM. Proteomic Analysis Reveals That Iron Availability Alters the Metabolic Status of the Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. PLoS One. 2011;6(7):e22810. Epub 2011 Jul 28.

Pereira LA, Pereira M, Felipe MS, Zancopé-Oliveira RM, Soares CM. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbios Infect, 2004 Aug; 6 (10) :892-900.

Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, da Silva JL, Felipe MS, de Santana JM, Mendes-Giannini MJ, de Almeida Soares CM. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. FEMS Yeast Res, 2007 Dec;7(8):1381-8. Epub 2007 Aug 22.

Piekarska K, G Hardy, Mol E, van den Burg J, K Strijbis, van Roermund C, van den Berg M, B Distel. The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional β -oxidation pathway: evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane. Microbiology, 2008 Oct;154(Pt 10):3061-72.

Pitarch A, Sánchez M, Nombela C, Gil C. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. Mol Cell Proteomics. 2002 Dec;1(12):967-82.

Pitarch A, Sánchez M, Nombela C, Gil C. Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2003 Apr 5;787(1):101-28.

Price MS, Nichols CB, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* Rho-GDP dissociation inhibitor mediates intracellular survival and virulence. Infect Immun. 2008 Dec;76(12):5729-37, Epub 2008 Sep 8.

Posadas A, 1892. Un Nuevo caso de micosis fungoidea con psorospermias: Ann Cir Med Argent, v,15, p, 585-597.

Rappleye CA, Engle JT, Goldman WE. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for α -(1,3)-glucan in virulence, Mol Microbiol. 2004 Jul;53(1):153-65.

Restrepo-Moreno A, Greer DL. Paracoccidioidomycosis. In: AF Di-Salvo, Occupational Mycoses, Philadelphia: Lea & Febiger. 43-64, 1983.

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. Sabouraudia, 1985 Oct;23(5):323-34.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Patiño MM. A technique to collect and dislodge conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelia form. J Med Vet Mycol, 1986 Jun;24(3):247-50.

Restrepo A. Immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts. In: M, McGinnis (Ed.) Current Topics in Medical Mycology. 1988 2:239-277, Springer-Verlag, New York.

Restrepo A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? Med Mycol, 2000 Aug;38(4):317-22.

Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? Med Mycol. 2001 Jun;39(3):233-41.

Richman TJ, Johnson DI. *Saccharomyces cerevisiae* cdc42p GTPase is involved in preventing the recurrence of bud emergence during the cell cycle. Mol Cell Biol. 2000 Nov; 20(22): 8548-59.

Richman TJ, Sawyer MM, Johnson DI. *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p localizes to cellular membranes and clusters at sites of polarized growth. Eukaryot Cell. 2002 Jun;1(3):458-68.

Richini-Pereira VB, Bosco SD, Griese J, Theodoro RC, Macoris SA, Da Silva RJ, Barrozo L, Tavares PM, Zancope-Oliveira RM and Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol*. 2008 Feb; 46(1):35-40.

Rivitti EA and Aoki V, 1999. Deep Fungal Infections in Tropical Countries. *Clin Dermatol* 17: 171-190.

Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom*, 1984 Nov;11(11):601.

Rooney PJ, Sullivan TD, Klein BS. Selective expression of the virulence factor BAD1 upon morphogenesis to the pathogenic yeast form of *Blastomyces dermatitidis*: Evidence for transcriptional regulation by a conserved mechanism. *Mol Microbiol*. 2001 Feb;39(4):875-89.

Román E, Nombela C, Pla J. The *sho1* adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*. 2005 Dec;25(23):10611-27.

Rubin-Bejerano I, Abeijon C, Magnelli P, Grisafi P, Fink GR. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe*, 2007 Jul 12;2(1):55-67.

Salzano AM, Crescenzi M. Mass spectrometry for protein identification and the study of post translational modifications. *Ann Ist Super Sanita*. 2005;41(4):443-50.

San-Blas G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. *Mycopathologia*. 1982 Sep 17;79(3):159-84.

San-Blas G, San-Blas F. Molecular aspects of fungal dimorphism, *Crit Rev Microbiol*. 1984;11(2):101-27.

San-Blas, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. *Curr Top Med Mycol*, 1985; 1:235-57.

San-Blas, G and Niño-Veja, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In *Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications*, Cihlar, RL and Calderone, R,A, (eds), New York, N,Y,; Marcel Dekker Inc, 2001, pp, 205–226.

San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Mycol Med* 2002 Jun; 40 (3):225-42.

San-Blas G, Niño-Vega G, Morphogenesis in other agents of systemic mycoses. In: San-Blas G, Calderone RA (eds), *Pathogenic Fungi: Structural Biology and Taxonomy*, Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, 2004 pp, 167–220.

San-Blas G, Niño-Vega G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy, *Mycopathologia*, 2008 Apr-May; 165(4-5):183-95.

Sano A, Nishimura K, Miyaji M. The Research Encouragement Award, Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 1999; 40(1):1-8.

Scheffer J, Chen C, Heidrich P, Dickman MB, Tudzynski P. A CDC42 homologue in *Claviceps purpurea* is involved in vegetative differentiation and is essential for pathogenicity. *Eukaryot Cell*, 2005 Jul;4(7):1228-38.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNAmicroarray. *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):467-70.

- Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, Abiko Y, Samaranayake LP. Proteomics of drug resistance in *Candida glabrata* biofilms. *Proteomics*, 2010 Apr;10(7):1444-54.
- Shalon D, Smith SJ, Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res*. 1996 Jul;6(7):639-45.
- Shapiro RS, Uppuluri P, Kus AK, Collins C, H Senn, Perfeito JR, J Heitman, Cowen LE. Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling. *Curr Biol*, 2009 Abr 28; 19 (8) :621-9. Epub 2009 Mar 26.
- Shevchenko A, Loboda A, Shevchenko A, Ens W, Standing KG. MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research. *Anal Chem*, 2000 May 1;72(9):2132-41.
- Shikanai-Yasuda MA, Filho FQT, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML e Grupo de Consultores do Consenso em Paracoccidioidomicose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(3):297-310, mai-jun, 2006.
- Silva SP, Felipe MSS, Pereira M, Azevedo MO and Soares CMA. Phase transition and stage-specific protein synthesis in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp Mycol* 1994, **18**: 294-299.
- Silva SP, Borges-Walmsley MI, Pereira IS, Soares CM, Walmsley AR, Felipe MS, Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Molecular Microbiology* 1999 fev; 31(4), 1039–50.
- Silva-Vergara ML, Martínez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá. State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol* 1998, 36:37-42.
- Siuzdak, G. *The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*, 2006 Second Edition.
- Sklan EH, Podoly E, Soreq H. RACK1 has the nerve to act: structure meets function in the nervous system. *Prog Neurobiol* 2006, 78: 117–134.
- Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004 Sep;5(9):699-711.
- Stoesser G, Baker W, van den Broek A, Camon E, Garcia-Pastor M, Kanz C, Kulikova T, Leinonen R, Lin Q, Lombard V, Lopez R, Redaschi N, Stoehr P, Tuli MA, Tzouvara K, Vaughan R. The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res*, 2002 Jan 1;30(1):21-6,
- Ström K, Schnürer J, Melin P. Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *FEMS Microbiol Lett*, 2005 May 1;246(1):119-24.
- Suliman HS, Appling DR, and Robertus JD. The Gene for Cobalamin-independent Methionine Synthase is Essential in *Candida albicans*: A Potential Antifungal Target. *Arch Biochem Biophys*, 2007 November 15; 467(2): 218–226.
- Svidzinski TI, Miranda Neto MH, Santana RG, Fischman O, Colombo AL. *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1999 Sep-Oct;41(5):279-83.
- Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MS. Phylogenetic analysis reveals a high od speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*, 2009 Aug; 52(2):273-83, Epub 2009 Apr 17.
- Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco SMG, Macoris SAG and Richini-Pereira VB. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiology* 2007, 7:92.

- Teutschbein J, Albrecht D, Pötsch M, Guthke R, Aïmanianda V, Clavaud C, Latgé JP, Brakhage AA, Kniemeyer O. Proteome Profiling and Functional Classification of Intracellular Proteins from Conidia of the Human- Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*. J Proteome Res, 2010 Jul 2; 9 (7): 3427-42.
- Theodoro RC, Bagagli E, Oliveira C. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. Fungal Genetics and Biology 45 (2008) 1284–1291.
- Thiede B, Höhenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, Jungblut PR. Peptide mass Fingerprinting, Methods. 2005 Mar;35(3):237-47. Epub 2005 Jan 12.
- Tomazett PK, Cruz AH, Bonfim SM, Soares CM, Pereira M. The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. Genet Mol Res, 2005 Jun 30;4(2):309-25.
- Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, de Gaetano Donati K, La Sorda M, Spanu T, Fadda G, Cauda R, Sanguinetti M. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. J Clin Microbiol, 2007 Jun; 45(6):1843-50. Epub 2007 Apr 25.
- Warenda AJ, Konopka JB. Septin Function in *Candida albicans* Morphogenesis, Mol Biol Cell, 2002 Aug;13(8):2732-46.
- Westermeier R, Loyland S and Asbury R. Proteomics Technology. Journal of Clinical Ligand Assay. Volume 25, number 3, fall 2002.
- Westermeier R, Naven T, Proteomics in Practice: A laboratory manual of Proteome analysis 2002.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol Genet Eng Rev, 1996;13:19-50.
- Winters MS, Spellman DS, Chan Q, Gomez FJ, Hernandez M, Catron B, Smulian AG, Neubert TA, Deepe GS Jr. *Histoplasma capsulatum* proteome response to decreased iron availability. Proteome Sci, 2008 Dec 24;6:36.
- VandenBerg AL, Ibrahim AS, Edwards JE Jr, Toenjes KA, Johnson DI. Cdc42p GTPase regulates the budded-to-hyphal-form transition and expression of hypha-specific transcripts in *Candida albicans*. Eukaryot Cell, 2004 Jun;3(3):724-34.
- Velculescu_VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. Science. 1995 Oct 20;270(5235):484-7.
- Venter JC, Adams, MD, Myers, EW, et al: The human genome. Science 2001; 291:1304–1351.
- Villa LA, Tobon A, Restrepo A, Calle D, Rosero DS and Gomez BL. Central nervous system paracoccidioidomycosis, Report of a case successfully treated with itraconazol. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 42(4): 231-4.
- Villar LA, Salazar ME, Restrepo A. Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. J Med Vet Mycol, 1988;26 (5):269-76.
- Xi L, Xu X, Liu W, Li X, Liu Y, Li M, Zhang J, Li M. Differentially expressed proteins of pathogenic *Penicillium marneffe* in yeast and mycelial phases. J Med Microbiol, 2007 Mar;56(Pt 3):298-304.
- Zhengding S, Hongjian L, Yang L, Feng N. Inhibition of the pathogenically related morphologic transition in *Candida albicans* by disrupting Cdc42 binding to its effectors. Chem Biol, 2007 Nov; 14(11):1273-82.

Zhu K, J Zhao, Lubman DM, Miller FR, Barder TJ. Protein pI Shifts due to Posttranslational Modifications in the Separation and Characterization of Proteins. *Anal Chem*, 2005 May 1;77(9):2745-55.

Anexos 9

“Se algum dia tiver que escolher entre o mundo e o Amor... Lembre-se: se escolher o mundo ficará sem Amor, mas se escolher o Amor, com Ele conquistará o mundo”

Albert Einstein

IX – ANEXOS

Produção científica durante o doutoramento

9.1 Artigos publicados

Sabrina Fonseca Ingênito Moreira Dantas, **Tereza Cristina Vieira de Rezende**, Alexandre Melo Bailão, Carlos Pelleschi Taborda, Rodrigo da Silva Santos, Kelly Pacheco de Castro, Célia Maria de Almeida Soares. Identification and characterization of antigenic proteins potentially expressed during the infectious process of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 2009 Sep;11(10-11):895-903. Epub 2009 Jun 13.

Wesley de A. BRITO, **Tereza Cristina Vieira de Rezende**, Ana Flávia PARENTE, Carlos André O. RICART, Marcelo V. de SOUSA, Sônia N. BÁO, Célia Maria de A. SOARES. Identification, Characterization and Regulation Studies of the Aconitase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Biol.* 2011 Aug;115(8):697-707. Epub 2011 Feb 22.

Tereza Cristina Vieira de Rezende, Clayton L, Borges, Adriana D, Magalhães, Marcelo Valle de Sousa, Carlos A. O. Ricart, Alexandre M. Bailão, Célia M. A. Soares. A quantitative view of *Paracoccidioides brasiliensis* morphological phases using proteomics. *Journal of Proteomics*, 2011 Sep 3 (ISSN 1874-3919).



INSTITUT PASTEUR

Microbes and Infection xx (2009) 1–9



www.elsevier.com/locate/micinf

Original article

Identification and characterization of antigenic proteins potentially expressed during the infectious process of *Paracoccidioides brasiliensis*

Sabrina Fonseca Ingênilo Moreira Dantas^a, Tereza Cristina Vieira de Rezende^a, Alexandre Melo Bailão^a, Carlos Pelleschi Taborda^b, Rodrigo da Silva Santos^a, Kelly Pacheco de Castro^a, Célia Maria de Almeida Soares^{a,*}

^a Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil

^b Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

Received 19 March 2009; accepted 24 May 2009

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis causes paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis presenting clinical manifestations ranging from mild to severe forms. A *P. brasiliensis* cDNA expression library was produced and screened with pooled sera from PCM patients adsorbed against antigens derived from in vitro-grown *P. brasiliensis* yeast cells. Sequencing DNA inserts from clones reactive with PCM patients sera indicated 35 open reading frames presenting homology to genes involved in metabolic pathways, transport, among other predicted functions. The complete cDNAs encoding aromatic-L-amino-acid decarboxylase (*Pbddc*), lumazine synthase (*Pbls*) and a homologue of the high affinity copper transporter (*Pbctr3*) were obtained. Recombinant proteins *PbDDC* and *PbLS* were obtained; a peptide was synthesized for *PbCTR3*. The proteins and the synthetic peptide were recognized by sera of patients with confirmed PCM and not by sera of healthy patients. Using the in vivo-induced antigen technology (IVIAT), we identified immunogenic proteins expressed at high levels during infection. Quantitative real time RT-PCR demonstrated high transcript levels of *Pbddc*, *Pbls* and *Pbctr3* in yeast cells infecting macrophages. Transcripts in yeast cells derived from spleen and liver of infected mice were also measured by qRT-PCR. Our results suggest a putative role for the immunogenic proteins in the infectious process of *P. brasiliensis*.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; Immunogenic proteins; Infectious process; DOPA Decarboxylase; Lumazine synthase; High affinity copper transporter

1. Introduction

Paracoccidioides brasiliensis causes paracoccidioidomycosis (PCM), a human systemic granulomatous disease,

prevalent in South America [1]. The fungus is thermo dimorphic and causes by inhalation of airborne propagules of the mycelia phase, which reach the lungs and differentiates into the yeast phase [2].

Although the disease process is well characterized, the fungal expression of genes in vivo is poorly explored. During disease, *P. brasiliensis* must adapt to a range of environments and survival in any one niche should require the differential expression of genes. The in vivo gene expression pattern of *P. brasiliensis* has been examined by our laboratory by transcriptome analysis [3–5]. A wide array of genes involved in nutrient acquisition, melanin synthesis, adhesion, stress response, general metabolism were induced and have been identified.

Abbreviations: BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; CTR3, high affinity copper transporter; DDC, aromatic-L-amino acid decarboxylase; IPTG, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; IVIAT, in vivo-induced antigen technology; LS, lumazine synthase; NBT, nitroblue tetrazolium; Pb, *Paracoccidioides brasiliensis*; PCM, Paracoccidioidomycosis; TPI, triosephosphate isomerase.

* Corresponding author. Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, ICBII, Campus II, Universidade Federal de Goiás, 74001-970 Goiânia, Goiás, Brazil. Tel./fax: +55 62 3521 1110.

E-mail address: celia@icb.ufg.br (C. Maria de Almeida Soares).

1286-4579/\$ - see front matter © 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.micinf.2009.05.009

Please cite this article in press as: Sabrina Fonseca Ingênilo Moreira Dantas, et al., Identification and characterization of antigenic proteins potentially expressed during the infectious process of *Paracoccidioides brasiliensis*, Microb Infect (2009), doi:10.1016/j.micinf.2009.05.009

With the purpose of identifying antigenic proteins potentially expressed during the fungal infectious process, here we applied the *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT). IVIAT has been used to identify genes expressed during human infection by several microorganisms [6–11]. A *P. brasiliensis* cDNA expression library was screened in order to identify clones reactive with sera of PCM patients. Specifically, we hypothesized that by using the IVIAT immunological screening, we could identify proteins that play a role during fungal infection.

Screening of the cDNA library resulted in the identification of 29 genes, putatively playing a role in the fungus-host interaction. The cDNAs, encoding aromatic-L-amino acid decarboxylase (DDC, EC 4. 1. 1. 28), lumazine synthase (LS, EC 2. 5. 1. 9) and high affinity copper transporter (CTR3) orthologues of *P. brasiliensis* were selected for further analysis. The recombinant proteins (*PbDDC* and *PbLS*) and a synthetic peptide (*PbCTR3*) were obtained and showed strong reactivity with sera of PCM patients. The predictable expression of those transcripts was evaluated by quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) in models of infection. The results suggest a role in the pathogen-host interaction. Due to the relevance of melanin in pathogenesis of microorganisms, we investigated the involvement of *PbDDC* in this pathway; results demonstrated correlation between the increase of melanin and the enzyme expression in fungal yeast cells.

2. Materials and methods

2.1. *P. brasiliensis* isolate growth conditions and differentiation assays

P. brasiliensis *Pb01* isolate (ATCC-MYA-826) was cultivated in semi-solid Fava Netto's medium [1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.3% (w/v) proteose peptone, 0.5% (w/v) beef extract, 0.5% (w/v) NaCl, 1% (w/v) agar, pH 7.2] at 36 °C in the yeast form and at 22 °C, for its mycelia phase.

2.2. Adsorbing PCM patients sera to *P. brasiliensis* grown *in vitro*

Human sera were collected from 11 patients with well-documented PCM in chronic disease phase and pooled. The serum samples were selected at the time of diagnosis from patients with mycological confirmed disease. Human control sera obtained from 11 healthy individuals were pooled.

A mixture of equal volumes of sera of PCM patients was diluted with *Escherichia coli* cells lysate and the same volume of PBS 1X. The mixture was incubated at 37 °C for 1 h, and centrifuged at 10,000 × g, 4 °C during 20 min. In the second stage, the supernatant was incubated during 1 h at 37 °C, with the same volume of a mixture containing protein extract of *P. brasiliensis* yeast cells (100 µg/mL) and whole yeast cells. This mixture was centrifuged at 10,000 × g, 4 °C for 20 min; the supernatant was collected. The efficiency of the incubation was monitored by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting.

2.3. Infection of mice with *P. brasiliensis* and RNA extraction

Female BALB/c mice, 8–12 weeks old, were inoculated with 1×10^7 yeast cells of *P. brasiliensis*. In brief, yeast cells suspension at the 7th day of *in vitro* growth were washed in PBS 1X and inoculated intraperitoneally in mice. Matched groups of four animals were injected with sterile PBS and used as uninfected controls. The animals were killed on the 15th day after infection. The livers and spleens were removed. Serial dilutions of the lysate were plated in infusion brain and heart (BHI) medium supplemented with 4% (v/v) of fetal bovine serum (FBS) and the plates were incubated at 36 °C for 7 days. The recovered cells were submitted to total RNA extraction by using Trizol reagent (Invitrogen™, Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. Total RNA from *P. brasiliensis* yeast cells and mycelium grown *in vitro*, in the same medium, was also obtained.

2.4. Construction of a cDNA expression library of *P. brasiliensis*

For the construction of a cDNA expression library, the RNA of yeast cells recovered from mice liver on the 15th day after infection was purified by using the Poly (A) Quick® mRNA isolation kit (Stratagene, La Jolla, CA). The cDNA library was constructed by using the SUPERSCRIP™ plasmid system with GATEWAY® technology for cDNA synthesis and cloning.

2.5. Immunological screening of the cDNA library, identification of inserts and prediction of function of the identified antigens

The pooled sera were used in the screening of the cDNA library. An aliquot of the cDNA library was diluted and spread onto LB medium plates containing ampicillin (100 µg/ml) to produce 300–600 colonies per plate. The bacterial colonies were grown at 37 °C overnight. The colonies were held up by using nitrocellulose membranes, replica plated onto LB containing ampicillin and 1 mM of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), and incubated overnight at 37 °C. The colonies grown onto membrane were exposed to chloroform for 20 min. Following washing and blocking of membranes, they were incubated with the adsorbed sera (1:1000 diluted) in PBS 1X, 0.1% (v/v) Tween 20, at 4 °C for 18 h. The induced proteins reacting with antibodies in the sera were detected by using peroxidase-conjugated goat, anti-human IgG (1:2000 diluted) and revealed with the ECL Advance™ Western blotting detection kit (GE Healthcare, Amersham Biosciences). Reactive cDNAs were identified by their position on the master plate; each positive cDNA was isolated at least by two additional plating and reaction to the pooled sera.

We recovered plasmid DNA from 35 positive clones and sequenced the inserts from their 5' end by employing the standard fluorescence labeling DYEnamic™ ET dye terminator kit

(GE Healthcare). An automated DNA sequence analysis was performed in a MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare). The proteins encoded in the cloned cDNAs were compared against the GenBank non-redundant (nr) database from the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the BLAST \times algorithm and against *P. brasiliensis* genome database (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).

2.6. Cloning of *P. brasiliensis* aromatic-L-amino-acid decarboxylase (*Pbddc*) and lumazine synthase (*Pbls*) cDNAs, expression and purification of the recombinant proteins

Oligonucleotide primers were designed to amplify the 1.6 kb and 525 bp cDNAs containing the complete coding regions of *Pbddc* and *Pbls*, respectively. The 1.6 kb and 525 bp amplicons were gel-excised and cloned into pGEX-4T-3 (GE Healthcare) to yield the constructs pGEX-4T3-*ddc* and pGEX-4T-3-*ls*. The recombinant plasmids were used to transform *E. coli*, according to standard procedures [12]. The cells were grown to an absorbance of 0.6 at 600 nm and 0.5 mM IPTG was added to the growing cultures. After 16 h incubation, at 15 °C, the bacterial cells were harvested, resuspended in PBS 1X, lysed by sonication and the recombinant fusion proteins were cleaved by thrombin addition (10 U/mg fusion protein).

2.7. Production of polyclonal antibody anti-PbDDC

The recombinant *PbDDC* was used to generate specific rabbit polyclonal serum. Rabbit pre immune serum was obtained. The purified protein (300 μ g) was injected into rabbit with Freund's adjuvant three times at 2-week intervals.

2.8. Western blotting of the recombinant proteins with sera of PCM patients

The recombinant proteins were fractionated by SDS-PAGE [13]. The gels were either stained with Coomassie blue or blotted onto nitrocellulose membranes that were blocked with 5% non-fat skim milk and reacted with sera from PCM patients or from healthy individuals (1:1000 diluted). The secondary antibody was alkaline phosphatase coupled anti-human IgG. The reactions were developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT).

2.9. Preparation and infection of mice macrophages by *P. brasiliensis* yeast cells

Bone marrow-derived macrophages were obtained by flushing the femurs of 4–12 weeks old female C57BL/6 mice [14]. The prepared cells were cultured at 37 °C under 6% CO₂ in RPMI 1640 medium (Biowhittaker, Walkersville, Md.) supplemented with 10% (v/v) FBS, 1% (w/v) l-glutamine, 5×10^{-5} M

2-mercaptoethanol, 100 ng/mL granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), and 10 μ g/mL of gentamicin. After 8 days, the non-adherent cells were discarded and the remaining cells were washed twice with 10 mL of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). The cells were treated with 10 μ g/mL of dispase in HBSS at 37 °C for 5 min. Further, macrophages were removed using a cell scraper and washed in HBSS. Cells were centrifuged at $500 \times g$ for 5 min, and resuspended in RPMI 1640 medium (supplemented as described above, minus GM-CSF) at a concentration of 1×10^6 cells/mL. *P. brasiliensis* yeast cells (5×10^6) were added to 2 mL of macrophage suspension plated on 6 well plates. After 24 h of co-cultivation at 37 °C, the non-phagocytosed yeast cells were discarded and the bottom cells were washed twice. The RNA of infected mice macrophages and control macrophages were extracted using Trizol.

