

**Universidade de Brasília– UnB**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular**

**Expressão e caracterização bioquímica de uma  $\alpha$ -1,2  
manosiltransferase recombinante de *Paracoccidioides lutzii***

**Patrícia Alves Silva**

**Brasília, 2015**

**PATRÍCIA ALVES SILVA**

**Expressão e caracterização bioquímica de uma  $\alpha$ -1,2  
manosiltransferase recombinante de *Paracoccidioides lutzii***

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Patologia  
Molecular da Faculdade de  
Medicina da Universidade de  
Brasília, como requisito  
necessário para a obtenção do  
Título de Mestre em Patologia  
Molecular

Orientadora: Profª. Dra Maria Sueli Soares Felipe

Brasília, 2015

**Universidade de Brasília– UnB**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular**

**Patrícia Alves Silva**

**Expressão e caracterização bioquímica de uma  $\alpha$ -1,2 manosiltransferase  
recombinante de *Paracoccidioides lutzii***

Banca Examinadora

Orientadora: Profª. Dra Maria Sueli Soares Felipe  
Examinador Externo: Profª. Dra Simoni Campos Dias  
Examinador Interno: Prof. Dr. André Moraes Nicola  
Suplente: Profª. Dra Élide Geralda Campos

## DEDICATÓRIA

*À minha mãe, por ser tão presente  
em minha vida principalmente nos  
momentos de grande dificuldade.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me capacitar e me honrar e assim foi possível a realização de mais um sonho, um grande desafio. Agradeço por colocar em meu caminho pessoas especiais e que contribuíram muito antes e durante todo o processo.

À professora Maria Sueli que me ofereceu a oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa ainda na graduação e assim, eu pude colaborar com uma pequena parcela em seus grandes projetos. É uma grande incentivadora na formação de novos acadêmicos. Sou muito grata pela porta que a senhora abriu quando me permitiu ser membro do seu grupo, tornando possível agregar em minha vida valores que sempre sonhei.

À minha mãe Maria Madalena Alves, guerreira, que não se deixou abater quando a vida estava um tanto amarga, viúva aos 29 anos e com 4 filhos para criar. Tenho enorme gratidão, pois, sempre estive ao meu lado me incentivando, e não me deixou desistir quando eu estava sem forças. Obrigada por seu sacrifício, paciência e grande amor.

Ao meu pai João de Deus (*in memoriam*) que estaria muito orgulhoso pelo meu crescimento.

Ao meu padrasto Erotildes que sempre estive ao meu lado representando a imagem paterna.

Aos meus irmãos João Paulo, Leonardo, Fábio pelos momentos em família. Momentos que só irmãos entendem, e se entendem.

Aos meus avós materno que têm muito orgulho de ver onde cheguei e compartilham meus momentos com muita alegria (risos).

À minha vózinha paterna que partiu quando eu estava tão longe. Não pude participar deste momento de grande tristeza familiar. Guardarei a sete chaves sua última mensagem de voz (tão fraquinha) pedindo que eu voltasse logo ao Brasil, que estava com saudades!

Aos meus sobrinhos, tios, primos e cunhadas pelo apoio de sempre.

À professora Ana Karina que além de co-orientadora tem sido amiga e esteve presente em momentos alegres e também nos delicados da minha vida.

À Professora Érika que mesmo estando longe e com tantas ocupações, sempre encontra um tempinho para uma conversa.

Aos professores Sônia, Fernando, Janice, Patrícia Andrade e André por diversas vezes me ajudarem com algum experimento, alguma sugestão, e também discussão de resultados. Vocês tiveram grande importância neste processo.

À Dona Fátima, Dona Ivonildes por sempre nos ajudarem com a limpeza dos materiais. O serviço de vocês é de grande utilidade e tem ajudado a muitos principalmente na hora do sufoco.

A todos os meus colegas de Laboratório que foram excelentes e proporcionaram desde momentos de descontração (dentro e fora do laboratório) até auxílio em parte dos experimentos. Tornaram-se pessoas especiais em minha vida.

Ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular pela oportunidade.