2.10. Quantitative analysis of RNA transcripts encoding *Pbddc*, *Pbls* and *Pbctr3* by reverse transcription real-time PCR (qRT-PCR)

The RNA of yeast cells, mycelium, infected macrophages and yeast cells derived from infection of mice liver and spleen after 15 days were used in this analysis. Total RNAs treated with DNase were reverse transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT)₁₅ primer. qRT-PCR was performed in triplicate, with samples from three independent experiments in the StepOnePlus™ real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR thermal cycling was 40 cycles of 95 °C for 15 s; 60 °C for 1 min. The SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) was used as reaction mixture, added of 10 pmol of each primer and 40 ng of template cDNA, in a final volume of 25 μ l. A melting curve analysis was performed to confirm a single PCR product. The data were normalized with the ribosomal protein L34 amplified in each set of qRT-PCR experiments. A non-template control was included. A cDNA for a relative standard curve was generated by pooling an aliquot of cDNA from each sample. The standard cDNA was serially diluted 1:5, and a standard curve was generated using four samples from the pooled cDNA. Relative expression levels of genes of interest were calculated using the standard curve method for relative quantification [15].

2.11. Dot blot analysis

To analyze the melanin and DDC accumulation in yeast forms of *P. brasiliensis*, the cells (1.5 g) were sub cultured in Mc Veigh-Morton liquid minimal medium (MMcMi) [16] supplemented or not with 1.0 mM L-Dopa (Sigma) for 15 days at 36 °C. All cultures were incubated in the dark to avoid photo polymerization of L-Dopa into melanin. The viability of fungal suspensions was determined by staining with 0.01% (w/v) Trypan blue in PBS 1X. The cells were collected by centrifugation at $5000 \times g$ for 5 min, frozen in liquid nitrogen and disrupted by maceration. The cellular

powder was centrifuged at $12,000 \times g$ for 20 min. The cellular extracts were vacuum spotted onto nitrocellulose membranes that were blocked and reacted with the anti-melanin antibody of *Sporothrix schenckii* (1:1000 diluted, kindly provided by Dr Joshua D. Nosanchuck, Albert Einstein College of Medicine, New York) and antibody anti-DDC (1:500 diluted). The anti-melanin secondary antibody was biotin anti-mouse IgM (1:500 diluted) plus streptavidin-HRP (1:1000 diluted) and the reactive bands were developed with hydrogen peroxide and diaminebenzidine. The anti-DDC secondary antibody was alkaline phosphatase coupled anti-rabbit IgG (1:2000 diluted), and the reaction was developed with BCIP/NBT. Dot blot analysis was also performed to assay the reactivity of a peptide synthesized on basis on the deduced sequence of *PbCTR3* (Supplementary

Fig. S3) to the serum of PCM patients. Reactions were performed as described above.

3. Results

3.1. Identification of *P. brasiliensis* antigens by IVIAT

We immuno-screened approximately 6000 clones inducible in the *P. brasiliensis* expression library. We identified 35 immuno-reactive clones representing 29 distinct *P. brasiliensis* genes encoding proteins that were persistently reactive after at least three rounds of screening. The predicted proteins encoded by the cDNAs are shown in Table 1. They are implicated in cell metabolism, biogenesis of cellular components, transport, energy, transcription, protein fate and signal transduction.

Table 1
Predicted proteins of *Paracoccidioides brasiliensis* encoded by the cDNAs identified by IVIAT.

| Functional category | Gene Product-description, function (reference) | Best Hit/GenBank accession number* or <i>P. brasiliensis</i> genome locus† | e-value | EC number | Number of positive cDNAs obtained through IVIAT |
|-----------------------------------|---|--|---------|-----------|---|
| Metabolism | Acyl-CoA dehydrogenase | <i>P. brasiliensis</i> /CA581965* | 5e-101 | 1.3.1.8 | 1 |
| | Aromatic-L-amino acid decarboxylase | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_01563.1† | 0.0 | 4.1.1.28 | 1 |
| | Ubiquinone (COQ9) | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_05083.1† | 1e-25 | – | 1 |
| | Lumazine synthase | <i>P. brasiliensis</i> /DQ081183* | 4e-78 | 2.5.1.9 | 1 |
| | Alfa-1,2-galactosyl transferase | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_02629.1† | 1e-8 | 2.4.1. | 1 |
| | Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_01677.1† | 6e-19 | 1.- | 1 |
| Biogenesis of cellular components | Lipopolysaccharide biosynthesis protein | <i>Trichophyton rubrum</i> /DW709722* | 3e-33 | – | 1 |
| | Cofilin | <i>P. brasiliensis</i> Pb03/PABG_07299.1† | 8e-32 | – | 1 |
| Transport | Coatomer zeta subunit | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> /AA21186.1* | 1e-67 | – | 1 |
| | High affinity copper transporter | <i>P. brasiliensis</i> /ABF93409.1* | 2e-59 | – | 1 |
| | Outer membrane ferric siderophore receptor | <i>Phakopsora pachyrhizi</i> /DN739539* | 1e-63 | – | 1 |
| | Carboxylate/amino acid/amine transporter | <i>Trichophyton rubrum</i> /DW701041* | 1e-29 | – | 1 |
| | ABC transporter | <i>P. brasiliensis</i> Pb03/PABG_07206.1† | 1e-7 | – | 3 |
| Energy | ATP synthase F0 F1 subunit 9 | <i>P. brasiliensis</i> /YP_537116.1* | 7e-15 | 3.6.3.14 | 1 |
| | Alcohol dehydrogenase | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_02965.1† | 2e-9 | 1.1.1.1 | 1 |
| | Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit VIIa | <i>P. brasiliensis</i> /ABU46290.1* | 1e-86 | 1.9.3.1 | 1 |
| Transcription | C2H2 finger domain protein | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_04481.1† | 0.0 | – | 1 |
| | Nitrogen regulation protein | <i>P. brasiliensis</i> /EH041264.1* | 5e-52 | – | 2 |
| Protein fate | Ubiquitin | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_06536.1† | 3e-29 | – | 1 |
| | Midasin | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_00114.1† | 0.0 | – | 3 |
| Signal Transduction | Protein kinase domain | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_00114.1† | 0.0 | 2.7.1.37 | 1 |
| | WD repeat protein | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_02429.1† | 0.0 | – | 2 |
| | Diguanylate cyclase | <i>Trichophyton rubrum</i> /DW692821* | 3e-15 | 4.6.1.- | 1 |
| Unclassified | Conserved hypothetical protein | <i>P. brasiliensis</i> /YP_537116* | 5e-15 | – | 1 |
| | Conserved hypothetical protein | <i>P. brasiliensis</i> /CN244805* | 1e-23 | – | 1 |
| | Conserved hypothetical protein | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/PAAG_08269.1† | 4e-24 | – | 1 |
| | Conserved hypothetical protein | <i>Ajellomyces capsulatus</i> /XP_001537205.1* | 2e-12 | – | 1 |
| | Hypothetical protein | No hits found | – | – | 1 |
| | Hypothetical protein | <i>Neurospora crassa</i> /XP_001728522.1* | 1e-10 | – | 1 |
| Total | | | | | 35 |

3.2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of aromatic-L-amino-acid decarboxylase (*PbDDC*), lumazine synthase (*PbLS*) and high affinity copper transporter (*PbCTR3*)

We selected the cDNAs encoding *Pbddc*, *Pbls* and *Pbctr3* for further analysis. The entire cDNA encoding *Pbddc* consisted of 2371 bp and encoded a protein of 545 amino acids, predicted molecular mass of 60 kDa and *pI* of 6.5. The cDNA sequence encoding *PbDDC* had been deposited on GenBank under accession number ABH03461. The deduced amino acid sequence displayed strong identity to DDCs of fungal origin. The alignment of *PbDDC* with pathogenic fungi orthologues is presented in [Supplementary Fig. S1](#).

The analysis of *Pbls* showed a single open reading frame (ORF) with 174 amino acids with a molecular mass prediction

of 19 kDa and *pI* of 6.6. The cDNA and genomic sequences encoding *Pbls* had been deposited on GenBank under accession numbers DQ081183 and DQ186604, respectively. The sequence of amino acid encoding *Pbls* was compared with orthologues of fungi ([Supplementary Fig. S2](#)).

The analysis of *Pbctr3* demonstrated a single ORF with 193 amino acids, with a predicted molecular mass of 21 kDa and *pI* of 8.6 ([Supplementary Fig. S3](#)). The cDNA encoding *Pbctr3* had been deposited on GenBank under accession number DQ534496.

3.3. Reactivity of *PbDDC*, *PbLS* and *PbCTR3* to sera of PCM patients

The expression of the recombinant *PbDDC* and *PbLS* was obtained. SDS-PAGE was used to verify the composition of

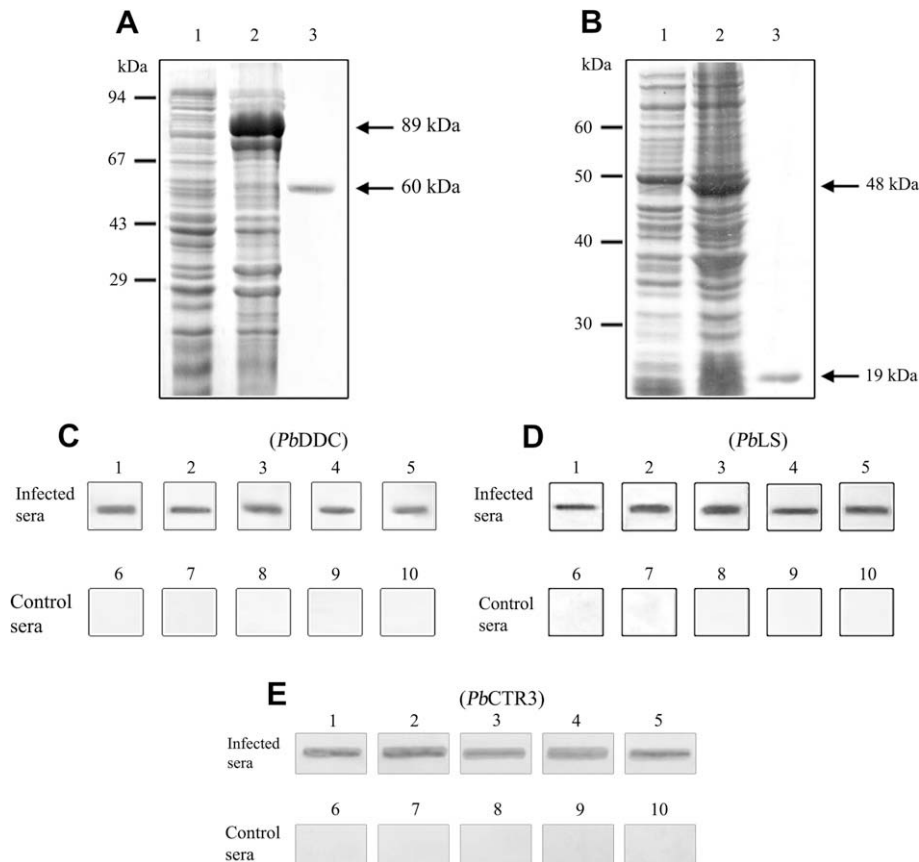


Fig. 1. Reactivity of the recombinant *PbDDC* and *PbLS* and of the synthetic peptide of *PbCTR3* with sera of PCM patients. The nucleotide sequences of the *Pbddc* oligonucleotide primers were sense 5'-GGATCCATGGACCAGGAAGAATTTCAG-3' and antisense 5'-CTCGAGCTAGTTTTTCACAGCCCTGC-3', which contained engineered *Bam*HI and *Xho*I restriction sites (italicized), respectively. The oligonucleotide primers for *Pbls* were sense 5'-TGGTGAATTCATGGC-TACTCTCAAAGG-3', and antisense 5'-GGTGGTCTCGAGCTACGAAAACCTCCCATG-3', which contained engineered *Eco*RI and *Xho*I restriction sites (italicized), respectively. The PCR products were digested with the cited restriction enzymes, electrophoresed on agarose gel cloned into pGEX-4T-3, and used to transform *E. coli* cells. (A) SDS-PAGE analysis of *P. brasiliensis* recombinant DDC. The *E. coli* cells harboring the pGEX-4T-3-*ddc* plasmid were grown to an A_{600} of 0.6 and harvested before (lane 1), and after 16 h (lane 2) incubation with 0.5 mM IPTG at 15 °C; the affinity-isolated recombinant *PbDDC* after thrombin addition and protein purification by affinity chromatography (lane 3). (B) Induced bacterial cells of *E. coli* harboring the pGEX-4T-3-*ls* plasmid were grown at 15 °C to an A_{600} of 0.6 and harvested before (lane 1) and after 16 h incubation with IPTG, at 15 °C (lane 2). The purified recombinant protein was obtained after thrombin digestion and affinity chromatography (lane 3). (C and D) Immunoblot analyses of the recombinant proteins. The recombinant *PbDDC* and *PbLS* (1.0 µg) were reacted with sera of five PCM patients (1:1000 diluted), (lanes 1–5) and to control sera (1:1000 diluted), (lanes 6–10). (E) Reactivity of the synthetic peptide from *PbCTR3* with the same sera as in C and D. A peptide was synthesized from amino acids 90–130 in the deduced *PbCTR3* (Invitrogen, life technologies). One hundred ng of the synthetic peptide was blotted onto nitrocellulose membrane and reacted with sera from PCM patients and with control sera. After reaction with anti-human IgG alkaline phosphatase coupled antibody (1:2000 diluted), the reaction was developed with BCIP/NBT. Molecular mass of the proteins and standards (kDa) are indicated.

the cells lysates obtained from *E. coli* cells which had been transformed with the plasmid constructs, as shown in Fig. 1A and B, lane 1. After induction with IPTG, 89-kDa and 48-kDa recombinant proteins were detected in the bacterial lysates (Fig. 1A and B, lane 2), respectively, for *PbDDC* and *PbLS*, which included the vector-encoded fusion protein at its N-terminus. The fusion proteins were cleaved by the addition of thrombin protease (Fig. 1A and B, lane 3). As observed, highly purified proteins were obtained, that migrated on SDS-PAGE as a single species of 60 kDa and 19 kDa, for *PbDDC* and *PbLS*, respectively. A peptide was synthesized toward amino acids 90–130 of the deduced *PbCTR3* (Supplementary Fig. S3).

Five sera samples from PCM patients and five control sera samples were reacted with the recombinant proteins *PbDDC* and *PbLS* and with the synthetic peptide of *PbCTR3* in immunoblot assays (Fig. 1C–E, respectively). Strong reactivity was observed with sera of PCM patients (Fig. 1C–E, lanes 1–5) and no cross-reactivity was observed with control sera (Fig. 1C–E, lanes 6–10).

3.4. Assessment of the expression of *Pbddc*, *PbIs* and *Pbctr3* by reverse transcription real-time PCR in models of infection

The expression of the genes in a macrophage model of infection is shown in Fig. 2A. In our study, the genes are induced in yeast cells, when compared to mycelia. During macrophage infection, it was detected overexpression of *Pbddc* and *Pbctr3*,

when compared to the expression in the mycelium and yeast cells after in vitro growth. Although expressed during macrophage infection, *PbIs* was not upregulated in vivo relative to the highest level of expression in vitro (Fig. 2A).

The expression of the genes was also evaluated by qRT-PCR analysis in yeast cells of *P. brasiliensis* derived from infected mice liver and spleen (Fig. 2B). We have shown that *Pbddc* is upregulated in vivo, with the expression occurring at 15 days post inoculation in spleen, but not in liver (Fig. 2B). We have also shown that *Pbctr3* is upregulated in liver and spleen (Fig. 2B). Of the genes characterized by qRT-PCR, *PbIs* was not overexpressed in vivo relative to the highest level of expression in vitro (Fig. 2B).

3.5. Melanin accumulation in yeast cells of *P. brasiliensis*

We directed our experiments toward the analysis of melanin accumulation in *P. brasiliensis*. The fungus was grown on a chemically defined medium supplemented or not with L-Dopa (Fig. 3). The viability was of 62.5% and 75.7%, respectively, for yeast cells grown in media enriched or not with L-Dopa (data not shown). Light microscopy (400× magnification) shows darkly pigmented yeast cells in the presence of L-Dopa (Fig. 3A, panel 2). The accumulation of melanin and DDC were higher when the fungus was grown in medium supplemented with L-Dopa (Fig. 3B and C, respectively). Loading control was performed with the antibody to the recombinant triosephosphate isomerase [17].

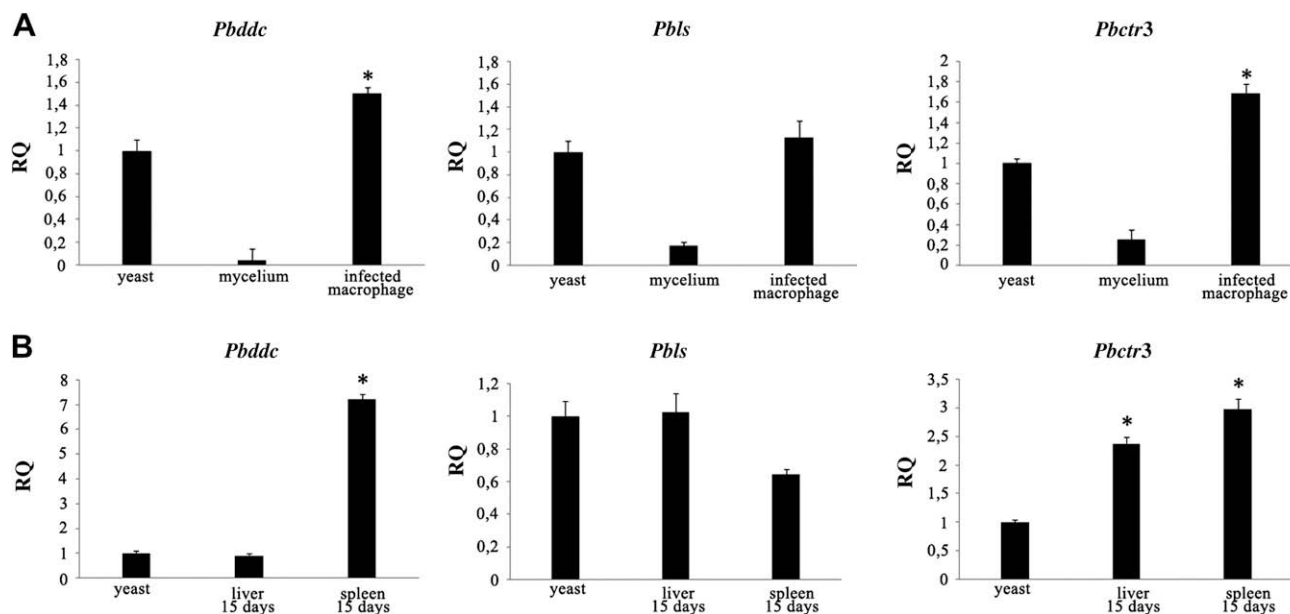


Fig. 2. Average of gene expression of *Pbddc*, *Pbls* and *Pbctr3* as determined by quantitative real time RT-PCR. (A) qRT-PCR plot of *Pbddc*, *Pbls* and *Pbctr3* expression levels in mycelium, yeast cells and in a macrophage model of infection. (B) qRT-PCR plot of *Pbddc*, *Pbls* and *Pbctr3* expression in yeast cells derived from infected tissues of mice. The primers were as following: *Pbddc*, sense 5'-GTACCTTCGTCTCTTCTTC-3', antisense 5'-GGGTAAGTCACACAAGAGGG-3'; *Pbls*, sense, 5'-GCCTATTGCTATGGAGAGAATA-3', antisense, 5'-GTTGACGGTGTGAATGAGG-3'; *Pbctr3* sense, 5'-ATGTGAAGC AGCGAGCGG-3', antisense 5'-CATGGAATGCACGGCGGC-3' *Pbl34*, sense, 5'-CGGCAACCTCAGATACCTTC-3', antisense 5'-GGAGACCTGGGAGTATTCAC-3'. The values of expression of the *Pbddc*, *Pbls* and *Pbctr3* were standardized using the values of expression of the constitutive gene encoding to the ribosomal protein L34. The expression level was calculated by relative standard curve method. The standard deviations are presented from three independent experiments. *Significantly increased expression ($P \leq 0.05$).

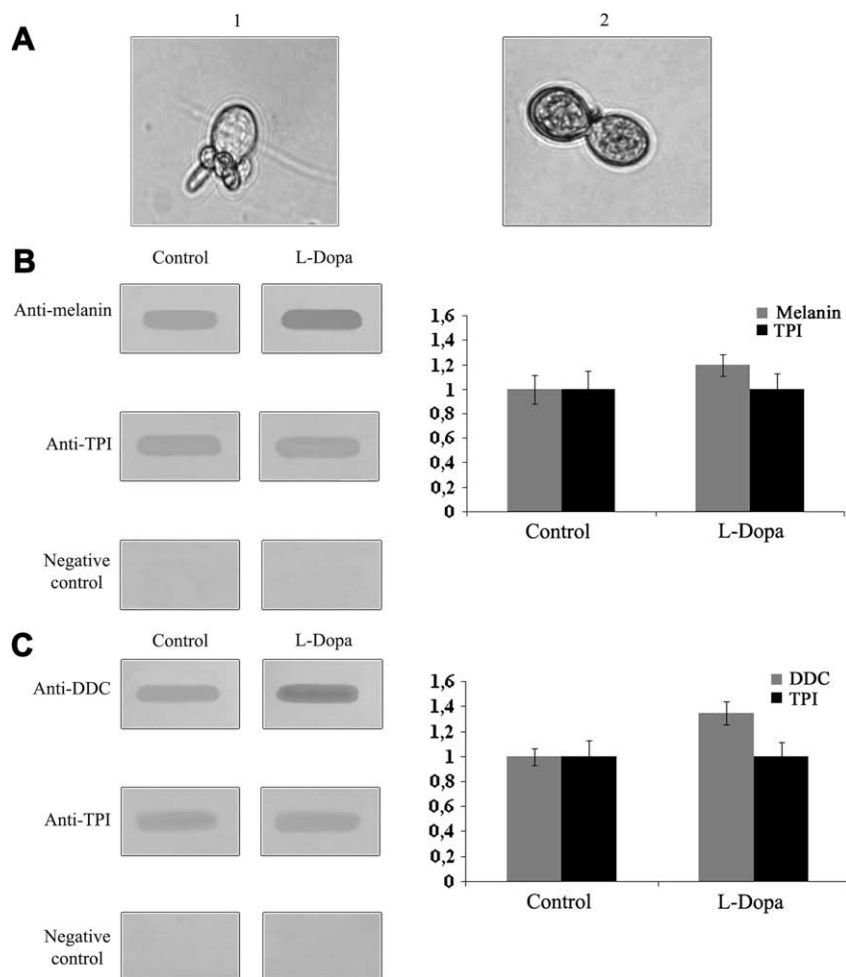


Fig. 3. Analysis of melanization of *P. brasiliensis* yeast cells. A – Light microscopy (400 \times magnification) of *P. brasiliensis* yeast cells grown in chemically defined liquid medium (1) or the same medium supplemented with L-Dopa (2). B – Dot blot analysis of cellular extracts of *P. brasiliensis* grown in same conditions and reacted with antibody anti-melanin of *S. schenckii* (B) or (C) anti-*Pb*DDC. The antibody to the antigen triosephosphate isomerase (*Pb*TPI), was used as the loading control. The analysis of relative differences were performed by using the Scion Image Beta 4.03 program. In the graphics, the black bars represent the reaction to the antibody anti-*Pb*TPI and the gray bars represent the reaction with the antibodies anti-melanin or anti-*Pb*DDC. The standard deviations are presented from three independent experiments.

4. Discussion

Our objective in the present work was uncovering antigenic proteins that could be expressed during infection with *P. brasiliensis*. Sera from PCM patients were pooled and reacted with in vitro-grown *P. brasiliensis*. Antibodies that remain in these sera should be reactive with proteins expressed by the pathogen during the natural infection, as described in other organisms [6–11].

Screening of the *P. brasiliensis* cDNA library with sera from individuals with active PCM resulted in the identification of 35 clones encoding putative immunogenic proteins. Sequence analysis of the reactive clones in the present study identified genes varying from cell metabolism, transport, energy, transcription, protein fate, signal transduction and control of cellular organization, as well as unknown functions. Among the identified transcripts, some encoded molecules presumably present at the fungal cell wall such as high affinity copper transporter, siderophore receptor, carboxylate/amino acid/amine transporter and ABC transporter. Interestingly, some of the identified

cDNAs encoded proteins described as immunogenic in organisms, such as DDC [18], acetyl-CoA acetyltransferase [19], LS [20], alcohol dehydrogenase [21]. LS is an enzyme of the family 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase, which catalyzes the penultimate step of synthesis of vitamin B₂ (riboflavin). Plants, bacteria and fungi are vulnerable to inhibitors of the synthesis of riboflavin. The lack of such a homologue in humans suggests that *Pb*LS may serve as antifungal drug target, as described [22].

To further confirm the validity of the screening strategy in identifying *P. brasiliensis* antigens potentially relevant to the fungal infection, we selected *Pb*DDC, *Pb*LS and *Pb*CCTR3 for further analysis. The recombinant proteins *Pb*DDC and *Pb*LS, as well as the synthetic peptide of *Pb*CCTR3 were recognized by sera of PCM patients, validating the IVIAT strategy here employed. LS is an immunogenic molecule and an useful marker in the serological diagnosis of brucellosis in human beings and animals [23].

We selected *Pb*ddc, *Pb*ls and *Pb*cctr3 to follow with experiments concerning to gene expression in models of infection. The

transcripts encoding *Pbddc* and *Pbctr3* were overexpressed in fungal yeast cells infecting macrophages and in cells derived from tissues of infected mice. We detected overexpression of the transcript encoding *Pbddc* in yeast cells derived from spleen and not in liver at 15 days postinoculation, which could reflect niche regulation of genes in *P. brasiliensis* microenvironments, as described to fungi [24,25]. Noteworthy, *Pbctr3* was overexpressed in all analyzed conditions corroborating previous transcriptome analysis from our laboratory [3]. This may not be surprising considering the obvious necessity for upregulating copper acquisition during infection [26]. It has long been established that invading pathogens must compete favorably for limited nutrients to both establish and maintain a successful host infection. Studies indicate that copper modulates critical virulence determinants. Genetic analysis in *Cryptococcus neoformans* has demonstrated that a high affinity copper transporter and its corresponding transcriptional regulator are required for infection of the brain [27]. Although expressed in liver and spleen at 15 days postinoculation, *Pbbs* was not upregulated in vivo relative to the highest level of expression in vitro. There are possible explanations for this result. The gene expression could be induced earlier or later during the infectious process and we could have missed the time at which the expression increased relative to the in vitro growth. Additionally, the amount of RNA could not reflect the amount of protein if the gene regulation occurs at posttranscriptional level. Further investigation will be required.

The fungus *P. brasiliensis* is known to make Dopa-melanin from L-Dopa [28,29]. The production of melanin-like pigments by *P. brasiliensis* protects the fungus from phagocytosis and increases its resistance to antifungal drugs [29]. We verified in this work a correlation between increase in melanin accumulation and *PbDDC* in yeast cells incubated in the presence of L-Dopa, which resulted in the presence of dark pigment by yeast cells. The results suggest that *PbDDC* could be involved in the melanin biosynthesis pathway.

In conclusion, the present study has shown the successful application of IVIAT in the identification of *P. brasiliensis* genes expressed during fungal infection. The identified genes ranged from those involved in metabolic pathways to those with unknown function. The study of the identified genes could improve our understanding of the adaptative mechanisms used by *P. brasiliensis* in the infectious process.

Acknowledgments

This work at Universidade Federal de Goiás was supported by grants from FINEP, CNPq, and SECTEC-GO, FAPEG.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.micinf.2009.05.009.

References

- [1] A. Restrepo, J.G. Mc Eween, E. Castaneda, The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.* 39 (2001) 233–241.
- [2] E. Brummer, E. Castañeda, A. Restrepo, Paracoccidioidomycosis: an update, *Clin. Microbiol. Rev.* 6 (1993) 89–117.
- [3] A.M. Bailão, A. Schrank, C.L. Borges, V. Dutra, E.E.W.I. Molinari-Madlum, M.S.S. Felipe, M.J.S. Mendes-Giannini, W.S. Martins, M. Pereira, C.M.A. Soares, Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis, *Microbes Infect.* 8 (2006) 2686–2697.
- [4] A.M. Bailão, A. Shrank, C.L. Borges, J.A. Parente, V. Dutra, M.S.S. Felipe, R.B. Fiúza, M. Pereira, C.M.A. Soares, The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51 (2007) 43–57.
- [5] M. Costa, C.L. Borges, A.M. Bailão, G.V. Meirelles, Y.A. Mendonça, S.F.I.M. Dantas, F.P. Faria, M.S.S. Felipe, E.E.W.I. Molinari-Madlum, M.J.S.M. Giannini, R.B. Fiúza, W.S. Martins, M. Pereira, C.M.A. Soares, Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction, *Microbiology* 153 (2007) 4194–4207.
- [6] S. Cheng, C.J. Clancy, M.A. Checkley, M. Handfield, J.D. Hillman, A. Progulske-Fox, A.S. Lewin, P.L. Fidel, M.H. Nguyen, Identification of *Candida albicans* genes induced during thrush offers insight into pathogenesis, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 1275–1288.
- [7] L. Hang, M. John, M. Asaduzzaman, E.A. Bridges, C. Vanderspurt, T.J. Kim, R.K. Taylor, D.J. Hillman, A. Progulske-Fox, M. Handfield, E.T. Ryan, S.B. Calderwood, Use of in vivo-induced antigen technology (IVIAT) to identify genes uniquely expressed during human infection with *Vibrio cholerae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 8508–8513.
- [8] J. Richardson, J.C. Craighead, S.L. Cao, M. Handfield, Concurrence between the gene expression pattern of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized aggressive periodontitis and in human epithelial cells, *J. Med. Microbiol.* 54 (2005) 497–504.
- [9] M. John, I.T. Kudva, R.W. Griffin, A.W. Dodson, B. McManus, B. Krastins, D. Sarracino, A. Progulske-Fox, J.D. Hillman, M. Handfield, P.I. Tarr, S.B. Calderwood, Use of in vivo-induced antigen technology for identification of *Escherichia coli* O157:H7 proteins expressed during human infection, *Infect. Immun.* 73 (2005) 2665–2679.
- [10] K.Y. Salim, D.G. Cvitkovitch, P. Chang, D.J. Bast, M. Handfield, J.D. Hillman, J.C. Azavedo, Identification of group A *Streptococcus* antigenic determinants upregulated in vivo, *Infect. Immun.* 73 (2005) 6026–6038.
- [11] J.B. Harris, A. Baresch-Bernal, S.M. Rollins, A. Alam, R.C. LaRocque, M. Bikowski, A.F. Peppercorn, M. Handfield, J.D. Hillman, F. Qadri, S.B. Calderwood, E. Hohmann, R.F. Breiman, W.A. Brooks, E.T. Ryan, Identification of in vivo-induced bacterial protein antigens during human infection with *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Infect. Immun.* 74 (2006) 5161–5168.
- [12] J. Sambrook, D.W. Russel (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- [13] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T₄, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [14] A.H. Fortier, L.A. Falk, Isolation of mice macrophages, in: J.E. Coligan, B.E. Bierer, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, P. Brown (Eds.), *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, 2007, pp. 14.1.1–14.1.9.
- [15] A.L. Bookout, C.L. Cummins, D.J. Mangelsdorf, J.M. Pesola, M.F. Kramer, High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR, in: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 2006, pp. 15.8.1–15.8.28.
- [16] A. Restrepo, B. Jiménez, Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium, *J. Clin. Microbiol.* 12 (1980) 279–281.

- [17] L.A. Pereira, S.N. B ao, M.S. Barbosa, J.L.M. Silva, M.S.S. Felipe, J.M. Santana, M.J.S. Mendes-Giannini, C.M.A. Soares, Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesion function, *FEMS Yeast Res.* 8 (2007) 1381–1388.
- [18] E. Bratland, A.S.B. Wolff, J. Haavik, O. K ampe, F. Sköldberg, J. Perheentupa, G. Bredholt, P.M. Knappskog, E.S. Husebye, Epitope mapping of human aromatic L-amino acid decarboxylase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353 (2007) 692–698.
- [19] Y. Sakolvaree, S. Maneewatch, S. Jiemsup, B. Klavysing, P. Tongtawe, P. Srimanote, P. Saengjaruk, S. Banven, P. Tapchaisri, M. Chonsa-nguan, W. Chaicumpa, Proteome and immunome of pathogenic *Leptospira* spp. revealed by 2DE and 2DE-immunoblotting with immune serum, *Asian. Pac. J. Allergy. Immunol.* 25 (2007) 53–73.
- [20] D. Bellido, P.O. Craig, M.V. Mozgovej, D.D. Gonzales, A. Wigdorovitz, F.A. Goldbaum, M.J. Dus Santos, *Brucella* spp. lumazine synthase as a bovine rotavirus antigen delivery system, *Vaccine* 27 (2009) 136–145.
- [21] A. Pitarch, J. Abian, M. Carrascal, M. Sánchez, C. Nombela, C. Gil, Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies, *Proteomics* 4 (2004) 3084–3106.
- [22] E. Morgunova, W. Meining, B. Illarionov, I. Haase, G. Jin, A. Bacher, M. Cushman, M. Fischer, R. Landenstein, Crystal structure of lumazine synthase from *Mycobacterium tuberculosis* as a target for drug design: binding mode of a new class of purintrione inhibitors, *Biochemistry* 44 (2005) 2746–2758.
- [23] P.C. Baldi, M.M. Wanke, M.E. Loza, N. Monachesi, C.A. Fossati, Diagnosis of canine brucellosis by detection of IgG antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella* spp, *Vet. Microbiol.* 57 (1997) 273–281.
- [24] C.J. Barelle, C.J. Priest, D.M. Mac-Calum, N.A. Gow, F.C. Odds, A.J. Brown, Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen, *Cell. Microbiol.* 8 (2006) 961–971.
- [25] B. Enjalbert, D.M. Mac-Calum, F.C. Odds, A.J. Brown, Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*, *Infect. Immun.* 745 (2007) 2143–2151.
- [26] A.M. Prentice, H. Ghattas, S.E. Cox, Host-pathogen interactions: can micronutrients tip the balance? *J. Nutr.* 137 (2007) 1334–1337.
- [27] S.R. Waterman, M. Hacham, G.X. Hu, Y.D. Park, S. Shin, J. Panepinto, T. Valyi-Nagy, C. Beam, S. Husain, N. Singh, P.R. Williamson, Role of CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 794–802.
- [28] B.L. Gomez, J.D. Nosanchuk, S. Diez, S. Youngchim, P. Aisen, L.E. Cano, A. Restrepo, A. Casadevall, A.J. Hamilton, Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection, *Infect. Immun.* 69 (2001) 5760–5767.
- [29] M.B. Silva, A.F. Marques, J.D. Nosanchuk, A. Casadevall, L.R. Travassos, C.P. Taborda, Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility, *Microbes Infect.* 8 (2006) 197–205.



British Mycological
Society promoting fungal science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/funbio



Identification, characterization and regulation studies of the aconitase of *Paracoccidioides brasiliensis*

Wesley de A. BRITO^{a,b}, Tereza Cristina V. REZENDE^a, Ana Flávia PARENTE^a,
Carlos André O. RICART^c, Marcelo V. de SOUSA^c, Sônia N. BÁO^c,
Célia Maria de A. SOARES^{a,*}

^aLaboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

^bLaboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás, Brazil

^cInstituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 October 2010

Received in revised form

2 February 2011

Accepted 11 February 2011

Available online 22 February 2011

Corresponding Editor: Simon V. Avery

Keywords:

Aconitase

Carbon sources

Cellular localization

Mass spectrometry

Paracoccidioides brasiliensis

Recombinant protein

ABSTRACT

A protein species preferentially expressed in yeast cells with a molecular mass of 80 kDa and isoelectric point (pI) of 7.79 was isolated from the proteome of *Paracoccidioides brasiliensis* and characterized as an aconitase (ACO) (E.C. 4.2.1.3). ACO is an enzyme that catalyzes the isomerization of citrate to isocitrate in both the Krebs cycle and the glyoxylate cycle. We report the cloning and characterization of the cDNA encoding the ACO of *P. brasiliensis* (PbACO). The cDNA showed a 2361 bp open reading frame (ORF) and encoded a predicted protein with 787 amino acids. Polyclonal antibodies against the purified recombinant PbACO was obtained in order to analyze the subcellular localization of the molecule in *P. brasiliensis*. The protein is present in the extracellular fluid, cell wall enriched fraction, mitochondria, cytosol and peroxisomes of yeast cells as demonstrated by western blot and immunocytochemistry analysis. The expression analysis of the *Pbaco* gene was performed by quantitative real-time RT-PCR and results demonstrated an increased expression in yeast cells compared to mycelia. Real-time RT-PCR assays was also used to evaluate the *Pbaco* expression when the fungus grows on media with acetate and ethanol as sole carbon sources and in different iron levels. The results demonstrated that *Pbaco* transcript is over expressed in acetate and ethanol as sole carbon sources and in high-iron conditions.

© 2011 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Paracoccidioides brasiliensis is the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM), the most prevalent systemic mycosis in Latin America, with the mostly of reported cases in Brazil. Due its high prevalence and severe interference in the patient's quality of life, PCM is considered an important public health problem. This fungus is found as mycelia (M) at 22 °C or in the

environment and as yeast (Y) at 37 °C and in host tissues. On both *in vitro* experiments and in the establishment of infection the dimorphic transition from the mycelia to the yeast cells occurs by the temperature shifting involving the differential expression of several genes (Restrepo 2006; Brummer *et al.* 1993).

An increased expression of aconitase (ACO) and several other enzymes was early described in yeast cells when compared to the mycelia phase of *P. brasiliensis* (Kanetsuna &

* Corresponding author. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas II, Laboratório de Biologia Molecular, sala 206, Campus II Samambaia, 74690-900 Goiânia, Goiás, Brazil. Tel./Fax: +55 62 35211110.

E-mail address: celia@icb.ufg.br

1878-6146/\$ – see front matter © 2011 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.funbio.2011.02.011

Carbonell 1966). The ACO (EC 4.2.1.3 – citrate [isocitrate] hydro-lyase) was initially described as the enzyme that plays role in the second step of Krebs cycle, catalyzing the citric acid to isocitric acid conversion, which results in molecules that produce energy and essential precursors for amino acids, fatty acids and carbohydrates anabolism. The ACO of *Saccharomyces cerevisiae* was one of the best characterized. The core of the enzyme is composed of a single polypeptide chain of approximately 80 kDa. It is a conjugate protein containing an iron–sulfur prosthetic group, which acts in both substrate binding to active site and in catalysis. In its inactive form the iron–sulfur center is a Fe_2S_4 system while the active form is a Fe_4S_4 system covalently bound to the protein by three cysteine residues. The fourth iron plays role in catalysis (Villafranca & Mildvan 1972). ACO also catalyzes the conversion of citrate to isocitrate in glyoxylate cycle and also an extra mitochondrial activity was reported for this enzyme (Velot et al. 1999). The precise localization of ACO when it carries out its function in the glyoxylate cycle still remains unknown. Studies with *S. cerevisiae* mutants lacking functional peroxisomes showed that cells can grow with ethanol and acetate as the sole carbon sources. These data suggest that, at least in *S. cerevisiae*, the glyoxylate cycle can work in the cytosol (Kunze et al. 2002).

Several homologous proteins have been described as constituents of the ACO family. In eukaryotes it has been described two ACO isozymes, both catalytically active in isomerization of citrate to isocitrate and probably located in two compartments, the mitochondrial matrix and the cytoplasm. The ACO family also contains a variety of proteins that comprise the iron regulatory proteins, the isopropylmalate isomerase, an enzyme that catalyzes the second step in leucine biosynthesis, and homoaconitase, which acts in the biosynthetic lysine path (Gruer et al. 1997).

In addition to its role in the Krebs and glyoxylate, the ACO functions as an iron regulatory protein by controlling the expression of ferritin and transferrin receptor in mammalian cells. This efficient mechanism involves the participation of untranslated nucleotide sequences forming a secondary structure called iron responsive elements at the 5' or 3' ends of ferritin and transferrin receptor mRNAs. The iron responsive elements when located at the 5' RNA sterically hinder the translation and when present in the 3' end promotes the mRNA stability, making them more resistant to degradation by nucleases and allowing protein synthesis (Narahari et al. 2000).

There are few available data about the PbACO and this fact has motivated this study. Analysis of the expressed sequence tags (ESTs) in the transcriptome of mycelium and yeast cells of *P. brasiliensis* revealed up regulated genes coding for glyoxylate cycle enzymes in the fungal yeast phase (Felipe et al. 2005). The ACO, citrate synthase, isocitrate lyase and malate dehydrogenase transcripts were also identified in *P. brasiliensis* during differentiation from mycelium to yeast cells, pointing to an operating glyoxylate cycle in this process (Bastos et al. 2007). In *P. brasiliensis* yeast cells derived from mice liver the transcripts encoding enzymes involved in anaerobic metabolism were found in elevated levels suggesting that ethanol can become a major source of carbon and that the glyoxylate cycle could be active during the infection process (Costa et al. 2007).

Salem-Izacc et al. (1997) in preliminary proteomics studies, aiming to identify differentially expressed proteins in yeast

and mycelial phases of *P. brasiliensis*, found a prominent protein of 80 kDa, pI 7.79 preferentially expressed in the yeast phase. This work began with the isolation of this protein from the two-dimensional gel and its characterization by partial sequencing of an internal peptide. Comparative studies in databases revealed high homology with mitochondrial ACO in various fungi. Also in this work we characterized the mitochondrial ACO from the proteome of yeast cells of *P. brasiliensis*. The complete cDNA was obtained. The predicted protein presented homology to other well characterized fungi ACOs and a mitochondrial target signal was detected. In order to characterize the PbACO and begin to understand its putative functional roles it was produced a recombinant protein comprehending a partial open reading frame (ORF) of the cDNA and the corresponding polyclonal antibodies were obtained. Western blotting analyses and immunoelectron microscopy were performed and the PbACO showed a widespread distribution, comprehending cell wall, cytosol, mitochondria and peroxisome enriched fractions. The protein is also present in the extracellular fluid. We also investigated the regulation of PbACO at both, protein and transcript levels in mycelia and yeast cells, and also when the fungus was incubated in C2 carbon sources or in different iron levels. Our results suggest that transcript and protein were more abundant in the yeast phase and also when the fungus was incubated in C2 carbon sources or in high-iron conditions.

Material and methods

Growth of *P. brasiliensis*

P. brasiliensis, isolate Pb01 (ATCC MYA 826) was grown at 22 °C in the mycelium form or at 36 °C as yeast, in semisolid Sabouraud dextrose agar medium [4 % (w/v) glucose, 1 % (w/v) peptone, 0.5 % (w/v) yeast extract, 0.1 % (w/v) brain–heart infusion and 1.2 % (w/v) agar] for 7 d. In some experiments the cells were harvested from the media above, washed with water and incubated at 36 °C in modified McVeigh–Morton (MMcM) (Restrepo & Jimenez 1980), during 3 and 24 h, under shaking at 150 rpm. The standard carbon source 1.0 % glucose (w/v) was replaced by 2.8 % (w/v) potassium acetate and 3.0 % (w/v) ethanol. Also, the availability of iron in the culture medium was controlled by addition of 50 μM bathophenanthroline sulfonate (BPS) as chelant agent or 90 μM ferrous ammonium sulfate (3 \times the standard concentration of iron). The cells were utilized for RNA (3 h) and protein extraction (24 h).

Protein extracts preparation

Three kinds of protein extracts were produced, (1) a total cell homogenate, (2) culture supernatant of yeast cells, (3) cell wall protein fraction of yeast cells, described as follows: 1 – A total cell homogenate of yeast cells and mycelium were obtained as described by Fonseca et al. (2001), by disruption of frozen cells using a pestle and mortar in the presence of N α -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 4-chloromercuribenzoic acid (1 mM), leupeptin (20 mM), phenylmethylsulfonyl fluoride (20 mM), iodoacetamine (5 mM) in homogenization buffer (2 mM CaCl_2 , 20 mM Tris–HCl, pH 8.8). The mixture

was centrifuged at 12 000g at 4 °C for 10 min, and the supernatant was stored at -80 °C. 2 – Culture supernatant of yeast cells was obtained after 8 h incubation in liquid minimal medium. The cells were separated by centrifugation at 5000g for 15 min and the supernatants were obtained upon filtering (0.22 µm). The culture supernatants (50 mL) were dialyzed with water during 4 h. Secreted protein fraction was concentrated 100 times by precipitation with ice-cold acetone (v/v) during 16 h, centrifuged at 15 000g for 15 min, washed with 70 % (v/v) ice-cold acetone and resuspended in 25 mM Tris-HCl pH 7.0 (500 µL). 3 – The cell wall enriched fraction was extracted according to Castro *et al.* (2008). Yeast cells were frozen in liquid nitrogen and disrupted using a pestle and mortar. This procedure was carried out until complete cell rupture verified by microscopic analysis and by the failure of cells to grow on Fava Netto's medium. Ground material was lyophilized, weighed and resuspended in 25 µL Tris buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8) for each milligram of dry weight, as described by Damveld *et al.* (2005). The supernatant was separated from the cell wall fraction by centrifugation at 10 000g for 10 min at 4 °C. A new protein extraction was performed with Tris buffer. All the proteins samples above (1, 2 and 3) were precipitated by addition of 10 % (v/v) trichloroacetic acid (TCA), washed with 100 % acetone and processed for one or two-dimensional gel electrophoresis according to Laemmli (1970) and O'Farrell (1975), respectively. Protein concentrations of all the samples were measured by the Bradford method (Bradford 1976) with bovine serum albumin (BSA) as the standard.

Spheroplasts production, subcellular fractionation and isolation of peroxisomes and mitochondria

Yeast cells of *P. brasiliensis* (2×10^8 cells) were harvested, washed, and converted to spheroplasts by digestion with 400 U of lyticase (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO) at 30 °C for 24 h. Spheroplasts membranes were disrupted by homogenization with grinder (dounce homogenizer, tight pestle). Production of spheroplasts and their disruption was monitored by light microscopy. Trypan blue was used to assess spheroplasts viability. All centrifugation procedures for spheroplasts and cell-free extracts were carried out at 4 °C and cells and extracts were kept on ice. The purified peroxisome and mitochondria fractions from yeast cells of *P. brasiliensis* were obtained using the Peroxisome Isolation and Yeast Mitochondria Isolation Kits (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO). The peroxisome and mitochondria enriched fractions were isolated from the spheroplasts homogenate by low and medium speed centrifugation (600g for 10 min; 6500g for 10 min). Density gradient ultracentrifugation was accomplished in agreement with the suppliers using OptiPrep Density Gradient Medium [60 % (w/v) solution of iodixanol in water] at 25 000g for 20 min. The layers containing the purified peroxisomes and mitochondrial fractions were collected and used immediately after preparation, in biochemical and Western blotting experiments. The presence of peroxisomes was determined by measuring the activity of the peroxisomal enzyme marker, catalase (Catalase Assay Kit, Sigma Aldrich) and the presence of mitochondria was determined by measuring the activity of the mitochondrial enzyme marker, cytochrome c oxidase (Cytochrome c Oxidase Assay Kit, Sigma Aldrich) according to the suppliers' methods.

Two-dimensional gel electrophoresis

Isoelectric focusing was carried out on 13-cm immobilized pH gradient gel strips, with a pH range of 3.0–11.0 (Immobiline DryStrip gels, GE Healthcare Biosciences). The strips were rehydrated in 8 M urea, 0.5 % (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), 0.5 % (w/v) immobilized pH gradient (IPG) buffer (GE Healthcare Biosciences), 0.2 % (w/v) dithiotreitol (DTT), and traces of bromophenol blue for 12 h at 20 °C. Isoelectric focusing was performed using the Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System (GE Healthcare Biosciences) at 20 °C at 50 mA/strip in an increasing voltage gradient (500 V for 1 h, 1000 V for 1 h, and 8000 V for 8 h, accumulating a total of 64 000 V), according to the manufacturer instructions. Before the second dimension electrophoresis, the strips were equilibrated twice for 15 min in buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30 % (v/v) glycerol, 2 % (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.002 % (w/v) bromophenol blue in the presence of 10 mg/mL DTT in the first step and 25 mg/mL iodoacetamide in the second step. The second dimension was carried out on a SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical Unit (GE Healthcare Biosciences) at 20 °C on 12 % polyacrylamide gels (13 × 16 cm) for 5 h at 100 V. The proteins were Coomassie blue or silver stained. The images of the gels were obtained by using the ImageScanner II equipment and analyzed with ImageMaster 2D Platinum software (GE Healthcare Biosciences).