Às agências de fomento CNPq e Capes pelo apoio financeiro que proporcionou a realização desta pesquisa.

Às minhas amigas e amigos por apoiarem meus ideais, peço que me perdoem pela ausência.

A todos, o meu muito obrigado e um forte abraço!

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1	Micoses Sistêmicas.....	17
1.2	Paracoccidioidomicose .....	18
1.3	Antifúngicos .....	25
1.4	Genômica Comparativa .....	26
1.5	Modelagem molecular por homologia.....	29
1.6	Varredura virtual de quimiotecas na busca de novos antifúngicos .....	31
1.7	A proteína KRE2 .....	32
1.8	Sistema de expressão em <i>Escherichia coli</i> .....	36
1.9	Sistema de expressão em <i>Pichia pastoris</i> .....	37
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>38</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>39</b>
3.1	Objetivo Geral .....	39
3.2	Objetivos Específicos .....	39
<b>4</b>	<b>MATERIAIS .....</b>	<b>40</b>
4.1	Microorganismos .....	40
4.1.1	Bactérias .....	40
4.1.2	Fungos: .....	40
4.2	Meios de cultura .....	40
4.2.1	Meio para cultivo de bactérias .....	40
4.2.2	Meio para cultivo de leveduras .....	41
4.3	Soluções.....	41
4.3.1	Soluções para extração de DNA plasmidial .....	42
4.3.2	Soluções para eletroforese de DNA em gel de agarose.....	42
4.3.3	Soluções para eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) .....	42
4.3.4	Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com azul de <i>comassie</i> .....	42
4.3.5	Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com prata .....	43
4.3.6	Soluções para <i>western blot</i> .....	43
4.3.7	Soluções para purificação da proteína .....	43
4.3.8	Soluções para diálise e gel filtração.....	43

4.4	Colunas cromatográficas .....	44
4.5	Vetores.....	44
4.6	Enzimas .....	46
4.7	Marcadores .....	47
4.8	Anticorpo.....	47
4.9	Membrana de nitrocelulose .....	47
4.10	Kits .....	47
4.11	Placas de 96 poços.....	47
4.12	Imunocito-localização.....	47
4.13	Ensaio enzimático radioativo .....	48
4.14	Líquido cintilador da reação enzimática.....	48
<b>5</b>	<b>MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
5.1	Síntese química do gene <i>kre2</i> .....	49
5.1.1	Otimizado para <i>E. coli</i> .....	49
5.1.2	Otimizado para <i>Pichia pastoris</i> .....	49
5.2	Digestão de DNA com enzimas de restrição .....	50
5.3	Eletroforese de DNA em gel de agarose .....	51
5.4	Transformação de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysE por choque térmico .....	51
5.5	Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep).....	51
5.6	Otimização da expressão heteróloga em <i>E. coli</i> .....	52
5.7	Análise da expressão heteróloga em <i>E. coli</i> .....	52
5.8	Indução em frasco em da proteína KRE2 <i>E. coli</i> .....	53
5.9	Análise por <i>western blot</i> .....	54
5.10	Purificação da proteína .....	54
5.11	Quantificação de proteína pelo ensaio de Bradford .....	55
5.12	Ultrafiltração da proteína.....	55
5.13	Purificação da proteína heteróloga em <i>E. coli</i> por exclusão molecular .....	55
5.14	Precipitação com TCA 100% .....	56
5.15	Coloração do gel de poliacrilamida por prata.....	56
5.16	Espectrometria de massa (MS) e identificação de proteínas por “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF).....	57
5.17	Produção de Anticorpo anti-KRE2.....	57
5.18	Imunocito-localização.....	58
5.19	Transformação de <i>Pichia pastoris</i> por eletroporação.....	58