Protein identification by amino acid sequencing

A protein species preferentially expressed in yeast cells with a molecular mass of 80 kDa and pI 7.79 was excised from the two-dimensional gels of the yeast *P. brasiliensis* proteome. The protein (200 pmoles) was eluted and digested with the endoproteinase Lys-C. The fragments were separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) and subjected to Edman's degradation. Database searches were performed in order to identify the obtained amino acids sequence.

Protein digestion and mass spectrometry

Protein spots were excised and diced into small pieces. Gel pieces were incubated in 100 µL of acetonitrile (ACN) and dried in a vacuum centrifuge. The gel pieces were then reduced with 10 mM DTT and alkylated with 55 mM iodoacetamide. Supernatant was removed and the gels were washed with 100 µL of ammonium bicarbonate by vortexing for 10 min. Supernatant was removed and gel pieces were dehydrated in 100 µL of a solution containing 25 mM ammonium bicarbonate/50 % ACN, vortexed for 5 min, and centrifuged. This step was repeated. Gel pieces were dried and added of a 12.5 ng/ml trypsin solution followed by rehydration on ice at 4 °C for 10 min. Supernatant was removed, added 25 µL of 25 mM of ammonium bicarbonate and incubated at 37 °C for 16 h. Following digestion the supernatant was placed into a clean tube. To the gel pieces, 50 µL of 50 % ACN/5 % trifluoroacetic acid (TFA) were added. Samples were vortexed for 30 min, sonicated for 5 min, and the solution was combined with the aqueous extraction above. The samples were dried in a vacuum centrifuge and peptides were solubilized in water. The peptides were then spotted onto a matrix assisted

laser desorption/ionization (MALDI) target plate (Waters, Manchester, UK) and left to dry. The peptides were covered with 2 μ L of matrix solution [50 % (v/v) ACN, 0.1 % (v/v) TFA, and 10 mg/mL α -cyano-4-hydroxycinnamic acid]. Peptide mass fingerprinting (PMF) and ion fragmentation (MS/MS) were obtained using a Synapt MALDI-Q-TOF mass spectrometer (Waters, Manchester, UK). Mass spectra were calibrated externally using a peptide, [Glu1]-Fibrinopeptide B (Sigma Aldrich), as standard. Raw data were processed using the Protein Lynx Global Server software (version 2.1, Micromass/Waters). Database searches for protein identification were performed using Mascot software available online (<http://www.matrixscience.com>) against the National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) database (NCBI nr).

Cloning a partial cDNA fragment, heterologous expression and purification of the recombinant PbACO

The cDNA coding a *P. brasiliensis* ACO was obtained from a cDNA library derived from RNAs obtained of mycelium in transition to yeast cells (Bastos et al. 2007). DNA sequencing was performed by using a MegaBACE 1000 sequencer (GE Healthcare, Amersham Biosciences). Blast database searches were performed using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al. 1990). Multiple sequence alignments were performed using CLUSTAL X (Thompson et al. 1997). Aiming at production of the anti-recombinant ACO polyclonal antibodies, a fragment of the cDNA, which encodes amino acids 321–553 was cloned into pGEX-4T-3 (GE Healthcare). The oligonucleotides used are listed in Supplementary Table 1. The obtained plasmid (pGEX-4T-3-ACO) was sequenced in both strands and used to transform *Escherichia coli* DH5 α . The transformed *E. coli* cells were incubated in Luria–Bertani (LB) medium supplemented with 100 μ g/mL of ampicillin, at 37 °C until the log phase was reached ($A_{600} = 0.6$) and the recombinant protein was induced by addition of 0.5 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 4 h. The bacterial cells were harvested by centrifugation at 5000g, resuspended in phosphate buffered saline (PBS) 1 \times and incubated with lysozyme (100 μ g/mL) before sonication (three times of 15 min). The soluble fraction of cell lysate, containing the recombinant fragment of the ACO protein of *P. brasiliensis* fused to glutathione S-transferase (GST-PbACO), was applied to an affinity Glutathione Sepharose™ 4B Resin column (GE Healthcare) under non-denaturing conditions. The fusion protein was cleaved by thrombin protease addition (50 U/mL). A preparative gel electrophoresis (12 % SDS-PAGE) was performed to purify the truncated recombinant protein that was sliced from the gel and further used in the polyclonal antibodies production and Western blot analysis.

Polyclonal antibodies production

The purified ACO polypeptide (300 μ g) was used to produce polyclonal antibodies in BALB/c mouse. Mouse pre-immune serum was obtained and stored at –20 °C. The immunization protocol consisted of an initial injection of 300 μ g of the purified polypeptide in complete Freund's adjuvant and two subsequent injections of the same amount of the antigen in incomplete Freund's adjuvant. Each immunization was

followed by an interval of 14 d. After 14 d of the third immunization, the serum containing polyclonal antibodies anti-PbACO was collected and stored at –20 °C.

Western blotting analysis

The protein extracts resolved by one or two-dimensional gel electrophoresis were transferred to nylon membranes and checked by Ponceau S staining. After blocking with 5 % (w/v) nonfat milk the membranes were incubated with the polyclonal antibodies anti-PbACO (diluted 1:10 000) for 2 h. Negative controls were obtained with mouse pre-immune serum (diluted 1:1000). After reaction with alkaline phosphatase anti-mouse IgG for 2 h, the reaction was developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate–nitroblue tetrazolium (BCIP–NBT).

Transmission electron microscopy and immunocytochemistry

Ultrastructural and immunocytochemistry assays were carried out as described in Barbosa et al. (2006). Transmission electron microscopy was performed using thin sections from yeast cells of *P. brasiliensis* fixed in 2 % (v/v) glutaraldehyde, 2 % (w/v) paraformaldehyde, and 3 % (w/v) sucrose in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2. The samples were post-fixed in solution containing 1 % (w/v) osmium tetroxide, 0.8 % (w/v) potassium ferrioxalate, and 5 mM CaCl₂ in sodium cacodylate buffer, pH 7.2. The material was embedded in Spurr resin (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA). Ultrathin sections were stained with 3 % (w/v) uranyl acetate and lead citrate.

For immunolabeling, yeast cells were fixed in solution containing 4 % (w/v) paraformaldehyde, 0.5 % (v/v) glutaraldehyde, and 0.2 % (w/v) picric acid in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2 for 24 h at 4 °C. Free aldehyde groups were quenched with 50 mM ammonium chloride for 1 h. Block staining was performed in solution containing 2 % (w/v) uranyl acetate in 15 % (v/v) acetone. After dehydration, samples were embedded in LR Gold resin (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA.). Grids were used to collect the ultrathin sections that were incubated for 1 h with the polyclonal antibodies anti-PbACO or with mouse pre-immune serum (diluted 1:100) and subsequently, with the anti-mouse IgG Au conjugated (10-nm average particle size; 1:20 dilution). After, grids were stained and observed with a Jeol 1011 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

RNA isolation and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

RNA was isolated following the Trizol method (GIBCO™ Invitrogen Corporation) according to the supplier's recommendations. The RNA was precipitated with isopropyl alcohol, followed by RNase-free-DNase treatment. To verify the RNA integrity the samples were accessed by use of the A_{260nm}/A_{280nm} ratio, and the rRNA from each treatment was visualized on 1.2 % (w/v) agarose gel electrophoresis. RNA samples were reverse transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA) and oligo (dT)15 primer. Real-time PCR reactions were performed in triplicate, with samples from three independent experiments in StepOnePlus™ real-time PCR (Applied Biosystems Inc.). The PCR thermal cycling

conditions were as follows: 40 cycles at 95 °C for 15 s, 60 °C for 60 s. The SYBR Green PCR mix (Applied Biosystems Inc.) was used in PCRs and each cDNA sample was analyzed in triplicate with each primer pair. The standard curves were generated to confirm a single product, and PCR was performed using an aliquot of cDNA of each sample, serially diluted (1:5 dilution of the original). The data were normalized to the 60S ribosomal protein L34 cDNA (Dantas *et al.* 2009), which were amplified in each set of PCRs experiments. The quantification of relative expression was performed according to the relative standard curve method (Bookout *et al.* 2006). Statistical significance was determined by Student's *t* test, with $p < 0.05$ considered statistically significant. The oligonucleotides utilized in all experiments are listed in Supplementary Table 1.

Results

Identification of the *PbACO*

A protein species preferentially expressed in yeast cells with a molecular mass of 80 kDa and isoelectric point (*pI*) of 7.79 was isolated from the proteome of *P. brasiliensis*. This protein was submitted to digestion with endoproteinase Lys-C and an internal peptide, obtained through HPLC, was characterized by automated Edman degradation. Database searches were performed and the major peptide obtained (SFDISLSHTF-NEPQLQXFK) was identified as a homologue of ACO in *P. brasiliensis*. Comparative analysis was performed between the

peptide and sequences of mitochondrial ACOs from several fungi available in database. The identity values of 100–89 % were observed (Supplementary Table 2).

The complete cDNA coding *PbACO* was obtained from a cDNA library derived from RNA obtained from mycelium to yeast transition (Bastos *et al.* 2007) [<http://192.168.0.5/phor-estwww>]. The deduced amino acid sequence presented 787 residues, with molecular mass of 85.7 kDa and *pI* of 7.12 (Supplementary Fig 1). In the sequence analysis of the deduced *PbACO* protein it was found a mitochondrial targeting signal (MTS) (residues 1–10) according to MitoProt II (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>). Homology analysis between *PbACO* deduced amino acid sequence and related sequences searched in NCBI database showed identity values ranging from 89 % to 93 % to aconitases of *Ajellomyces capsulatus* (GenBank accession number EDN08767), *Coccidioides posadasii* (ABH10644), *Coccidioides immitis* (XP_001247958) and *Aspergillus flavus* (EED56133) (data not shown).

Heterologous expression, purification of the recombinant *PbACO*, polyclonal antibodies production, specific recognition of *P. brasiliensis* ACO by the polyclonal antibodies and comparative analysis of the *Pbaco* gene expression in the mycelium and yeast phases

Aiming at production of polyclonal antibodies, a fragment of the cDNA which encodes amino acids 321–553 of the *P. brasiliensis* ACO was cloned. After induction with IPTG, a 50 kDa

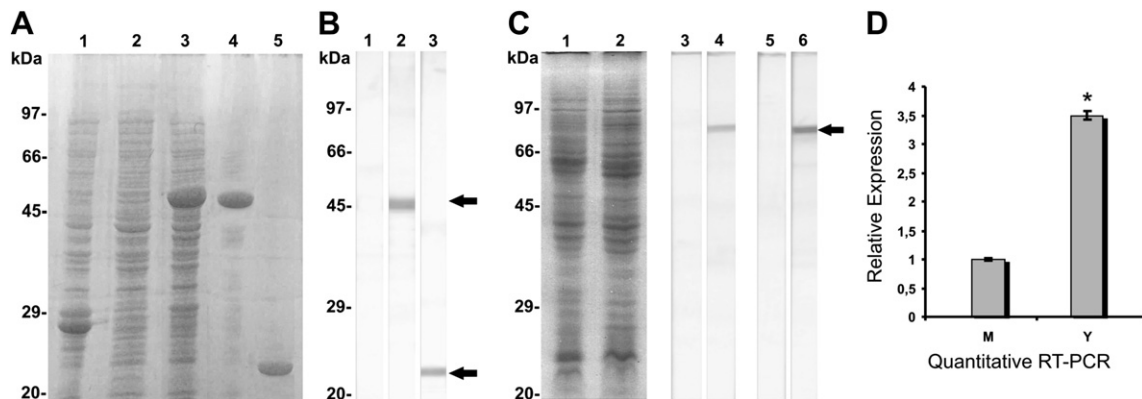


Fig 1 – Heterologous expression, purification of the recombinant *PbACO*, polyclonal antibodies production, specificity of polyclonal antibodies against *PbACO* and comparative analysis of the *Pbaco* gene expression in the mycelium and yeast phases. (A) *E. coli* DH5 α cells harboring the pGEX-4T-3-aco plasmid were grown at 37 °C to an A_{600} of 0.6 and harvested before (lane 2) and after 4 h of incubation with 0.5 mM IPTG (lane 3). Induced *E. coli* cells harboring the pGEX-4T-3 (lane 1). After induction with IPTG, a 50 kDa fusion protein was detected in bacterial lysates. The fusion protein was purified using glutathione-sepharose 4B at 4 °C (lane 4), cleaved by the addition of thrombin protease (50 U/mL) and excised from preparative gels (12 % SDS-PAGE) – lane 5). (B) The fusion and the purified recombinant proteins were electrophoretically separated and transferred to nitrocellulose membranes. Lane 1 – Pre-immune serum reaction with fusion protein. Both proteins (lanes 2 and 3) were detected by the polyclonal antibodies anti-*PbACO* (diluted 1:10 000). After reaction with alkaline phosphatase anti-mouse immunoglobulin G (IgG), the reaction was developed with (BCIP–NBT). Molecular size markers are indicated. (C) The total protein extracts (30 μ g) from mycelium (lanes 1, 3 and 4) and yeast cells (lanes 2, 5 and 6) of *P. brasiliensis* were fractionated by one-dimensional gel electrophoresis (12 % SDS-PAGE) and stained using Coomassie blue (lanes 1 and 2) or transferred to nylon membranes. The membranes were probed with the mouse pre-immune serum (lanes 3 and 5) or the anti-*PbACO* polyclonal antibodies (lanes 4 and 6). Molecular size markers are indicated. (D) Comparative analyses of the *Pbaco* gene expression by qRT-PCR. *Pbaco* gene expression was examined in the mycelium and yeast phases. The data were normalized to the 60S ribosomal protein L34 transcript expression. The quantification of relative expression was performed according to the relative standard curve method and statistical significance was determined by Student's *t* test (* $p < 0.05$).

fusion protein was detected in bacterial lysates, corresponding to the predicted mass of the 24 kDa peptide fused to the GST (Fig 1A, lane 3). The fusion protein was purified through affinity chromatography from bacterial lysates (Fig 1A, lane 4) and was cleaved with thrombin protease followed by *in gel* purification (Fig 1A, lane 5). Total protein extract obtained from *E. coli* cells and the purified recombinant fragment of PbACO overproduced in *E. coli* were electrophoresed, blotted onto membranes and reacted with the polyclonal antibodies anti-PbACO (Fig 1B, lanes 2–3). No cross-reactivity was detected when the fusion protein GST-PbACO was incubated with the mouse pre-immune serum (Fig 1B, lane 1). The purified recombinant fragment of PbACO was recognized as a single protein species of 24 kDa by the polyclonal antibodies (Fig 1B, lane 3).

Total protein extracts of *P. brasiliensis* mycelia and yeast cells were electrophoresed (Fig 1C, lanes 1–2), blotted onto

membranes and reacted with the polyclonal antibody anti-PbACO (Fig 1C, lanes 3–6). A single protein species was detected in the total protein extract of mycelium (Fig 1C, lane 4) and of yeast cells that showed a stronger reaction (Fig 1C, lane 6). No cross-reactivity was detected when the same samples were incubated with the mouse pre-immune serum (Fig 1C, lanes 3, 5).

Comparative analyses of *Pbaco* gene expression were performed by qRT-PCR in the fungal phases. It was observed increased expression of the *Pbaco* gene at the yeast morphology (Fig 1D).

Two-dimensional Western blotting analysis and mass spectrometry

The specific polyclonal antibodies anti-PbACO was used in two-dimensional western blotting procedures with total

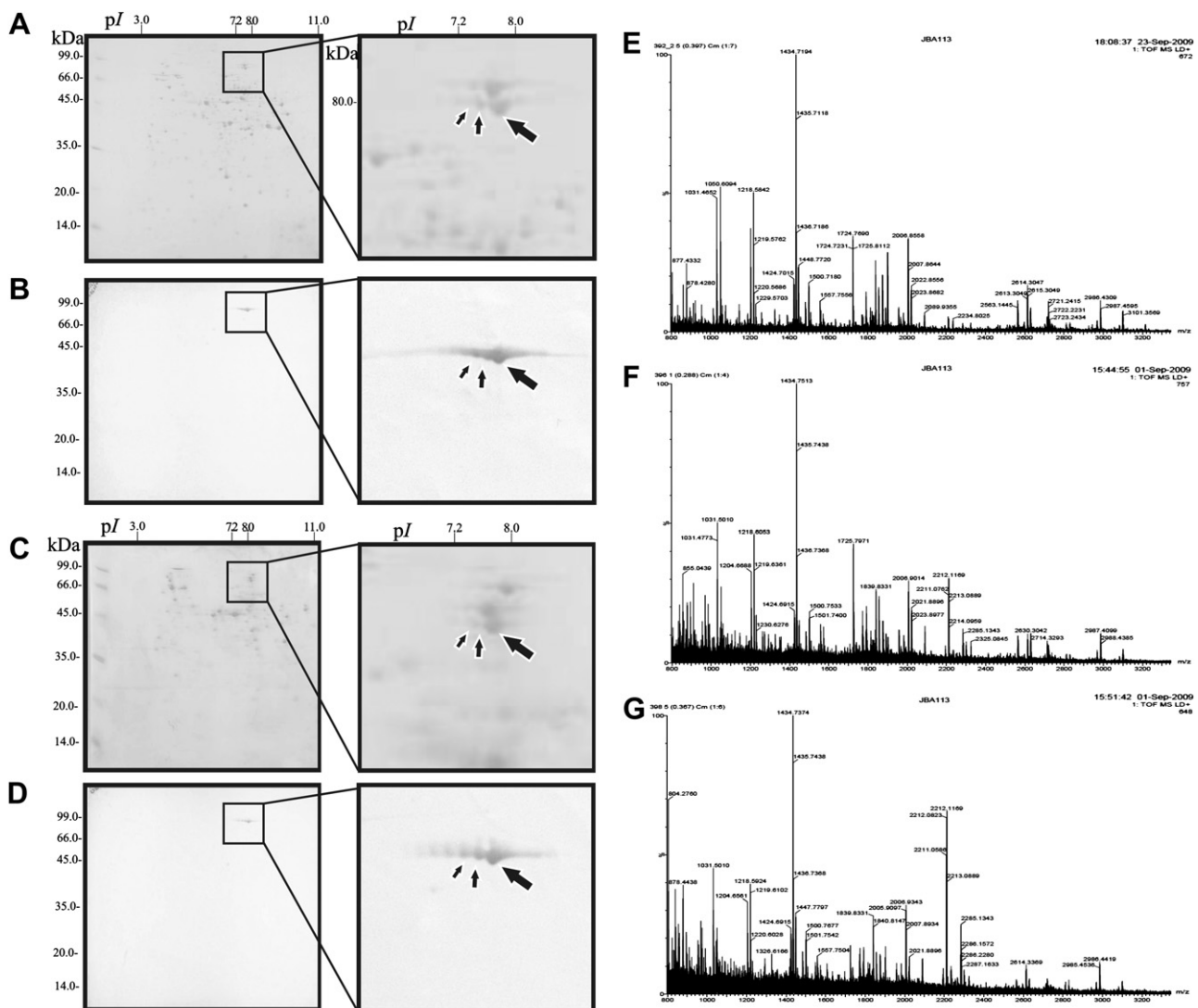


Fig 2 – Two-dimensional Western blotting analysis and mass spectrometry. Two-dimensional gel electrophoresis of total protein extracts from *P. brasiliensis* yeast cells (A and B) and mycelium (C and D). The proteins were stained by Coomassie blue (A and C) or blotted on nylon membrane and reacted to the anti-PbACO polyclonal antibodies (B and D). The square areas of interest in the gels and in the membranes were enlarged and shown at the right of each panel. The arrows indicate the PbACO protein. Numbers to the left of figures refer to the molecular mass. At the top are indicated the isoelectric points. E, F and G-PMF of trypsin digested PbACO isoforms (pI 7.79, 7.65 and 7.52 respectively).

Table 1 – Identification of PbACO by PMF.

| Accession number (NCBI) | pI | PMF | | MS/MS | | Peptides sequences ^a |
|-------------------------|------|-------|--------------|-------------|----------------|---------------------------------|
| | | Score | Coverage (%) | Total score | Peptides score | |
| gi 226293399 | 7.79 | 172 | 33 | 211 | 40 | K.TGEYGPVPATAR.D |
| | | | | | 49 | K.SLFTVTPGSEQIR.A |
| | | | | | 67 | K.WVIGDWNYGEGSSR.E |
| | | | | | 79 | R.SSISVAVSPTSDDLQILK.A |
| gi 226293399 | 7.65 | 146 | 50 | 184 | 56 | R.LNRPLTYAEK.I |
| | | | | | 57 | K.TGEYGPVPATAR.D |
| | | | | | 72 | K.SLFTVTPGSEQIR.A |
| | | | | | 89 | K.WVIGDWNYGEGSSR.E |
| | | | | | 100 | K.QGMLPLTFDTPADYDR.I |
| gi 226293399 | 7.52 | 139 | 43 | 55 | 72 | R.LNRPLTYAEK.I |
| | | | | | 133 | K.IMYSHLDDPHEQDIHR.G |

a Fragmented peptides by MS/MS.

protein extracts of mycelium and yeast cells of *P. brasiliensis*. Three isoforms (pIs 7.52, 7.65 and 7.79) of PbACO protein with molecular mass of approximately 80 kDa were detected in two-dimensional Western blotting assays in both yeast cells (Fig 2 panels A, B) and mycelium (Fig 2 panels C, D). No reaction was detected in the same assays when the membranes were incubated with the pre-immune serum (data not shown). The three spots identified by the specific polyclonal antibodies anti-PbACO were used in MALDI-Q-TOF analysis. A representative spectrum of the tryptic fragments of PbACO protein isoforms is shown in Fig 2E–G illustrating the mass values from the trypsin autolysis products. Mass spectra of the three spots probed with antibodies anti-PbACO successfully identified, by PMF and MS/MS, the protein ACO. Mascot scores show a statistically significant identification of the three isoforms with PMF scores 172, 146 and 139 (Table 1). Similarities in mass spectra among analyzed spots confirmed that they represent the same protein (Fig 2E–G). Ion search corroborates the PMF results, allowing identification of four, five and two ACO tryptic peptides, respectively, with score 211, 184 and 55 (Table 1).

Cellular localization of the *P. brasiliensis* ACO

The cellular localization of the ACO was early approached by immunoelectron microscopy using the specific polyclonal antibodies anti-PbACO (Fig 3). In mycelium and yeast cells the gold particles were diffusely distributed from the cytoplasm to cell wall but it's clearly more abundant in yeast cells (Fig 3C). Protein dual localization in mitochondria and cytosol could be verified (Fig 3C). Control sample exposed to the pre-immune serum was free of label (data not shown). In order to confirm these results the obtained several cellular fractions were evaluated by Western blotting analyses with the same specific polyclonal antibodies anti-PbACO. The obtained spheroplasts of *P. brasiliensis* yeast cells (Supplementary Fig 2) were used in order to isolate the peroxisome and mitochondria purified fractions by density gradient ultracentrifugation. The gradient fractions were analyzed for enzymatic activities of the mitochondrial and peroxisomal marker enzymes cytochrome c oxidase and catalase, respectively (data not shown). A single protein species was detected in secreted proteins purified from culture filtrates, cell wall, mitochondrial and

peroxisomal purified fractions (Fig 3E). Western blotting analysis corroborates the broad distribution of *P. brasiliensis* ACO.

Carbon sources and availability of iron affect both PbACO protein levels and Pbaco gene expression

To elucidate the effect of nutrients in PbACO protein and gene expression, *P. brasiliensis* yeast cells were grown on minimal medium containing glucose, potassium acetate or ethanol as sole carbon sources and in presence of high-iron concentration or iron absence by addition of a chelant agent in liquid minimum medium. The protein extracts were subjected to one-dimensional gel electrophoresis analysis and stained with Coomassie blue (Fig 4A). The samples were blotted onto nylon membranes and analyzed by immunoblotting (Fig 4B). A protein corresponding to approximately 80 kDa was obtained in all conditions. However, significant differences can be observed. A higher protein level was found in cells growing in the presence of potassium acetate or ethanol when compared to the protein level in yeast cells growing in glucose. The addition of iron also promoted higher protein accumulation (Fig 4B). No cross-reactivity to the mouse pre-immune serum was evidenced with the samples (data not shown). RNAs were extracted from yeast cells in the same conditions above and used in qRT-PCR analyses. *PbL34* transcript was amplified as a control. The *Pbaco* transcript level in the presence of glucose and in iron depletion were reduced when compared to other carbon sources and in high-iron levels (Fig 4C) corroborating the observed protein levels. Higher transcript level was observed in yeast cells grown in the presence of acetate and ethanol as carbon sources compared to glucose (Fig 4C). The addition of iron also promoted increased transcript level.

Discussion

In this work the sequence coding to PbACO was obtained from a cDNA library constructed from RNA extracted during the dimorphic transition of *P. brasiliensis* (Bastos et al. 2007). The characterization of the complete cDNA and comparative analysis at the *P. brasiliensis* structural genome database from the Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard

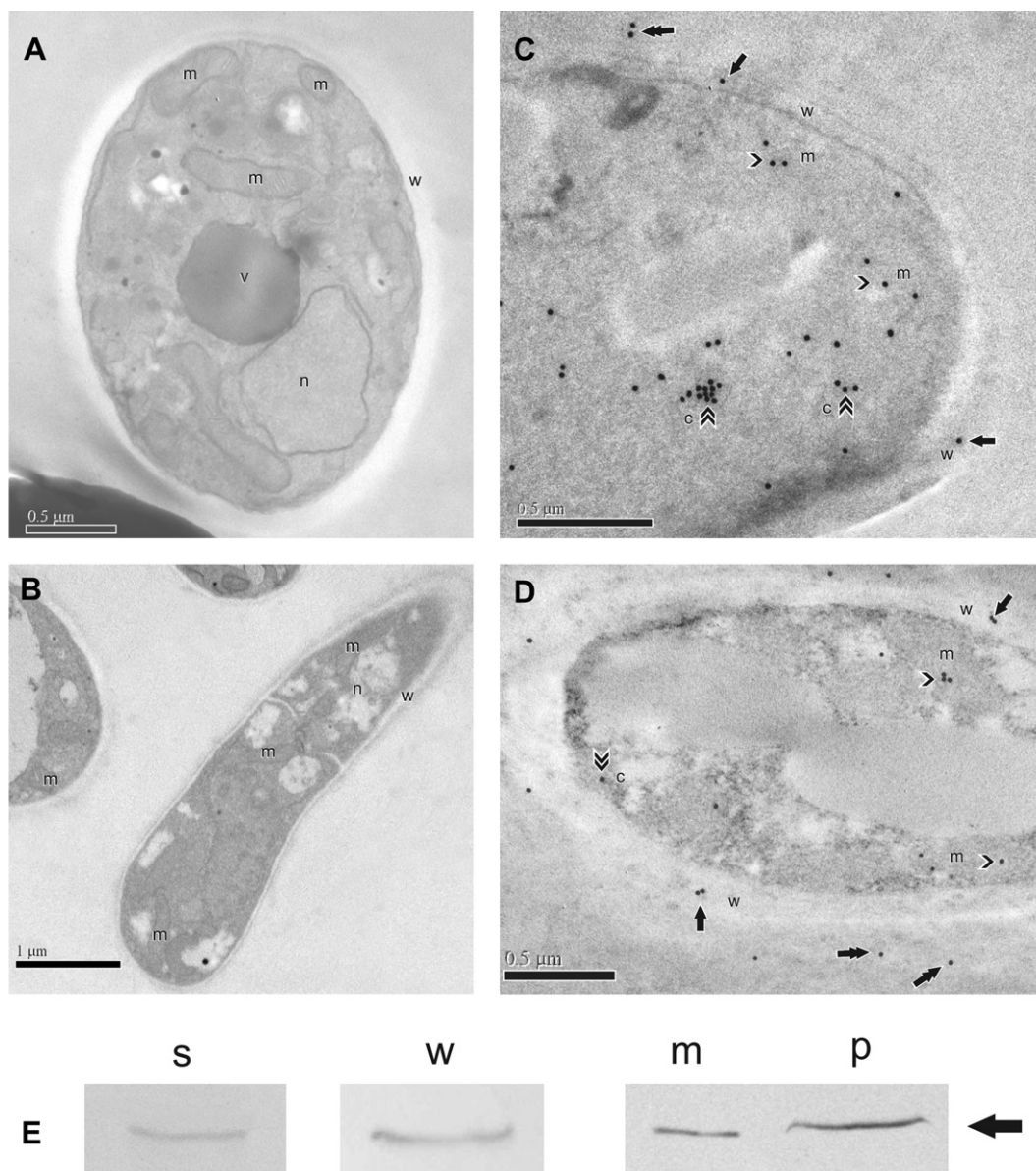


Fig 3 – Immunoelectron microscopy detection of the *PbACO* and Western blotting analysis of cell fractions and secreted proteins obtained from culture filtrates. Transmission electron microscopy of yeast cells (A and C) and mycelium (B and D). v: cytoplasmic vacuole, n: nucleus, w: cell wall, m: mitochondria and c: cytosol. The gold particles were indicated in double arrows (secreted), single arrow (w: cell wall), arrowheads (m: mitochondria) and double arrowheads (c: cytosol). Bars 0.5 μm (A, C and D) and 1.0 μm (B). E – Western blotting analysis: protein extracts were fractionated by SDS-PAGE, blotted onto nylon membranes and reacted with the polyclonal antibodies anti-*PbACO*. s – secreted proteins obtained from culture filtrates; w – cell wall enriched fraction; m – mitochondrial purified fraction and p – peroxisomal purified fraction.

allowed the identification of two homologous genes encoding ACO in the isolates Pb01, Pb03 and Pb18. The analysis demonstrated that the genes encoding *PbACO* in the three isolates depict in the deduced proteins identity values from 99 % to 100 %. Regarding to the other gene encoding ACO it was demonstrated identity values from 96 % to 98 % among the three isolates, comparing the sequences of the deduced proteins. The two deduced ACOs presented identity values from 55 % to 58 %, considering the three isolates.

The analysis of the predicted *PbACO* revealed a protein consisting of 787 amino acids, 85.7 kDa and pI of 7.12.

Considering the removal of the mitochondrial target signal the predicted protein is presumed to be 84.5 kDa, pI 6.85. This apparent small discrepancy between size in the *PbACO* as determined by SDS-PAGE (80 kDa) could be due to several factors, such as areas of incompletely disrupted secondary structure. The predicted protein was highly homologous to ACOs from other fungi. All the amino acids corresponding to the catalytic domain of mitochondrial ACO were found as well as the protein signature. The identification of a MTS indicates that *PbACO* possibly plays its metabolic role in Krebs cycle.

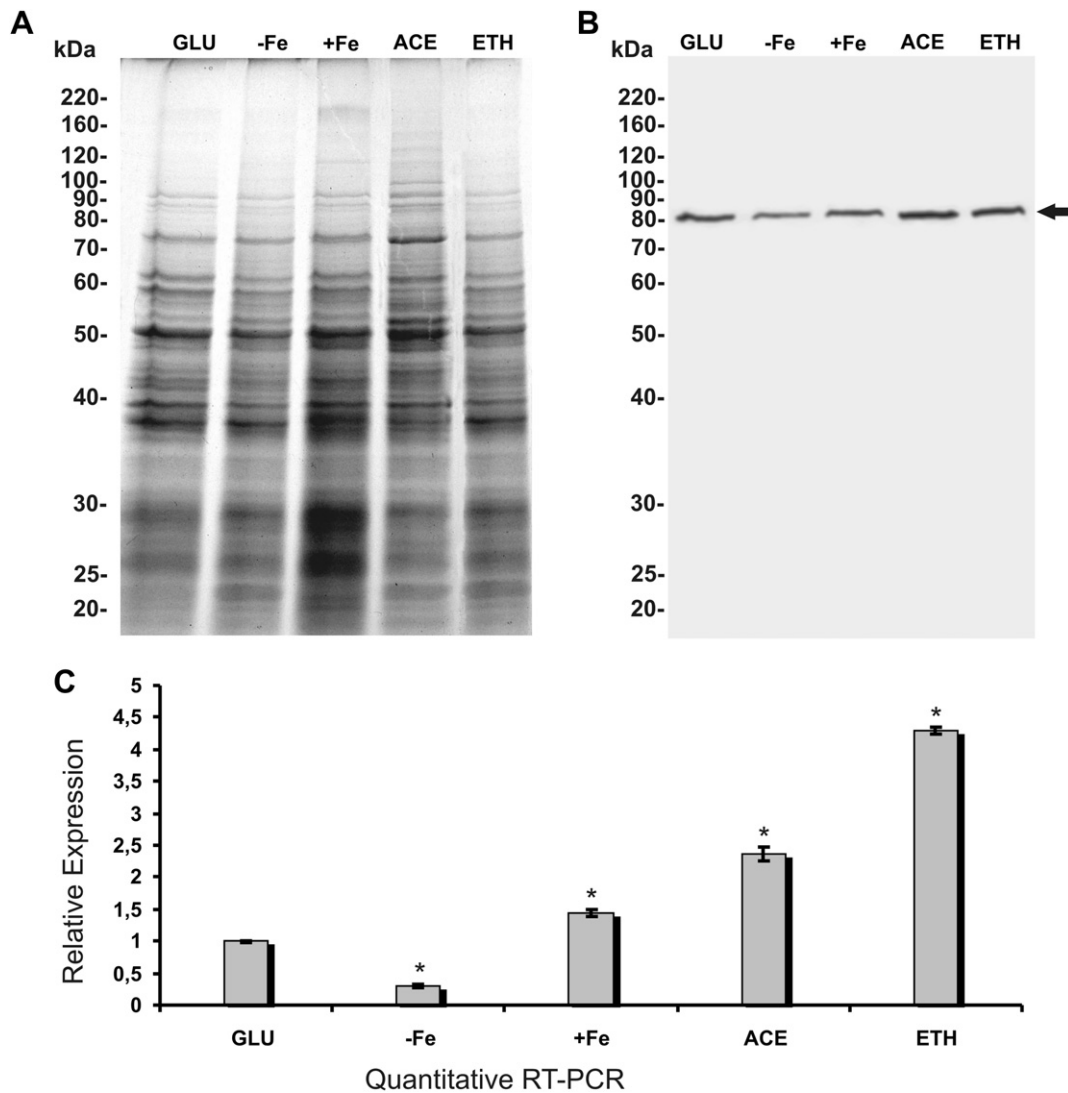


Fig 4 – Carbon sources and availability of iron affect both *PbACO* protein levels and *Pbaco* gene expression. *P. brasiliensis* yeast cells were incubated at 36 °C, during 3 h for RNA extraction and 24 h for protein extraction, with glucose as standard carbon source (GLU). The availability of iron in the culture medium was controlled by addition of 50 μ M BPS as chelant agent (-Fe) or 90 μ M ferrous ammonium sulfate (+Fe). The standard carbon source was replaced by potassium acetate (ACE) and ethanol (ETH). The total protein extracts (30 μ g) were fractionated by one-dimensional gel electrophoresis (12 % SDS-PAGE) and stained using Coomassie blue (A) or transferred to nylon membranes and probed with anti-*PbACO* polyclonal antibodies (B). Numbers the left of figures refer to the molecular mass standard. A single protein species of 80 kDa was detected in all extracts. (C) *Pbaco* gene expression was examined by qRT-PCR under the same conditions above. The data were normalized to the 60S ribosomal protein L34 transcript. The quantification of relative expression was performed according to the relative standard curve method and statistical significance was determined by Student's t test (* $p < 0.05$).

A purified recombinant protein corresponding to amino acid residues 321–553 of the *PbACO* was obtained and used for polyclonal antibodies production in mice. The analysis carried out by Western blotting showed that the obtained antibody was able to recognize both, the recombinant protein of 24 kDa and the native protein in the extracts of mycelia and yeast cells of *P. brasiliensis*, with stronger reaction with yeast cells extracts. Analysis by qRT-PCR showed that the transcript of *Pbaco* increases significantly in yeast cells, suggesting a differential metabolism in fungal stages, as suggested by Felipe *et al.* (2005).

The produced polyclonal antibodies were efficient in the recognition of *PbACO* isoforms by two-dimensional Western

blotting assays. Mass spectrometry analysis identified the protein isoforms as *PbACO*. The observed differences in the isoelectric points between the predicted and the native protein isoforms suggest the apoprotein, [3Fe–4S] and [4Fe–4S] forms of *PbACO*, as demonstrated by Zheng *et al.* (1990).

Immunolocalization assays were performed using the polyclonal anti-ACO antibody, either by transmission electron microscopy or by Western blotting with protein extracts from cell fractions. Electron microscopy assays showed that the protein has a similar localization in yeast cells and in mycelium, being more abundant in yeast cells of *P. brasiliensis*, confirming the data obtained by Western blotting and qRT-PCR.

The expected double location in mitochondria and cytosol was confirmed for the PbACO. Spheroplasts of *P. brasiliensis* were efficiently produced and purified mitochondria and peroxisomes fractions were obtained. Western blotting assays performed with proteins from several cell fractions confirmed the presence of PbACO secreted in the culture filtrate, cell wall, mitochondria and peroxisomes. In eukaryotic cells the phenomenon of dual localization of proteins has been described (Karniely & Pines 2005). Mutants of *S. cerevisiae*, in which mitochondrial target signal (MTS) from ACO and fumarase were exchanged, showed an altered distribution of both proteins, indicating that in addition to protein addressing, the signal sequence may determine the level of retrograde movement of proteins to the cytosol (Regev-Rudzki et al. 2009).

Vesicular secretion is an important mechanism used by many fungi to transport molecules from the intracellular to the extracellular spaces (van Meer & Sprong 2004). In *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* it have been identified putative cytosolic proteins in secretory vesicles (Albuquerque et al. 2008; Nosanchuk et al. 2008; Rodrigues et al. 2008). Studies performed in our laboratory showed the presence of proteins with predicted cytoplasmic localization in other cellular compartments of *P. brasiliensis* cells, such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase – GAPDH (Barbosa et al. 2006), triosephosphate isomerase – TPI (Pereira et al. 2007), and enolase (Nogueira et al. 2010), all located in the cytoplasm and in cell wall. The fact that the enzyme ACO has been found in secreted vesicles by *H. capsulatum* (Albuquerque et al. 2008) corroborates our finding of the PbACO location in cell wall and beyond, in the extracellular space.

Increased expression of genes coding for enzymes of the glyoxylate cycle, isocitrate lyase and malate synthase had been reported in *P. brasiliensis* on poor carbon growth conditions (Zambuzzi-Carvalho et al. 2009). Our results demonstrated that in response to increase of isocitrate demand by the glyoxylate cycle, *P. brasiliensis* depicted a significant increase in levels of PbACO and Pbaco, as demonstrated when the fungus was grown in medium containing acetate and ethanol instead of glucose as carbon source.

The free iron in tissues and fluids of vertebrate hosts is maintained at extremely low levels. The influence of iron deprivation on expression of iron–sulfur proteins has been documented in several systems and may represent a conserved response (Eisenstein & Ross 2003; Kiley & Beinert 2003). An increased expression of ACO under high concentration of iron was reported in *Mycobacterium tuberculosis* (Wong et al. 1999) and in *C. neoformans* (Lian et al. 2005). The mitochondrial PbACO presented at both the transcriptional as translational levels, significant induction in conditions of high-iron concentrations and significant repression in lack of iron. These results reinforce the questioning of the possible role of PbACO in the regulation of iron levels mechanisms.

Acknowledgments

This work at the Universidade Federal de Goiás was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP 0106121200; 0107055200) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 472947/2007-9; 558405/2008-8).

Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at [doi:10.1016/j.funbio.2011.02.011](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.011).

REFERENCES

- Albuquerque PC, Nakayasu ES, Rodrigues ML, Frases S, Casadevall A, Zancope-Oliveira RM, Almeida IC, Nosanchuk JD, 2008. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cellular Microbiology* 10: 1695–1710.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, Feitosa LS, Mendes-Giannini MJ, Soares CMA, 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infection and Immunity* 74: 382–389.
- Bastos KP, Bailão AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MS, Silva MG, Martins WS, Fiuza RB, Pereira M, Soares CMA, 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiology* 7: 29.
- Bookout AL, Cumming CL, Mangelsdorf JD, Pesola JM, Kramer MF, 2006. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, pp. 15.8.1–15.8.28.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A, 1993. *Paracoccidioidomycosis*: an update. *Clinical Microbiology Reviews* 6: 89–117.
- Castro NS, Barbosa MS, Maia ZA, Bão SN, Felipe MS, Santana JM, Soares Mendes-Giannini MJ, Pereira M, Soares CMA, 2008. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* PbDfg5p, a cell-wall protein implicated in filamentous growth. *Yeast* 25: 141–154.
- Costa M, Borges CL, Bailão AM, Meirelles GV, Mendonça YA, Dantas SF, de Faria FP, Felipe MS, Molinari-Madlum EEWI, Mendes-Giannini MJ, Fiuza RB, Martins WS, Pereira M, Soares CMA, 2007. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology* 153: 4194–4207.
- Damveld RA, Arentshorst M, VanKuyk PA, Klis FM, van den Hondel CA, Ram AF, 2005. Characterisation of CwpA, a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall mannoprotein in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology* 42: 873–885.
- Dantas SF, Rezende TCV, Bailão AM, Taborda CP, Santos RS, Castro KP, Soares CMA, 2009. Identification and characterization of antigenic proteins potentially expressed during the infectious process of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infection* 11: 895–903.
- Eisenstein RS, Ross KL, 2003. Novel roles for iron regulatory proteins in the adaptive response to iron deficiency. *Journal of Nutrition* 133: 1510–1516.

- Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jesuino RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CMA, Carvalho MJ, Brigido MM, 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 24706–24714.
- Fonseca CA, Jesuino RS, Felipe MS, Cunha DA, Brito WA, Soares CMA, 2001. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infection* **3**: 535–542.
- Gruer MJ, Artymiuk PJ, Guest JR, 1997. The aconitase family: three structural variations on a common theme. *Trends in Biochemical Sciences* **22**: 3–6.
- Kanetsuna F, Carbonell LM, 1966. Enzymes in glycolysis and the citric acid cycle in the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Bacteriology* **92**: 1315–1320.
- Karniely S, Pines O, 2005. Single translation – dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. *EMBO Reports* **6**: 420–425.
- Kiley PJ, Beinert H, 2003. The role of Fe–S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 181–185.
- Kunze M, Kragler F, Binder M, Hartig A, Guvitz A, 2002. Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. *European Journal of Biochemistry* **269**: 915–922.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lian T, Simmer MI, D'Souza CA, Steen BR, Zuyderduyn SD, Jones SJ, Marra MA, Kronstad JW, 2005. Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology* **55**: 1452–1472.
- Narahari J, Ma R, Wang M, Walden WE, 2000. The aconitase function of iron regulatory protein 1. Genetic studies in yeast implicate its role in iron-mediated redox regulation. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 16227–16234.
- Nogueira SV, Fonseca FL, Rodrigues ML, Mundodi V, Abi-Chacra EA, Winters MS, Alderete JF, Soares CMA, 2010. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infection and Immunity* **78**: 4040–4050.
- Nosanchuk JD, Nimrichter L, Casadevall A, Rodrigues ML, 2008. A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. *Communicative & Integrative Biology* **1**: 37–39.
- O'Farrell PH, 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **250**: 4007–4021.
- Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, Da Silva JLM, Felipe MSS, Santana JM, Maria Mendes-Giannini MJS, Soares CMA, 2007. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Research* **7**: 1381–1388.
- Regev-Rudzki N, Battat E, Goldberg I, Pines O, 2009. Dual localization of fumarase is dependent on the integrity of the glyoxylate shunt. *Molecular Microbiology* **72**: 297–306.
- Restrepo A, 2006. *Coccidioides immitis* Rixford & Gilchrist 1895, y *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore 1912) Almeida 1930: Dos hongos patógenos restringidos al Continente Americano. *La Revista de la Academia Colombiana de Ciencias* **30**: 367–386.
- Restrepo A, Jimenez BE, 1980. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *Journal of Clinical Microbiology* **12**: 279–281.
- Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC, Casadevall A, 2008. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell* **7**: 58–67.
- Salem-Izacc SM, Jesuino RS, Brito WA, Pereira M, Felipe MS, Soares CMA, 1997. Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in stage-specific forms and during cellular differentiation. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **35**: 205–211.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876–4882.
- van Meer G, Sprong H, 2004. Membrane lipids and vesicular traffic. *Current Opinion in Cell Biology* **16**: 373–378.
- Velot C, Lembreton S, Morgunov I, Usher KC, Srere PA, 1999. Metabolic effects of mislocalized mitochondrial and peroxisomal citrate synthases in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **38**: 16195–16204.
- Villafranca JJ, Mildvan AS, 1972. The mechanism of aconitase action. Detection and properties of enzyme-metal-substrate and enzyme-metal-inhibitor bridge complexes with manganese(II) and iron(II). *The Journal of Biological Chemistry* **247**: 3454–3463.
- Wong DK, Lee BY, Horwitz MA, Gibson BW, 1999. Identification of fur, aconitase, and other proteins expressed by *Mycobacterium tuberculosis* under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Infection and Immunity* **67**: 327–336.
- Zambuzzi-Carvalho PF, Cruz AH, Santos-Silva LK, Goes AM, Soares CMA, Pereira M, 2009. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. *Medical Mycology* **47**: 734–744.
- Zheng L, Andrews PC, Hermodson MA, Dixon JE, Zalkin H, 1990. Cloning and structural characterization of porcine heart aconitase. *The Journal of Biological Chemistry* **265**: 2814–2821.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics

Tereza C.V. Rezende^{a, c}, Clayton L. Borges^a, Adriana D. Magalhães^b,
Marcelo Valle de Sousa^b, Carlos A.O. Ricart^b, Alexandre M. Bailão^a, Célia M.A. Soares^{a, *}

^aLaboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

^bLaboratório de Química de Proteínas, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

^cPrograma de Pós-graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2011

Accepted 24 August 2011

Keywords:

Paracoccidioides brasiliensis

Morphological transition

Proteomic analysis

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is a fungal pathogen with a broad distribution in Latin American countries. The mycelia-to-yeast morphological transition of *P. brasiliensis* is involved in the virulence of this pathogen, and this event is essential to the establishment of infection. Here, we report the first proteomic comparison between the mycelia, the mycelia-to-yeast transition and the yeast cells. Changes in the relative abundance of the components of the proteome during phase conversion of *P. brasiliensis* were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis coupled to mass spectrometry. Using MALDI-TOF-MS, we identified 100 total proteins/isoforms. We show that 18, 30 and 33 proteins/isoforms in our map are overexpressed in the mycelia, the mycelia-to-yeast transition and in yeast cells, respectively. Nineteen proteins/isoforms did not present significant differences in the volume spots in the three analyzed conditions. The differential expression was confirmed for six different proteins by Western blot analysis. The quantitative differences observed by the proteomic analysis were correlated with the transcript levels, as determined by quantitative RT-PCR of the analyzed conditions, including conidial formation and the transition from conidia-to-yeast cells. The analysis of the functional categories to which these proteins belong provided an integrated view of the metabolic reorganization during the morphogenesis of *P. brasiliensis*.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Paracoccidioides brasiliensis is the etiologic agent of paracoccidioidomycosis (PCM), which causes a wide range of superficial and systemic infections. It is assumed that the fungus exists as a soil saprophyte, producing propagules that can infect humans and cause disease. In vivo, the *P. brasiliensis* transition from mycelium to yeast cells is governed by a rise in temperature that occurs upon contact of the mycelia or conidia with the host. In vitro, this transition can be reversibly repro-

duced by shifting the growth temperature from 22 °C to 36 °C [1,2]. Infection is initiated by the inhalation of conidia or mycelial fragments by the host, followed by their differentiation into yeast cells [3]. Therefore, the ability of the fungus to undergo the morphogenetic change from mycelia to yeast is of particular interest because it represents an integral part of the overall virulence strategy of the pathogen [4].

Approaches that have been used in the identification of genes that are important for the establishment of the fungal phases and for the transition process include, for example,

* Corresponding author at: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas II, Laboratório de Biologia Molecular, Campus II, 74690-900, Goiânia, Goiás, Brazil. Tel./fax: +55 62 35211110.

E-mail address: celia@icb.ufg.br (C.M.A. Soares).

the characterization of the differential expression of genes in yeast and mycelia by electronic subtraction and cDNA microarray hybridization to uncover genes with statistically significant expression that is modulated during the mycelia-to-yeast transition. An analysis of 6022 assembled groups from mycelial and yeast cells expressing sequence tags provided a comprehensive view of the metabolism of *P. brasiliensis*. According to the transcriptional data, the mycelium phase presents a more aerobic metabolism as compared with the yeast phase, with a higher expression of the genes encoding isocitrate dehydrogenase and succinyl-CoA synthetase, suggesting a metabolic shift to oxidative phosphorylation. In contrast, the yeast phase exhibits an energy metabolism biased towards ethanol production by fermentation. In addition, the glyoxylate pathway is more active in the yeast form, as demonstrated by the analysis of transcription in yeast and mycelia [5]. Microarray analysis of 4692 genes has been employed to monitor gene expression at several time points in the mycelia-to-yeast morphological shift [6]. The differentially expressed genes corresponded to several functional categories, including amino acid catabolism, cell wall metabolism, the response to oxidative stress and protein synthesis. Our laboratory reported the results from a transcriptional analysis in *P. brasiliensis* yeast cells undergoing the mycelia-to-yeast transition [7]. The analysis revealed 179 genes that are positively modulated during the early transition process when compared with the mycelia. Notably, the expressed sequence tag (EST) annotation revealed 34 induced genes whose cognate proteins could function in cell wall/membrane remodeling during the first 22 h of the transition process.

Although the studies discussed above provide a basic understanding of this transition, there are gaps in our knowledge of the molecular mechanisms directing *P. brasiliensis* morphogenesis. Proteomic methods have only been used on a small scale to understand the molecular characteristics of *P. brasiliensis* dimorphism and have primarily focused on the characterization of a single or a few protein targets in this organism [8–10]. Here, we present a quantitative analysis of the relative protein abundance in mycelia, in the mycelia-to-yeast transition and in yeast cells. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was employed to detect and evaluate the qualitative and quantitative differences in the protein profiles. The amino acid sequence of each protein was analyzed using bioinformatics tools to predict the potential biological function of the proteins. Intriguingly, 33% of the total proteins identified, including enolase, alcohol dehydrogenase, fructose biphosphate aldolase 1 and several heat shock proteins, are represented by more than one isoform, which is probably the result of post-translational modifications. The isoforms of a given protein frequently displayed differential expression patterns. Quantitative real-time reverse transcription and Western blot analyses were employed to confirm the proteomic data.

The present study, which focuses on the proteome of *P. brasiliensis*, provides detailed reference maps of the three fungal stages. Several proteins detected by this experimental approach facilitated the design of a comprehensive metabolic overview of *P. brasiliensis* in the fungal phases and in the mycelia-to-yeast transition. The information obtained regarding these proteins will provide a useful resource for studying the dimorphism of *P. brasiliensis*.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and culture conditions

P. brasiliensis, Pb01 (ATCC, MYA-826) was used in all experiments of this study. The yeast and mycelial phases were maintained in vitro by subculturing every 7 days, at 22 °C and 36 °C, respectively, in Fava Netto's semisolid medium containing 1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.3% (w/v) proteose peptone, 0.5% (w/v) beef extract, 0.5% (w/v) NaCl, 4% (w/v) glucose and 1.2% (w/v) agar at pH 7.2. The filamentous phase was grown in liquid medium for 18 h at 22 °C followed by incubation for 22 h at 36 °C, as previously described [7].

2.2. Conidia production and induction of conidia-to-yeast transition

To obtain conidia, the mycelia were cultivated in potato dextrose agar for 50 days at 18 °C according to established protocols [11]. The conidia were purified by glass-wool filtration followed by cell quantification. To induce the differentiation of conidia-to-yeast cells, the harvested conidia were counted in a hemocytometer and added at a final concentration of 5×10^6 to Erlenmeyer flasks containing 100 mL of Fava Netto's liquid medium. The material was incubated at 36 °C, under agitation, for 22 h.

2.3. Preparation of protein extracts

The cultures from the mycelia, the mycelia-to-yeast transition and the yeast cells were collected by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 min at 4 °C, followed by three washing steps with sterile cold water. For the preparation of the total cell homogenate, the cells were ground in the presence of liquid nitrogen with a precooled mortar and pestle, as described previously [8]. The extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.8; 2 mM CaCl_2) containing a mixture of nuclease and protease inhibitors (serine, cysteine and calpain) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) was added to the material. After the addition of glass beads (0.45 mm), the material was vigorously mixed for 1 h at 4 °C, followed by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 min at the same temperature. Subsequently, the supernatant was collected, and the protein concentration was determined using the Plus One 2D Quant™ kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. The samples were stored in aliquots at -80 °C. For the proteomic analyses, three biological replicates of protein samples from three different experiments were obtained for each condition analyzed.

2.4. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

All of the reagents and equipment used in this study were obtained from GE Healthcare. A compatible protocol with isoelectric focusing (IEF) was optimized. Prior to IEF, the samples containing 170 μg of protein were precipitated using a 2-D Clean-Up kit following the procedure recommended by the manufacturer. The precipitate was solubilized in a rehydration

buffer (250 μ L) consisting of 7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 65 mM DTT, 0.5% (v/v) IPG (immobilized pH gradient) buffer and 0.001% (w/v) bromophenol blue and then applied onto immobilized nonlinear DryStrips pH 3–11 (13 cm long). Subsequently, the IPG strips were rehydrated for 14 h (30 V) using the Ettan IPGphor III Isoelectric Focusing System. Once rehydration was complete, the samples were separated according to their isoelectric points at 20 °C with a current of 50 μ A/strip. The following program was applied: 500 V for 1 h; 500–1000 V for 1 h; 1000–8000 V over 12.5 h and 8000 V for 2.5 h. Before the second dimension, the strips were reduced with 0.5% (w/v) DTT for 40 min by gentle agitation and then alkylated with 2.5% (w/v) iodoacetamide for 40 min by gentle agitation in the dark in equilibration buffer containing 6 M urea, 0.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS and 0.001% (w/v) bromophenol blue. For the second dimension electrophoresis, the equilibrated strips were washed with running buffer [25 mM Tris HCl pH 8.8, 192 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS] for 5 min with gentle shaking. Subsequently, the IPG strips were placed on top of a 10% SDS-PAGE gel and fixed with 0.5% (w/v) melted agarose in running buffer and 0.001% (w/v) bromophenol blue. The protein molecular weight marker was added. The second dimension electrophoresis was performed in a Hoefer SE 600 electrophoresis system at 15 °C at 100 V for 1 h, followed by 200 V until the indicator reached the bottom of the gel. All proteins were visualized by staining with the Silver Staining Protein kit™ without glutaraldehyde.

2.5. Image analysis

Three analytical replicates were produced for each of the three independent biological samples. Images of silver-stained 2-D gels were captured using Imagescan (GE Healthcare) in transparent mode and the Labscan software (GE Healthcare) version 3.0. All images were imported in TIFF format (Tag Image File Format) and converted to the format of the Image Master Platinum 6.0. The spot detection was performed automatically with subsequent manual corrections to remove false positives. The gels were analyzed in triplicate for each condition using a reference alignment (landmark) for automatic pairing. A spot was considered reproducible when it was present in all triplicate gels. To compare spots between gels of the three experimental conditions, a folder pairing (matchSet) was done automatically, with manual corrections. The image with the best resolution was chosen as the reference gel (master) for each condition. The automatic pairing between the master gels was performed by the software, and a manual inspection of each spot was performed to increase the reliability of matching [12]. The volume percentage (individual spot volume/sum of all spots volumes) of the spots was used for statistical calculations and the determination of overexpressed proteins.

2.6. Statistical analysis

A one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post test were applied to compare the differences among the analyzed groups. All statistical calculations were performed using the software STATISTICA version 7.0 (Statsoft Inc., 2005). The results were considered significant at $p < 0.05$.

2.7. In-gel digestion

Selected spots were excised and diced into small pieces. To remove the silver stain, the excised spots were incubated in 100 μ L of solution containing 50 mM sodium thiosulfate and 15 mM potassium ferricyanide for 5 min and washed twice with water to remove the reducing agents [13]. The in-gel digestion was performed manually [14]. The gel pieces were dehydrated in 100 μ L of acetonitrile (ACN) and dried in a speed vacuum. The gel pieces were then reduced with 10 mM DTT and alkylated with 55 mM iodoacetamide. The supernatant was removed, and the gels were washed with 100 μ L of a 25 mM ammonium bicarbonate solution by vigorous mixing for 10 min. The supernatant was removed, and gel pieces were dehydrated twice in 100 μ L of a 25 mM ammonium bicarbonate/50% (v/v) ACN solution, vigorously mixed for 5 min and centrifuged. The gel pieces were dried, and a 10-ng/ μ L trypsin solution (sequencing grade modified trypsin, Promega, Madison, WI, USA) was added, followed by rehydration on ice at 4 °C for 10 min. The supernatant was removed, and 25 μ L of 25 mM ammonium bicarbonate solution was added to the gel pieces, followed by incubation at 37 °C for 16 h. After the digestion, the supernatant was placed into a clean tube. Fifty microliters of 50% (v/v) ACN, 5% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) solution was added to the gel pieces. The samples were mixed for 10 min, sonicated for 3 min and combined with the aqueous extraction above. The samples were dried in a speed vacuum, and the peptides were solubilized in water. Two microliters of each sample were delivered to a target plate and dried at room temperature. Subsequently, the peptide mixtures were covered with 2 μ L of solution containing 10 ng/mL alphacyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% (v/v) ACN and 5% (v/v) TFA. Considering that this procedure does not favor the identification of less abundant protein species, we improved the technique by adding a concentration and purification step using a pipette tip with a bed of chromatographic media (ZipTips® C18 Pipette Tips, Milipore, Bedford, MA, USA) prior to mass spectrometry (MS).

2.8. Mass spectrum analysis

Mass spectra (MS) processing was performed with a MALDI-Synapt MS™ spectrometer (Waters-Micromass, Manchester, UK) in positive ion reflector mode with a laser intensity of 250. The instrument was calibrated to an accuracy level of <10 ppm using a calibration mixture of known standard synthetic peptides with an 800–4000 Da m/z range. The instrument was set to acquire MS spectra, and peaks of sufficient intensity at 15 counts above threshold were automatically fragmented in the argon collision cell. The resulting MS/MS spectra were processed using Masslynx 4.0 software (Waters-Micromass, Manchester, UK). The peak lists were created by ProteinLynx Global Server 2.2.5v (Waters-Micromass, Manchester, UK).

2.9. Identification of candidate proteins and post-translational modifications

The identification of MS spectra was performed by submitting the monoisotopic peak lists (*.txt) to the NCBI database

using MASCOT (MASCOT 2.1.02; Matrix Science, London, U.K.) to identify candidate proteins. The following parameters were selected: taxonomy, fungi; enzyme, trypsin; carbamidomethyl (C) as fixed modifications; oxidation (M) as variable modifications; and one missed cleavage site was allowed. For the MS data, a mass tolerance of 25–100 ppm was used for the protein identification. For confirmation of the protein identification by PMF, the resulting MS–MS ion spectra were processed and converted into *.pkl files, and the peak list was further compared to the NCBI nonredundant database (fungi) with a peptide mass tolerance of ± 100 ppm and a fragment mass tolerance of 0.2–0.6 Da. For both MS and MS/MS, only proteins with statistical significance ($p < 0.05$), as determined by the MASCOT algorithm, were accepted as a protein sequence match. The analysis by MS/MS confirmed the proteins identified on the basis of the PMFs, validating the identifications.

To examine whether multiple spots might result from post-translational modifications (PTMs), we added variable modifications when identifying the MS spectra by NCBI database search, as follows: acetylation of lysine and phosphorylation of serine/tyrosine/tryptophan. All protein isoforms, which included the confirmation of the molecular mass of the modified peptides, were selected for manual spectral analysis.

2.10. Criteria for protein identification and bioinformatics analysis

Peptides from a single technical replicate corresponding to a single protein were pooled. The proteins that were not represented in the three biological replicates were dropped. The protein identification was accepted if it could be established at greater than 95% probability. The ORF sequences of the identified proteins were sorted into functional categories based on the MIPS Functional categories database (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/listSearch.html?order=entry>). The functional characterization was confirmed using a GO (<http://amigo.geneontology.org>) classification.

2.11. RNA extraction, cDNA synthesis and real-time RT-PCR (qRT-PCR)

The samples containing mycelia, yeast cells, and the mycelia-to-yeast transition, and conidia and the conidia-to-yeast transition, were washed three times with sterile water. The cells were centrifuged, and the resulting pellets were frozen in liquid nitrogen. The cells were disrupted by vigorous mixing with glass beads for 10 min in the presence of Trizol (GIBCO™ Invitrogen Corporation) according to the manufacturer's instructions. The cDNAs were prepared using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA) and oligo (dT)₁₅ primer. The quantitative real-time PCR reactions were performed using a StepOnePlus™ real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) in triplicates of three independent experiments. The SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) was used as the reaction mixture, with 10 pmol of each primer and 40 ng of template cDNA at a final volume of 25 μ L. A melting curve analysis was performed to confirm a single PCR product. The RT-PCR thermal cycling

consisted of 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Constitutively expressed alpha tubulin [15] was selected to normalize the samples. A non-template control was included to eliminate contamination or nonspecific reactions. An aliquot of cDNA from each sample was pooled to create the cDNA used to generate a relative standard curve. The standard cDNA was serially diluted 1:5, and a standard curve was generated using five serially diluted samples from the pooled cDNA. The relative expression levels of selected genes were calculated using the standard curve method for relative quantification [16]. The oligonucleotides used in the real-time PCR analyses are listed in Supplementary Table 1.

2.12. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and Western blotting

Protein extracts from *P. brasiliensis* (30 μ g) were resolved by SDS–PAGE on 12% polyacrylamide gels [17]. The samples were transferred to nitrocellulose membranes and blocked at room temperature for 2 h with 5% (w/v) non-fat skim milk. The membranes were incubated with the following polyclonal antibodies: anti-isocitrate lyase of *P. brasiliensis* (protein molecular mass 60 kDa, unpublished); anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (mouse monoclonal antibody raised to a GAPDH from rabbit muscle, United States Biological/Swampscott, MA); anti-*P. brasiliensis* enolase [9]; anti-*P. brasiliensis* aconitase [18]; anti-*P. brasiliensis* triosephosphate isomerase [19], and anti-*P. brasiliensis* fructose 1,6-biphosphate aldolase (protein molecular mass 38 kDa, unpublished). Polyclonal antibodies directed to the c24-sterol methyltransferase, molecular mass of 42.5 kDa (unpublished) GenBank accession number ABB90541.1, were used as a loading control. This step was followed by three incubations of 15 min in buffer [PBS, containing 0.1% (v/v) Tween 20]. The membranes were incubated with the appropriate conjugated antibody [alkaline phosphatase coupled anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin G (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO)] and developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate-nitroblue tetrazolium (BCIP-NBT).

3. Results

3.1. Analysis of the *P. brasiliensis* proteome

In this study, we used a proteomic strategy to identify *P. brasiliensis* proteins preferentially expressed in the mycelium and yeast fungal phases and during an early stage in the mycelia-to-yeast transition (22 h). The separation of intracellular proteins from *P. brasiliensis* was conducted over a wide pH range (3–11 NL IPG gels). Using silver staining, it was possible to detect and resolve protein spots with molecular masses ranging from 11 to 127 kDa and *pI* values of 3.3 to 11. The protein spots were detected automatically and matched using Image Master Platinum 6.0 (GE Healthcare). The 2-DE analysis of each condition revealed an average of 991 spots in the mycelium phase, 911 spots in the mycelia-to-yeast transition and 1017 spots in the yeast phase (data not shown). Fig. 1 shows a representative two-dimensional gel of the three analyzed conditions performed in biological triplicates.

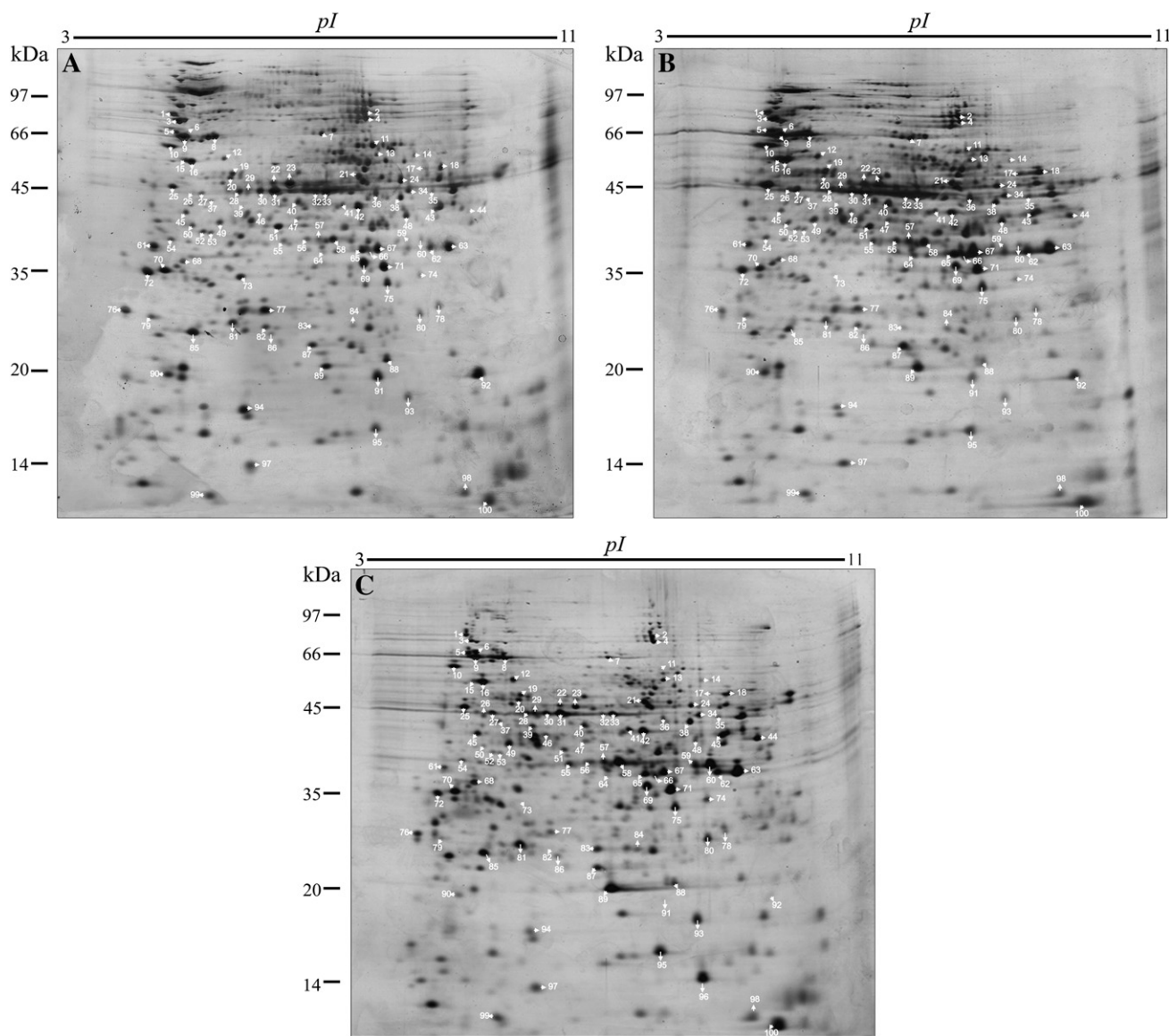


Fig. 1 – Two-dimensional gel analysis of *P. brasiliensis* proteins in yeast and mycelia and during their morphological transition. (A) Mycelia; (B) the mycelia-to-yeast transition after 22 h at 36 °C and (C) Yeast. Protein (170 µg) extracts were separated on IPG strips covering a pH range of 3–11, followed by 10% (w/v) SDS–PAGE and visualized by silver staining without glutaraldehyde. 2-D gel images from three biological replications of each condition were compared to identify differential expression levels of proteins using Image master 2D Platinum software. Proteins spots that were identified by mass spectrometry are numbered and listed in Supplementary Table 3. The pH gradient is shown above the gel and the molecular mass protein standards (kDa) are indicated on the left of the gel. Two-dimensional gel analysis of *P. brasiliensis* proteins in yeast and mycelia and during their morphological transition. (A) Mycelia; (B) the mycelia-to-yeast transition after 22 h at 36 °C and (C) Yeast. Protein (170 µg) extracts were separated on IPG strips covering a pH range of 3–11, followed by 10% (w/v) SDS–PAGE and visualized by silver staining without glutaraldehyde. 2-D gel images from three biological replications of each condition were compared to identify differential expression levels of proteins using Image master 2D Platinum software. Proteins spots that were identified by mass spectrometry are numbered and listed in Supplementary Table 3. The pH gradient is shown above the gel and the molecular mass protein standards (kDa) are indicated on the left of the gel.

To identify changes in the expression levels of proteins associated with the fungal phases and the dimorphic switch of *P. brasiliensis*, the average intensity of staining of common spots identified in the triplicates of each condition was compared as described in the **Materials and methods**. A list containing data, such as total and normalized volumes,

experimentally determined molecular mass and the *pI*, for all the spots were generated. Out of all of the proteins detected, 396 spots were matched and submitted to a one-way ANOVA to compare the differences in protein expression among the three analyzed conditions, as demonstrated in Supplementary Table 2. The spots were described as common

or differentially expressed in the three fungal conditions. Supplementary Table 3 shows all of the protein spots from the MS and MS/MS analysis, the fungal phase in which the protein is overexpressed, the *pI*, the theoretical and experimental molecular mass of each spot, the number of peptides found, the percentage of coverage of peptides in relation to the total sequence, the peptides confirmed by MS/MS, and the entry number in the NCBI protein database presenting the highest score. We noted that the statistical correlation between the experimental and theoretical values of molecular mass (Pearson $r=0.995$, $p<0.001$) was higher than the correlation between the *pI* values (Pearson $r=0.852$, $p<0.001$) (Supplementary Fig. 1).

The analysis resulted in a final list of 100 proteins and isoforms contained in the 396 statistically analyzed spots. Among the mycelia, mycelia-to-yeast transition and yeast cell samples, 18, 30 and 33 proteins/isoforms, respectively, were differentially expressed, and 19 proteins, from the total, presented similar expression among the three sample sets (Supplementary Table 3; Fig. 2).

3.2. Proteins of *P. brasiliensis* differentially expressed in the mycelia phase

A comparative analysis was performed among the protein profiles demonstrated in the mycelia, mycelia-to-yeast transition and yeast cells. As demonstrated in Table 1, the categorization of the proteins/isoforms differentially expressed in the mycelium in comparison to the other two developmental fungal phases allowed the identification of 18 overexpressed proteins in this fungal phase. These proteins and isoforms corresponded to functional categories, such as cell defense, and energy and protein fate (Table 1). Some of the

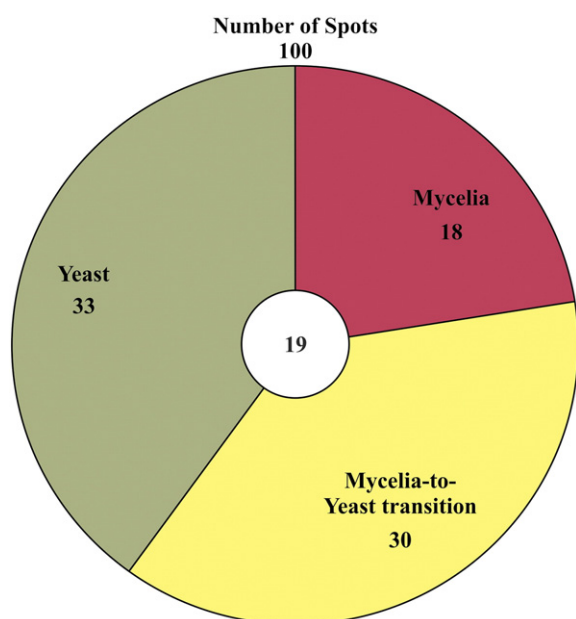


Fig. 2 – Diagram depicting the breakdown of proteins identified at each fungal phase. The comparative analysis provides the differentially expressed proteins/isoforms and the constitutive spots.

characterized proteins in this fungal phase were unclassified based on the MIPS category and GO classification.

3.3. Proteins of *P. brasiliensis* differentially expressed in the mycelia-to-yeast transition

A closer look at the dimorphic process of *P. brasiliensis* was obtained by investigating the fungal proteins that were preferentially expressed after 22 h of fungal transition from mycelia-to-yeast cells, as shown in Table 2. Thirty proteins and isoforms from a total of 81 differentially expressed proteins were identified to have significant variation (ANOVA $p<0.05$). Notably, the increased proteins were related to cell rescue, defense and virulence, including several heat shock proteins (HSPs). Some glycolysis-related enzymes, such as enolase and phosphoglucomutase, were preferentially induced during the transition. Transaldolase and transketolase were also induced during the transition phase. The proteins involved in the metabolism of amino acids and nitrogen were also induced after the first 22 h of the mycelia-to-yeast transition. Of particular note, the subunits of ATP synthase are upregulated during transition.

3.4. Proteins of *P. brasiliensis* differentially expressed in the yeast phase

By comparing the three developmental stages, it was possible to identify 33 proteins and isoforms that were preferentially expressed in the yeast phase (Table 3). Most of the enzymes of the glycolytic pathway were upregulated in this fungal phase. The glycolysis pathway contained the largest number of proteins within the carbohydrate metabolism category. The enzymes of the glyoxylate cycle (isocitrate lyase) and lipid metabolism (enoyl CoA hydratase and methylcitrate dehydratase) were also increased in this fungal phase in comparison to the two other developmental stages analyzed.

3.5. Predominant metabolic pathways as predicted by proteomic analysis

Fig. 3 presents an overview of the predominant metabolic aspects involved in the three fungal developmental stages determined by our proteomic analysis. The glycolytic pathway is upregulated during the yeast phase. Most of the glycolytic enzymes are upregulated during the yeast phase. Some of the glycolytic enzymes begin their accumulation during the mycelia-to-yeast transition, such as phosphoglucomutase and enolase, and their levels remain high during the yeast phase. The enzymes of the non-oxidative branch reactions of the pentose phosphate pathway, such as transketolase and transaldolase, were upregulated during the mycelia-to-yeast transition, can provide substrates for glycolysis, which is induced during the yeast phase. The induction of the non-oxidative pentose phosphate pathway might also reflect a high production of NADPH by the oxidative branch, which could be used in the biosynthetic processes putatively required in the ensuing yeast phase. The fate of pyruvate during the mycelia-to-yeast transition and in yeast cells could be alcoholic fermentation, as suggested by the upregulation of two alcohol dehydrogenases. In addition, during the

Table 1 – Identified proteins from *P. brasiliensis* up-regulated in the mycelia phase compared to the mycelia-to-yeast transition and yeast phases.

| Functional category ^a | Accession number/ protein description ^b | Spot number ^c | Mascot Score ^d | Sequence coverage (%) ^e | Theo. Mr (kDa)/pI ^f | Expt. Mr (kDa)/pI ^g | Matched peptides (MS/MS) ^h | ANOVA (p value) ⁱ |
|----------------------------------|---|-----------------------------|------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|---|---------------------------------|
| Cell rescue and virulence | PAAG_03216 mitochondrial peroxiredoxin PRX1 | 85 | 114 | 86 | 24.9/5.28 | 24.9/4.93 | 2 | 0.030 |
| | PAAG_02725 Mn superoxide dismutase | 88 | 81 | 71 | 24.8/8.91 | 20.8/8.05 | – | 0.001 |
| Carbohydrate metabolism | PAAG_06473 mannitol 1-phosphate 5-dehydrogenase | 51 | 129 | 62 | 43.1/5.66 | 39.9/6.27 | 5 | 0.006 |
| Energy | PAAG_05249 aldehyde dehydrogenase | 22 | 121 | 50 | 54.6/5.87 | 45.7/6.19 | 3 | 0.003 |
| | PAAG_05249 aldehyde dehydrogenase | 23 | 177 | 58 | 54.6/5.87 | 45.4/6.44 | 8 | 0.001 |
| Protein synthesis and fate | PAAG_03334 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D | 52 | 50 | 43 | 41.4/5.36 | 39.3/5.08 | 3 | 0.003 |
| | PAAG_03334 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D | 53 | 184 | 68 | 41.4/5.36 | 39.2/5.20 | 5 | 0.028 |
| | PABG_00326 proteasome subunit alpha type-7 | 78 | 98 | 55 | 29.3/8.25 | 27.7/8.92 | 2 | 0.003 |
| | PAAG_03687 proteasome component PUP2 | 79 | 136 | 77 | 26.8/4.79 | 27.1/4.24 | 5 | 0.017 |
| Amino acid metabolism | PAAG_08910D-3-phosphoglycerate dehydrogenase | 11 | 87 | 41 | 64.1/6.55 | 58.1/7.82 | 4 | 0.034 |
| Signal transduction | PABG_07632 wos2/Hsp90 binding co-chaperone | 76 | 78 | 44 | 23.6/4.30 | 27.9/3.83 | 2 | 0.009 |
| Cellular organization | PAAG_08058 cofilin | 94 | 123 | 61 | 17.5/5.68 | 17.0/5.72 | – | 0.001 |
| Cell cycle | PAAG_06751 DNA damage checkpoint protein rad24 | 72 | 82 | 63 | 29.7/4.68 | 35.0/4.17 | – | 0.031 |
| | PAAG_00773 DNA damage checkpoint protein rad24 | 61 | 184 | 52 | 32.5/4.74 | 37.7/4.40 | 9 | 0.025 |
| Unclassified | PAAG_00503 HAD superfamily hydrolase | 77 | 51 | 60 | 27.3/5.67 | 28.0/6.06 | 2 | 0.001 |
| | PAAG_00340 conserved hypothetical protein | 92 | 134 | 58 | 19.2/8.61 | 19.2/9.58 | – | 0.035 |
| | PAAG_00340 conserved hypothetical protein | 91 | 88 | 57 | 19.2/8.61 | 19.0/7.87 | 3 | 0.001 |
| | PAAG_06082 NmrA-like family protein | 73 | 113 | 38 | 27.5/4.90 | 33.9/5.62 | – | 0.001 |

^a Functional category — based on the MIPS Functional categories database and GO.

^b Accession number — accession number of matched protein from *P. brasiliensis* database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).

^c Spot number — spot numbers as depicted in Supplementary Table 1 and Fig. 1.

^d Mascot score — score obtained from the Mascot search for each match.

^e Sequence coverage — percent amino acid sequence coverage for the identified protein.

^f Theo. Mr/pI (kDa) — theoretical molecular mass and isoelectric point based on amino acid sequence of the identified protein.

^g Expt. Mr/pI (kDa) — experimental molecular and isoelectric point estimated from the 2-DE gels.

^h Matched peptides (MS/MS) — the number of matched peptides on MS/MS searching.

ⁱ ANOVA — statistically significant differences are considered with $p < 0.05$.

mycelia-to-yeast transition, the increased concentration of mitochondrial ATP synthase family subunits was detected. The proteins involved in the maintenance of the intracellular redox potential and protection against oxidative stress, such as Mn superoxide dismutase and the mitochondrial

peroxiredoxin, were overexpressed during the mycelia phase. Regarding lipid metabolism, the methylcitrate and the glyoxylate cycles are upregulated in the mycelia-to-yeast transition and in yeast cells, as demonstrated by proteomic analysis.

Table 2 – Identified proteins from *P. brasiliensis* up-regulated during mycelia-to-yeast transition in comparison to mycelia and yeast phases.

| Functional category ^a | Accession number/ Protein description ^b | Spot number ^c | Mascot Score ^d | Sequence Coverage (%) ^e | Theo. Mr (kDa)/pI ^f | Expt. Mr (kDa)/pI ^g | Matched peptides (MS/MS) ^h | ANOVA (p value) ⁱ |
|---|---|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| <i>Cell rescue and virulence</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_07750 heat shock protein Hsp88 | 1 | 206 | 46 | 80.7/4.92 | 78.6/4.60 | 11 | 0.032 |
| | PAAG_05679 heat shock protein Hsp90 | 3 | 187 | 53 | 78.6/4.91 | 73.8/4.68 | 7 | 0.020 |
| | PAAG_01262 Hsp70-like protein | 5 | 92 | 46 | 68.9/5.39 | 66.4/4.62 | 3 | 0.006 |
| | PAAG_08003 Hsp70-like protein | 9 | 317 | 57 | 70.9/5.08 | 63.4/4.75 | 7 | 0.028 |
| | PAAG_01339 heat shock protein SSC1 | 8 | 232 | 65 | 73.8/5.92 | 64.0/5.28 | 9 | 0.002 |
| | PAAG_08003 Hsp70-like protein | 15 | 252 | 58 | 70.9/5.08 | 54.1/4.75 | – | 0.038 |
| <i>Carbohydrate metabolism</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_04166 transaldolase | 64 | 80 | 52 | 35.8/6.47 | 36.9/6.97 | – | 0.004 |
| | PAAG_04444 transketolase | 7 | 272 | 50 | 74.9/5.97 | 63.7/6.96 | 6 | 0.014 |
| <i>Glycolysis</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_00771 enolase | 28 | 105 | 66 | 47.4/5.67 | 44.1/5.64 | 8 | 0.019 |
| | PAAG_00771 enolase | 29 | 160 | 63 | 47.4/5.67 | 44.1/5.79 | 6 | 0.020 |
| | PAAG_02011 phosphoglucomutase | 26 | 74 | 56 | 83.7/6.59 | 44.1/4.93 | – | 0.000 |
| | PAAG_04541 alcohol dehydrogenase ADH1 | 67 | 107 | 44 | 44.8/8.96 | 36.9/7.91 | 3 | 0.013 |
| <i>Citric acid cycle</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_00053 malate dehydrogenase | 71 | 137 | 70 | 36.0/8.99 | 34.8/7.99 | 3 | 0.001 |
| <i>Energy</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_04820 ATP synthase subunit alpha | 18 | 96 | 55 | 51.0/8.67 | 49.2/8.98 | – | 0.003 |
| | PAAG_04820 ATP synthase subunit alpha | 17 | 78 | 53 | 51.0/8.67 | 49.1/8.72 | – | 0.014 |
| | PAAG_08037 ATP synthase subunit beta | 25 | 251 | 66 | 55.2/5.28 | 45.2/4.58 | – | 0.008 |
| <i>Lipid metabolism</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_04550 2-methylcitrate synthase | 35 | 113 | 58 | 51.6/9.02 | 43.8/8.83 | 3 | 0.002 |
| <i>Protein synthesis and fate</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_00986 disulfide isomerase Pdi1 | 10 | 208 | 50 | 59.3/4.80 | 59.7/4.51 | 11 | 0.023 |
| | PAAG_08931 glutamate carboxypeptidase | 19 | 77 | 67 | 64.6/6.23 | 49.2/5.54 | <u>3</u> | 0.004 |
| <i>Amino acid and nitrogen metabolism</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_06506 aspartate aminotransferase | 48 | 133 | 65 | 50.9/8.39 | 40.7/8.41 | – | 0.019 |
| | PAAG_07114 argininosuccinate synthase | 27 | 94 | 56 | 46.8/5.18 | 44.1/5.07 | 5 | 0.000 |
| | PAAG_03333 formamidase | 33 | 135 | 49 | 46.1/6.10 | 43.8/7.06 | 4 | 0.020 |
| | PAAG_03333 formamidase | 32 | 91 | 48 | 46.1/6.10 | 44.0/6.86 | 3 | 0.002 |
| | PABG_04154 NADP-specific glutamate dehydrogenase | 36 | 73 | 51 | 50.3/7.17 | 43.6/7.87 | 4 | 0.042 |
| | PAAG_02859 adenosylhomocysteinase | 40 | 90 | 50 | 49.0/5.83 | 42.7/6.58 | 3 | 0.036 |
| <i>Nucleotide metabolism</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_03096 thymine dioxygenase | 50 | 133 | 43 | 41.5/5.20 | 40.1/4.92 | – | 0.001 |
| <i>Signal transduction</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_06996 RACK1-like protein | 66 | 137 | 58 | 35.5/6.59 | 36.7/7.75 | 3 | 0.012 |
| <i>Cellular transport</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_08973 Tropomyosin 1 | 90 | 75 | 94 | 18.8/4.99 | 19.7/4.53 | – | 0.008 |

Table 2 (continued)

| Functional category ^a | Accession number/ Protein description ^b | Spot number ^c | Mascot Score ^d | Sequence Coverage (%) ^e | Theo. Mr (kDa)/pI ^f | Expt. Mr (kDa)/pI ^g | Matched peptides (MS/MS) ^h | ANOVA (p value) ⁱ |
|----------------------------------|---|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| Transcription | PAAG_04814 nucleic acid-binding protein | 84 | 94 | 43 | 30.4/9.40 | 25.0/7.52 | – | 0.024 |
| Unclassified | PAAG_08614 conserved hypothetical protein | 82 | 72 | 56 | 28.1/5.74 | 25.3/6.06 | – | 0.008 |

^a Functional category — based on the MIPS Functional categories database and GO.

^b Accession number — accession number of matched protein from *P. brasiliensis* database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).

^c Spot number — spot numbers as depicted in Supplementary Table 2 and Fig. 1.

^d Mascot score — score obtained from the Mascot search for each match.

^e Sequence coverage — percent amino acid sequence coverage for the identified protein.

^f Theo. Mr/pI (kDa) — theoretical molecular mass and isoelectric point based on amino acid sequence of the identified protein.

^g Expt. Mr/pI (kDa) — experimental molecular and isoelectric point estimated from the 2-DE gels.

^h Matched peptides (MS/MS) — the number of matched peptides on MS/MS searching.

ⁱ ANOVA — statistically significant differences are considered with $p < 0.05$. Statistical analysis of 396 protein spots detected by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis in the mycelia, the mycelia-to-yeast transition and the yeast cells.

3.6. Proteins with no significant differences in expression between mycelia, mycelia-to-yeast transition and yeast cells

We were also interested in the expression profiles of proteins and isoforms whose abundance did not significantly change (ANOVA $p > 0.05$) across the three different *P. brasiliensis* samples. A total of nineteen proteins with equal expression in the three conditions were identified in this study (Supplementary Table 4). The isoforms of the glycolytic enzymes, such as enolase, phosphoglycerate kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, were common to all three conditions analyzed. In addition, the isoforms of the enzymes of the Krebs cycle were detected.

3.7. Protein isoforms and post-translational modifications

Proteomic analysis allowed the global inspection of post-translational modifications (PTMs) because they are often associated with changes of molecular mass and/or charge, which can be detected on 2-D gels. We performed a search of the *P. brasiliensis* structural genome database from the Broad Institute of MIT and Harvard (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html) for the presence of more than one gene coding for a specific protein. We identified proteins appearing in more than one spot in the proteome map of the mycelia, mycelia-to-yeast transition and yeast cells (Tables 1–3 and Supplementary Table 4). To examine whether multiple spots might result from PTMs, we added variable modifications to the identification spectra of the MS by NCBI database search, as described in the Materials and methods. We observed an increase in the number of matched mass values and of sequence coverage when applying those search criteria. The most common PTMs identified among the *P. brasiliensis* protein isoforms were phosphorylation (S–T–Y) and lysine acetylation. Manual spectral analysis confirmed

the molecular mass of the selected peptides (Table 4 and Supplementary Table 5).

3.8. The correlation between the proteomic and transcriptional data

To correlate the proteomic and transcriptional data, we performed a transcript analysis of the selected genes during the three morphological phases (mycelia, mycelia-to-yeast transition and yeast) and in conidia and the conidia-to-yeast transition, as described in Materials and methods. Supplementary Fig. 2 presents a morphological view of the transition processes from mycelia-to-yeast and from conidia-to-yeast (panels A and B, respectively). After 22 h of the mycelia-to-yeast transition, round-shaped cells similar to yeast forms were observed (Fig. S2A). In addition, the conidia-to-yeast phase contained cells with a morphology resembling yeast cells (Fig. S2B).

To correlate the protein and mRNA levels, we performed a qRT-PCR analysis of the five selected genes (Fig. 4). The increased level of transcripts encoding enolase during the mycelia-to-yeast and conidia-to-yeast transitions correlates with an increased expression of the protein, as demonstrated by the proteomic analysis (Fig. 4A). The increase in isocitrate lyase transcript is correlated with an increase at the protein level, with higher expression during the yeast phase (Fig. 4B). The expression of alcohol dehydrogenase 1 is mainly increased during the conidia-to-yeast transition (Fig. 4C). The aldehyde dehydrogenase transcript levels are higher in the mycelia as compared to the yeast phase, which correlates with the proteomic analysis (Fig. 4D), although a significant increase in the expression was observed during the conidia-to-yeast transition. Regarding triosephosphate isomerase, the transcript was more abundant during mycelia-to-yeast and conidia-to-yeast transitions (Fig. 4E), although the proteomic analysis revealed preferential expression in yeast.

Table 3 – Identified proteins from *P. brasiliensis* up-regulated in the yeast phase compared to mycelia and mycelia-to-yeast transition.

| Functional category ^a | Accession number/ Protein description ^b | Spot number ^c | Mascot Score ^d | Sequence Coverage (%) ^e | Theo. Mr (kDa)/pI ^f | Expt. Mr (kDa)/pI ^g | Matched peptides (MS/MS) ^h | ANOVA (p value) ⁱ |
|---|---|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| <i>Cell rescue and virulence</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_08059 heat shock protein Hsp60 | 16 | 331 | 75 | 62.3/5.51 | 53.8/4.91 | 9 | 0.027 |
| | PAAG_01339 heat shock protein SSC1 | 39 | | | 73.8/5.92 | 42.7/5.75 | 4 | 0.000 |
| | AF452883 Y20 protein | 89 | 109 | 64 | 21.6/6.09 | 20.0/7.03 | 6 | 0.001 |
| <i>Carbohydrate metabolism</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_06473 mannitol 1-phosphate 5-dehydrogenase | 47 | 130 | 35 | 43.1/5.66 | 40.7/6.59 | 5 | 0.019 |
| <i>Glycolysis</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_07410 phosphoglycerate mutase | 12 | 109 | 52 | 57.3/5.37 | 54.7/5.42 | 5 | 0.019 |
| | PAAG_02869 phosphoglycerate kinase | 46 | 154 | 64 | 45.3/6.48 | 41.7/5.97 | 3 | 0.000 |
| | PAAG_01995 fructose biphosphate aldolase 1 | 57 | 78 | 49 | 39.8/6.14 | 38.2/6.90 | – | 0.008 |
| | PAAG_01995 fructose biphosphate aldolase 1 | 58 | 168 | 60 | 39.8/6.14 | 38.6/7.15 | 4 | 0.000 |
| | PAAG_08468 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase | 63 | 246 | 77 | 36.6/8.26 | 37.1/9.13 | 5 | 0.002 |
| | PAAG_00403 alcohol dehydrogenase ADH2 | 60 | 217 | 78 | 38.0/7.55 | 37.8/8.66 | 8 | 0.000 |
| | PAAG_02585 triosephosphate isomerase | 81 | 183 | 75 | 27.2/5.39 | 26.1/5.54 | 6 | 0.031 |
| | PAAG_00403 alcohol dehydrogenase ADH2 | 59 | 111 | 75 | 38.0/7.55 | 38.1/8.40 | – | 0.000 |
| <i>Citric acid cycle</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_05048 aconitase | 4 | 86 | 19 | 79.2/6.49 | 72.9/7.72 | 6 | 0.013 |
| | PAAG_01463 succinyl-CoA ligase subunit beta | 45 | 91 | 62 | 48.6/5.74 | 41.9/4.81 | 1 | 0.000 |
| <i>Glyoxylate cycle</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_06951 isocitrate lyase | 13 | 193 | 66 | 60.2/6.79 | 54.1/7.88 | – | 0.038 |
| <i>Lipid metabolism</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_04559 2-methylcitrate dehydratase | 21 | 99 | 41 | 62.3/8.55 | 46.6/7.57 | – | 0.004 |
| | PAAG_03631 12-oxophytodienoate reductase | 44 | 294 | 69 | 43.2/8.69 | 41.2/9.45 | 5 | 0.000 |
| | PAAG_06309 enoyl-CoA hydratase | 80 | 79 | 52 | 32.1/8.89 | 26.7/8.62 | – | 0.006 |
| <i>Protein synthesis and fate</i> | | | | | | | | |
| | PADG_05922 cytosolic non-specific dipeptidase | 20 | 142 | 55 | 53.6/5.35 | 47.2/5.51 | 6 | 0.010 |
| | PAAG_03556 elongation factor 1 gamma | 43 | 79 | 35 | 45.9/8.20 | 41.3/8.87 | – | 0.029 |
| | PAAG_03334 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D | 49 | 86 | 67 | 41.4/5.36 | 40.6/5.35 | – | 0.000 |
| | PAAG_03028 elongation factor 1 beta | 70 | 89 | 65 | 25.9/4.78 | 35.1/4.45 | 2 | 0.012 |
| | PAAG_02907 proteasome regulatory particle subunit (Nas6) | 86 | 79 | 42 | 26.1/5.80 | 24.3/6.15 | – | 0.036 |
| | PAAG_00739 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B | 93 | 127 | 70 | 22.8/7.88 | 18.0/8.39 | 5 | 0.003 |
| <i>Amino acid and nitrogen metabolism</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_07626 Cobalamin independent synthase | 2 | 254 | 61 | 87.3/6.28 | 77.2/7.69 | 3 | 0.005 |
| | PAAG_08100 O-acetylhomoserine (thiol)-lyase | 41 | 161 | 72 | 47.1/6.24 | 42.0/7.31 | 5 | 0.009 |
| | PAAG_01321 oxidoreductase 2-nitropropane dioxygenase family | 56 | 77 | 74 | 37.7/6.01 | 38.3/6.70 | 1 | 0.002 |
| | PAAG_00966 l-threonine 3-dehydrogenase | 55 | 130 | 75 | 38.1/5.86 | 38.1/6.33 | 3 | 0.008 |
| | PAAG_04966 nitrilase family protein, putative | 74 | 121 | 78 | 32.6/7.70 | 33.0/8.61 | 6 | 0.001 |
| <i>Phosphate metabolism</i> | | | | | | | | |
| | PAAG_00657 inorganic pyrophosphatase | 68 | 196 | 77 | 33.6/5.13 | 36.1/4.77 | 4 | 0.004 |

Table 3 (continued)

| Functional category ^a | Accession number/ Protein description ^b | Spot number ^c | Mascot Score ^d | Sequence Coverage (%) ^e | Theo. Mr (kDa)/pI ^f | Expt. Mr (kDa)/pI ^g | Matched peptides (MS/MS) ^h | ANOVA (p value) ⁱ |
|----------------------------------|---|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| Nucleotide metabolism | PAAG_04291 nucleoside diphosphate kinase | 96 | 153 | 57 | 16.8/6.84 | 14.5/6.99 | 2 | – |
| Transcription | PAAG_04814 nucleic acid-binding protein | 83 | 214 | 51 | 30.4/9.40 | 25.0/6.80 | 6 | 0.022 |
| Cell cycle | PAAG_04042 Septin | 37 | 86 | 52 | 44.2/5.25 | 43.1/5.20 | – | 0.019 |

^a Functional category – based on the MIPS Functional categories database and GO.

^b Accession number — accession number of matched protein from *P. brasiliensis* database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).

^c Spot number — spot numbers as depicted in Supplementary Table 2 and Fig. 1.

^d Mascot score — score obtained from the Mascot search for each match.

^e Sequence coverage — percent amino acid sequence coverage for the identified protein.

^f Theo. Mr/pI (kDa) — theoretical molecular mass and isoelectric point based on amino acid sequence of the identified protein.

^g Expt. Mr/pI (kDa) — experimental molecular and isoelectric point estimated from the 2-DE gels.

^h Matched peptides (MS/MS) — the number of matched peptides on MS/MS searching.

ⁱ ANOVA — statistically significant differences are considered with $p < 0.05$.

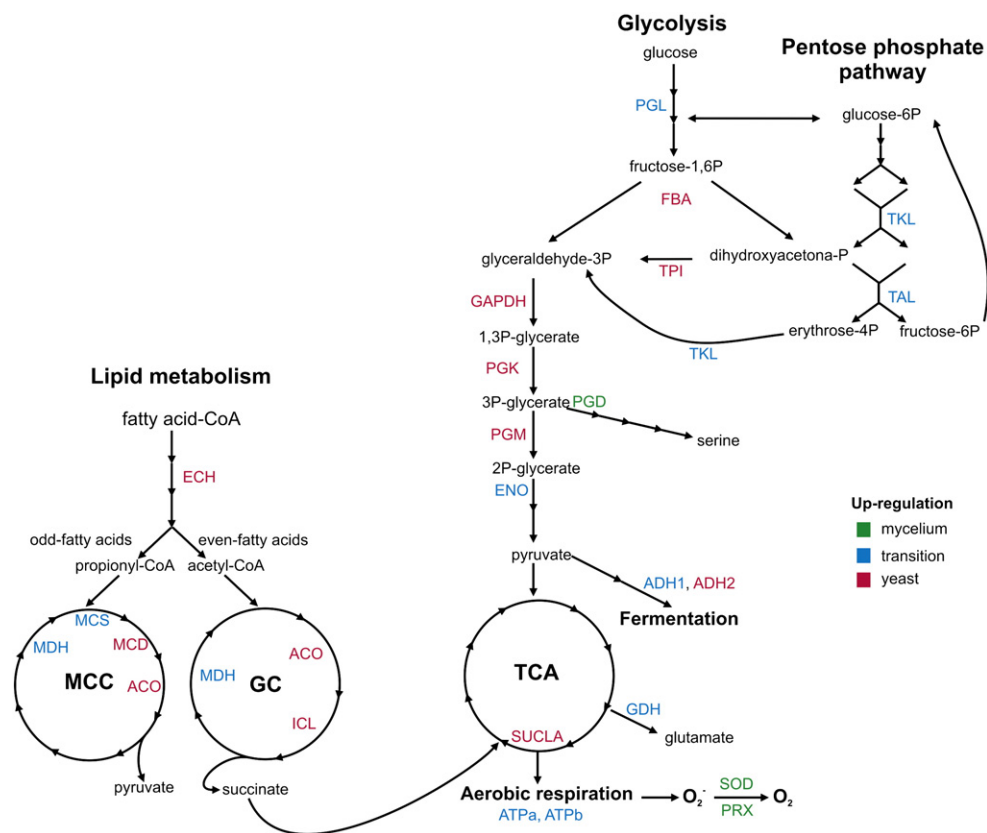


Fig. 3 – Diagram of the metabolic processes upregulated in mycelia, mycelia-to-yeast and yeast. The upregulated enzymes are listed as follows: ACO — Aconitase; ADH1 — alcohol dehydrogenase 1; ADH2 — alcohol dehydrogenase 2; ATPa — ATP synthase alpha subunit; ATPb — ATP synthase beta subunit; FBA — fructose 1,6-biphosphate aldolase; ECH — enoyl-CoA hydratase; ENO — enolase; GAPDH — glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GDH — glutamate dehydrogenase; ICL — isocitrate lyase; MCD — methylcitrate dehydratase; MCS — methylcitrate synthase; MDH — malate dehydrogenase; PGD — 3-phosphoglycerate dehydrogenase; PGK — phosphoglycerate kinase; PGL — phosphoglucomutase; PGM — phosphoglycerate mutase; PRX — mitochondrial peroxiredoxin; SOD — Mn superoxide dismutase; SUCLA — succinyl-CoA ligase; TAL — transaldolase; TKL — transketolase; TPI — triose phosphate isomerase.

Table 4 – Predicted post-translational modifications of identified protein isoforms.

| Protein description | Accession number | Spot number | Preferential expression* | Theo. Mr (kDa)/pI | Expt. Mr (kDa)/pI | PTM† | Sequence coverage %‡ | Nº of mass values matched# | |
|--|------------------|-------------|--------------------------|-------------------|-------------------|--------------|------------------------|----------------------------|----|
| Hsp70-like protein | PAAG_08003 | 9 | T | 70.9/5.08 | 63.4/4.75 | – | 57 | 39 | |
| | | 6 | C | 70.9/5.08 | 67.0/4.79 | – | 69 | 51 | |
| Enolase | PAAG_00771 | 28 | T | 47.4/5.67 | 44.1/5.64 | – | 54 | 36 | |
| | | 29 | T | 47.4/5.67 | 44.1/5.79 | – | 66 | 45 | |
| | | 30 | C | 47.4/5.67 | 44.2/5.98 | – | 66 | 24 | |
| | | 31 | C | 47.4/5.67 | 44.0/6.21 | – | 71 | 39 | |
| | | | | | | | phospho(S–T) | 63 | 24 |
| | | | | | | | phospho(Y) | 68 | 32 |
| Phosphoglycerate kinase | PAAG_02869 | 46 | Y | 45.3/6.48 | 41.7/5.97 | – | 63 | 23 | |
| | | | | | | | phospho(Y) | 66 | 28 |
| Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase | PAAG_08468 | 63 | Y | 36.6/8.26 | 37.1/9.13 | – | 57 | 21 | |
| | | 62 | C | 36.6/8.26 | 37.1/8.80 | – | 64 | 27 | |
| Formamidase | PAAG_03333 | 32 | T | 46.1/6.10 | 44.0/6.86 | – | 80 | 44 | |
| | | | | | | | phospho(Y) | 77 | 27 |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D | PAAG_03334 | 53 | M | 41.4/5.36 | 39.2/5.20 | – | 85 | 31 | |
| | | | | | | | phospho(S–T) | 89 | 29 |
| ATP synthase subunit alpha | PAAG_04820 | 18 | T | 51.0/8.67 | 49.2/8.98 | – | 93 | 35 | |
| | | | | | | | phospho(S–T) | 57 | 22 |
| Heat shock protein SSC1 | PAAG_01339 | 8 | T | 73.8/5.92 | 64.0/5.28 | – | 68 | 22 | |
| | | | | | | | acet(k) + phospho(S–T) | 72 | 32 |
| | | | | | | phospho(Y) | 55 | 26 | |
| | | | | | | acet(k) | 62 | 30 | |
| | | | | | | – | 57 | 46 | |
| | | | | | | phospho(S–T) | 65 | 41 | |
| | | | | | | – | 69 | 50 | |

* Up-regulated condition: mycelia (M), mycelia-to-yeast transition (T) and yeast (Y).

†PTM — post translational modifications: acet(K) — lysine acetylation; phospho(S–T–Y) — serine, threonine and tyrosine phosphorylation.

Values returned by MASCOT search tool using none or specific variable modifications.

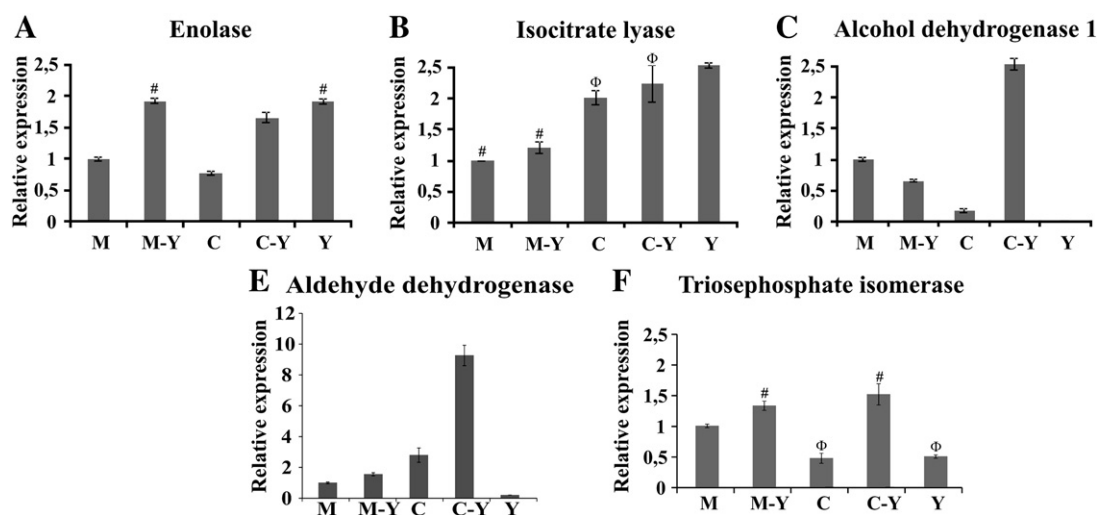


Fig. 4 – (A) Quantitation of the mRNA expression of selected genes of *P. brasiliensis* by quantitative real time RT-PCR. The expression levels of transcripts from *P. brasiliensis* derived from the mycelia (M), the mycelia-to-yeast transition (T), the conidia (C), the conidia-to-yeast transition (C–Y) and the yeast (Y) cells, were evaluated by qRT-PCR. The primers were derived from the genomic sequences and are listed as follows: A — enolase (PAAG_00771); B — isocitrate lyase (PAAG_06951); C — alcohol dehydrogenase (PAAG_04541), D — aldehyde dehydrogenase (PAAG_05249); E — triosephosphate isomerase (PAAG_02585). Error bars indicate the standard deviations from three independent experiments performed in triplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post test. Symbols indicate no significant differences in expression between the samples.

3.9. Immunoblotting analysis

To validate the protein abundance measurements, we performed a Western blot analysis focusing on six *P. brasiliensis* proteins (Fig. 5), in which total protein extracts from mycelia, mycelia-to-yeast transition and yeast were utilized. As demonstrated by the western blot analysis, the expression of the enzymes isocitrate lyase, triosephosphate isomerase, fructose 1,6-biphosphate aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, aconitase and enolase correlates with proteomic analysis.

4. Discussion

We analyzed the *P. brasiliensis* mycelia, mycelia-to-yeast transition and yeast proteome using 2-DE coupled to mass spectrometry and performed an analysis of the changes in protein abundance. The proteome analysis of the three developmental stages of *P. brasiliensis* resulted in the identification of 100 proteins, of which 81 are differentially expressed. The *P. brasiliensis* proteomes described here, despite being inexhaustible, provide the first information on the fungal protein expression in the saprobiotic mycelial phase, during the mycelia-to-yeast transition and in the yeast parasitic phase.

By comparing the three developmental stages, some proteins are preferentially expressed in the *P. brasiliensis* mycelia. A peroxiredoxin (PRX) and Mn superoxide dismutase (MnSOD) are included in this category. The reactive oxygen species (ROS) are byproducts of many oxygen-dependent redox

reactions. MnSOD plays a key role in preventing oxidative stress in mitochondria [20]. Peroxiredoxins (PRXs) are antioxidant enzymes that use redox-active cysteines to reduce peroxide by employing the reducing potential of a variety of thiols [21]. Additionally, the mitochondrial peroxiredoxin/thioredoxin system protects MnSod against inactivation by peroxynitrite, which is primarily generated by the reaction of the superoxide anion and NO [22]. The mycelial phase has been reported to have a more aerobic metabolism compared to the yeast phase, as demonstrated by transcriptional analysis [5]. The upregulation of MnSOD and PRX suggests a need for increased protection against respiration-derived ROS.

Most of the upregulated proteins were detected during the mycelia-to-yeast transition and in yeast, with 30 and 33 overexpressed proteins, respectively. As might be expected, we identified several heat shock/stress-related proteins that were expressed preferentially in the mycelia-to-yeast transition, including HSP88, HSP90 and isoforms of HSP70. The transcriptional analysis of the proteins involved during the mycelia-to-yeast transition showed a group of *hsp* genes that were clearly induced early at 5 h after the temperature shift, although at 10 h after the transition, the genes exhibited distinct expression patterns [6]. Previous studies of the mycelia-to-yeast transition at 22 h demonstrated increased expression of transcripts encoding HSP70 and HSP90, suggesting that for some molecules, the transcript and protein levels are correlated [7].

Our proteomic analysis indicates a global reorganization of *P. brasiliensis* carbohydrate metabolism during the morphological switch from mycelia-to-yeast. The production of energy in

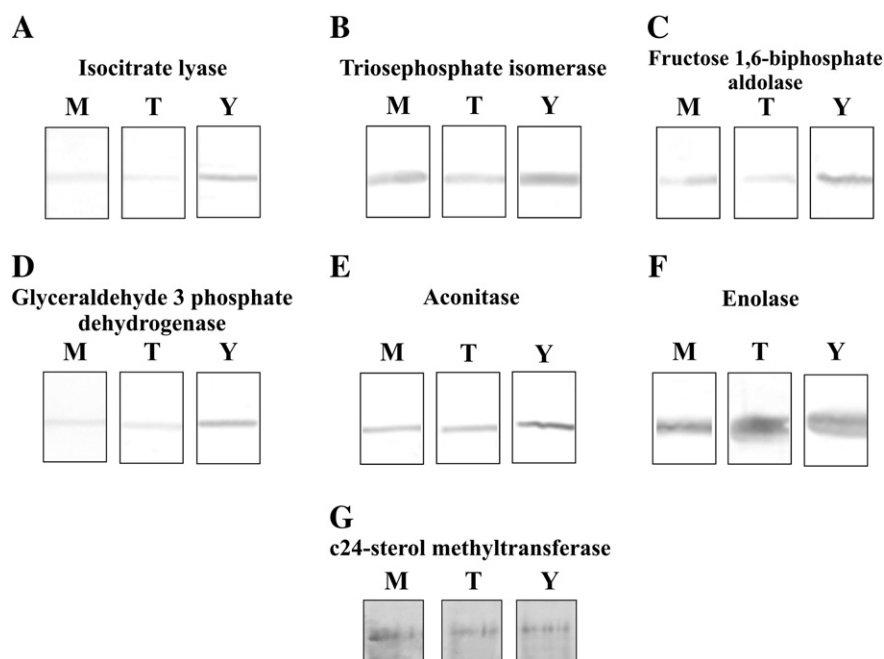


Fig. 5 – Western blot analysis. (A) A total of 30 μ g of protein extracted from *P. brasiliensis* mycelia (M), mycelia-to-yeast transition during 22 h (T) and yeast (Y) were fractionated by SDS-PAGE (12%) and transferred to a nitrocellulose membrane. Protein extracts are shown after the reaction with polyclonal antibodies against the following proteins: A — isocitrate lyase; B — triosephosphate isomerase; C — fructose bisphosphate aldolase; D — glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; E — aconitase; F — enolase; G — c24-sterol methyltransferase, as a loading control. The blots were incubated with the mouse or rabbit polyclonal antibodies coupled to alkaline phosphatase and developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT).

the form of ATP in the 10 enzyme-catalyzed processes of glycolysis are linked to the generation of intermediates and the reducing potential in the form of NADH, which is subsequently used in biosynthetic pathways. Under anaerobic conditions, the transformation of pyruvate to ethanol seems to prevail. One major change detected in our studies is the accumulation of enzymes of the glycolysis pathway and of alcohol dehydrogenase starting at 22 h after the mycelia-to-yeast transition. Consistent with this finding, *P. brasiliensis* transcriptional studies have shown a shift toward anaerobic metabolism in the yeast phase [5,6].

With regard to the mycelia-to-yeast transition, our proteomic data also suggest an upregulation of the pentose phosphate pathway, which is a major pathway for the recycling of NADP⁺ to NADPH and for the production of ribose-5-phosphate. The enzymes transaldolase and transketolase were induced during the mycelia-to-yeast transition, indicating the production of fructose 6P and glyceraldehyde 3P, which are used by the cell to produce ATP via glycolysis. We propose that the changes in the abundance of the enzymes involved in glycolysis and the pentose phosphate pathway might cause the accumulation of precursor molecules in yeast. Similar results have been described in the proteome of *Candida albicans* hyphae in comparison with yeast cells [23].

An additional role of the pentose phosphate pathway is to protect the cells against reactive oxygen intermediates, a role that is especially important to the parasitic mode of life [24]. Transaldolase is a key enzyme in the non-oxidative branch of the pathway that is responsible for the production of NADPH. Notably, the primary function of this pathway is to maintain glutathione in a reduced state, which functions to provide protection of sulfhydryl groups and cellular integrity from oxygen radicals. The enzyme glutathione reductase was constitutively expressed in all the analyzed fungal phases.

Consistent with the hypothesis that fatty acids might be an important carbon and energy source for *P. brasiliensis* in the mycelia-to-yeast transition and in the yeast itself, the proteomic data demonstrated that the glyoxylate cycle enzyme isocitrate lyase is induced during the yeast phase. The glyoxylate pathway facilitates the synthesis of C4 dicarboxylic acids from acetyl-CoA units, bypassing the both of the decarboxylation steps in the TCA cycle. The cycle has been linked to fungal pathogenesis. For example, many of the genes highly induced in phagocytized *C. albicans* were members of the glyoxylate cycle [25,26]. Additionally, the propionyl-CoA produced by the β -oxidation of odd-chain length fatty acids can be assimilated mainly in the transition phase and in yeast, as suggested by the overexpression of the enzymes methylcitrate synthase and methylcitrate dehydratase, respectively. Studies have previously demonstrated that the methylcitrate cycle is essential for propionate metabolism in pathogens [27].

The metabolism of amino acids and nitrogen is particularly overrepresented in the mycelia-to-yeast transition state and in yeast, as demonstrated by the presence of the cognate enzymes induced during those fungal phases. The enzymes of the biosynthetic pathway for methionine and cysteine are overexpressed during the mycelia-to-yeast transition

(adenosylhomocysteinase) and in the yeast phase (cobalamin independent synthase and O-acetylhomoserine(thiol)-lyase). Cysteine was required to complete the mycelia-to-yeast transition of *Histoplasma capsulatum* induced by temperature shifting [28]. Cysteine and other sulfhydryl compounds activate respiratory shunt pathways, which permit electron transport to bypass blocked portions of the cytochrome system in *P. brasiliensis* [29]. Consistent with this finding, ATP synthase subunits are overexpressed during the mycelia to yeast transition.

As described in the Results, the same protein was identified in different spots. This phenomenon is common in 2-DE and indicates the occurrence of protein modifications. Additionally, the decreased correlation between the experimental and theoretical values of *pI* is probably due to post-translational modifications (PTMs). One striking result of this study is the insight into the abundance and regulation of *P. brasiliensis* protein isoforms. From our analysis, it is evident that several of the protein isoforms are due to PTMs. The HSP70-like protein was identified as two isoforms in this study. The *pI* changes of about 0.2 pH units observed in HSP70 isoforms are consistent with *pI* changes observed in protein phosphorylation, which is the putative PTM predicted by our analysis [30]. We also show that the glycolytic enzyme enolase is present in four isoforms, putatively related to phosphorylation and acetylation. In *Plasmodium yoelii*, some PTMs of enolase are due to phosphorylation, with different isoforms localized in different cellular compartments [31]. Enolase has been reported to serve a number of functions unrelated to glycolysis in various organisms, and in *P. brasiliensis*, the enzyme that presents multiple cellular localization has been suggested to be involved *P. brasiliensis* pathogenesis, mediating the fungal binding to plasminogen [9]. Interestingly, another glycolytic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, which also presents two differentially expressed isoforms due to phosphorylation, was previously suggested to be part of the molecular invasion machinery of *P. brasiliensis* [32].

Several of the proteins that were overexpressed after 22 h of the mycelia-to-yeast transition do not correlate with the transcript upregulation detected previously [7]. We believe that the transcriptional changes can be induced early in the transition event. By comparing the transcriptional and proteomic data for the early transition [7], we verified that the transcripts potentially related to cell wall synthesis/remodeling were overexpressed in the first 22 h of the mycelia-to-yeast transition. The cognate proteins were not detected in our analyzed conditions, suggesting that their synthesis/accumulation either occurs later in the developmental process or their protein expression is poor, which could impair detection. Some proteins that are preferentially expressed in the fungal phases have been described previously. Y20 was recognized as a member of the flavin mononucleotide flavodoxin-like WrbA family, involved in heat shock and oxidative stress [33], and the cognate transcript is preferentially expressed during the yeast phase, consistent with the protein data [5]. Similarly, the proteins/isoforms of the glycolytic enzymes fructose 1,6-biphosphate aldolase [8], triosephosphate isomerase [19], enolase [9] and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [34] were previously demonstrated to predominate during the yeast parasitic phase.

This study not only sheds light on the development of *P. brasiliensis*, but it also identifies proteins that are upregulated as the fungus becomes increasingly infectious to humans.

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jprot.2011.08.020.

Acknowledgments

This work at Universidade Federal de Goiás was supported by grants from CNPq and FAPEG (PRONEX), FINEP (process number 0106121200) and from CNPq (process number 558405/2008-8). TCVR is the recipient of a CAPES PhD fellowship. The authors would like to thank Kelly P. Castro for the helpful suggestions.

REFERENCES

- McEwen JG, Bedoya V, Patino MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* 1987;25(3): 165–75.
- Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* 2001;39(3):233–41.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993;6(2):89–117.
- Rooney PJ, Klein BS. Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol* 2002;4(3):127–37.
- Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhao AQ, Torres FA, et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* 2005;280(26):24706–14.
- Nunes LR, Costa de Oliveira R, Leite DB, da Silva VS, dos Reis Marques E, da Silva Ferreira ME, et al. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell* 2005;4(12): 2115–28.
- Bastos KP, Bailao AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MS, Silva MG, et al. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* 2007;7:29.
- Fonseca CA, Jesuino RS, Felipe MS, Cunha DA, Brito WA, Soares CMA. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 2001;3(7):535–42.
- Nogueira SV, Fonseca FL, Rodrigues ML, Mundodi V, Abi-Chacra EA, Winters MS, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infect Immun* 2010;78(9):4040–50.
- Borges CL, Parente JA, Barbosa MS, Santana JM, Bao SN, de Sousa MV, et al. Detection of a homotetrameric structure and protein–protein interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* formamidase lead to new functional insights. *FEMS Yeast Res* 2010;10(1).
- Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Patino MM. A technique to collect and dislodge conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *J Med Vet Mycol* 1986;24(3):247–50.
- Guercio RA, Shevchenko A, Lopez-Lozano JL, Paba J, Sousa MV, Ricart CA. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci* 2006;4: 11.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68(5):850–8.
- Winters MS, Spellman DS, Chan Q, Gomez FJ, Hernandez M, Catron B, et al. *Histoplasma capsulatum* proteome response to decreased iron availability. *Proteome Sci* 2008;6:36.
- Borges CL, Bailao AM, Bao SN, Pereira M, Parente JA, Soares CMA. Genes potentially relevant in the parasitic phase of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 2011;171(1):1–9.
- Bookout AL, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Pesola JM, Kramer MF. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al, editors. *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken NJ: John Wiley and Sons; 2006. p. 1581–628.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227 (5259):680–5.
- Brito WA, Rezende TCV, Parente AF, Ricart CA, Souza MV, Bao SN, et al. Identification, characterization and regulation studies of the Aconitase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Biol* 2011;115(8):697–707.
- Pereira LA, Bao SN, Barbosa MS, da Silva JL, Felipe MS, de Santana JM, et al. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res* 2007;7(8):1381–8.
- Luk E, Yang M, Jensen LT, Bourbonnais Y, Culotta VC. Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2005;280 (24):22715–20.
- Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(15):7017–21.
- Pedrajas JR, Carreras A, Valderrama R, Barroso JB. Mitochondrial 1-Cys-peroxiredoxin/thioredoxin system protects manganese-containing superoxide dismutase (Mn-SOD) against inactivation by peroxynitrite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nitric Oxide* 2010;23(3):206–13.
- Monteoliva L, Martinez-Lopez R, Pitarch A, Hernaez ML, Serna A, Nombela C, et al. Quantitative proteome and acidic subproteome profiling of *Candida albicans* yeast-to-hypha transition. *J Proteome Res* 2011;10(2):502–17.
- Rui B, Shen T, Zhou H, Liu J, Chen J, Pan X, et al. A systematic investigation of *Escherichia coli* central carbon metabolism in response to superoxide stress. *BMC Syst Biol* 2010;4:122.
- Lorenz MC, Fink GR. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* 2001;412(6842):83–6.
- Lorenz MC, Fink GR. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell* 2002;1(5): 657–62.
- Munoz-Elias EJ, Upton AM, Cherian J, McKinney JD. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. *Mol Microbiol* 2006;60(5): 1109–22.
- Maresca B, Lambowitz AM, Kumar VB, Grant GA, Kobayashi GS, Medoff G. Role of cysteine in regulating morphogenesis and mitochondrial activity in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78(7): 4596–600.
- Medoff G, Painter A, Kobayashi GS. Mycelial- to yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 1987;169(9):4055–60.
- Zhu K, Zhao J, Lubman DM, Miller FR, Barder TJ. Protein pI shifts due to posttranslational modifications in the separation and characterization of proteins. *Anal Chem* 2005;77(9):2745–55.

- [31] Pal-Bhowmick I, Vora HK, Jarori GK. Sub-cellular localization and post-translational modifications of the *Plasmodium yoelii* enolase suggest moonlighting functions. *Malar J* 2007;6:45.
- [32] Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, Feitosa LS, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* 2006;74(1): 382-9.
- [33] Daher BS, Venancio EJ, de Freitas SM, Bao SN, Vianney PV, Andrade RV, et al. The highly expressed yeast gene PbY20 from *Paracoccidioides brasiliensis* encodes a flavodoxin-like protein. *Fungal Genet Biol* 2005;42(5):434-43.
- [34] Barbosa MS, Cunha Passos DA, Felipe MS, Jesuino RS, Pereira M, Soares CMA. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. *Fungal Genet Biol* 2004;41(7):667-75.