Indução em placa <i>Deep well</i> .....	59
5.20 Análise dos transformantes por <i>dot blot</i> .....	59
5.21 Indução de recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> em frasco usando vetor pPIC9. 59	
5.22 Indução de recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> em frasco usando vetor pPICZαA 60	
5.23 Purificação da proteína recombinante em <i>Pichia pastoris</i> usando vetor pPICZαA.....	60
5.24 Ensaio enzimático.....	61
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
6.1 Expressão do gene <i>kre2</i> em <i>E. coli</i> .....	63
6.2 Imunocitolocalização.....	71
6.3 Expressão do gene <i>kre2</i> em <i>P. pastoris</i> usando vetor pPIC9 .....	73
6.4 Expressão do gene <i>kre2</i> em <i>P. pastoris</i> usando vetor pPICZαA.....	79
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>92</b>
<b>8 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>94</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>

## RESUMO

O crescente número de casos de infecções fúngicas sistêmicas tem sido motivo de grande preocupação em âmbito mundial. As opções terapêuticas disponíveis atualmente são limitadas, dividida em quatro grupos: os Polienos (anfotericina B), Fluoropirimidinas (flucitosina), Azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol) e Equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina). Além disso, vem sendo observado há algum tempo o surgimento de resistência aos agentes antifúngicos como Anfotericina B e derivados azólicos, surgindo à necessidade do desenvolvimento de novos antifúngicos. Atualmente, a pesquisa e o desenvolvimento de drogas consomem muito tempo e apresentam altos riscos. O planejamento baseado na estrutura e no mecanismo de ação tem se mostrado uma estratégia eficiente e menos dispendiosa para desenvolvimento de novos fármacos. Neste contexto, em resultados preliminares obtidos pelo grupo, por meio de análise *in silico*, foram identificados quatro possíveis genes-alvos, que estão presentes em sete fungos patogênicos humanos relevantes e ausentes no genoma humano. Entre estes genes-alvo está o *kre2* ou *Mnt1*, que codifica uma proteína de aproximadamente 49 kDa, a  $\alpha$  - 1,2 manosiltransferase. Esta é uma proteína importante para viabilidade celular e virulência do patógeno no interior do hospedeiro. Além da seleção dos dez genes candidatos, nosso grupo identificou por métodos *in silico* de modelagem molecular e *screening* virtual, 17 compostos de baixa massa molecular (*small molecules*) que potencialmente têm capacidade de inibir a enzima  $\alpha$  - 1,2-manosiltransferase (KRE2) de *P. lutzii*. Das 17 moléculas selecionadas, uma se destacou nos testes de susceptibilidade contra fungos de importância médica e foi denominada de molécula 3. Com testes de inibição *in vitro* promissores surgiu-se a necessidade de avaliar se de fato esta molécula é capaz de inibir especificamente o alvo molecular KRE2 de *P. lutzii*. Os resultados alcançados neste trabalho apontam para o sucesso na obtenção desta proteína no sistema de expressão heteróloga em *Pichia pastoris*. Uma vez que este sistema realiza glicosilação de proteínas, possibilita o dobramento correto da enzima alvo, e fornece as condições necessárias para continuidade dos experimentos. Quantidades razoáveis da proteína foram produzidas heterologamente, o que possibilitou a realização dos ensaios para determinação dos parâmetros cinéticos e testes de inibição enzimática usando a molécula 3 contra o alvo KRE2 de *P. lutzii*. Utilizando substrato marcado com [<sup>14</sup>C] nas reações, foi determinado

o  $K_m$  aparente de KRE2 de *P. lutzii* que atingiu 3,7 pM, demonstrando alta afinidade da enzima pelo substrato em relação aos dados descritos na literatura. De forma semelhante, os testes de inibição enzimática utilizaram o isótopo radioativo e a molécula 3 foi usada contra as enzimas KRE2 de *P. lutzii* e MNT1 de *Cândida albicans*. Os resultados obtidos para KRE2 de *P. lutzii* demonstram que na presença da molécula inibidora, foi observada uma redução da atividade enzimática de até 60%. No entanto, a redução da atividade enzimática de MNT1 de *Cândida albicans* ficou em 20%. Faz-se necessário destacar que a molécula 3 apresenta problemas de solubilidade e que novos ensaios de susceptibilidade contra espécies de *Cândida spp.* utilizando Pluronic F-127 associados a molécula 3 foram realizados pelo nosso grupo e os resultados foram promissores. Desta forma, o melhoramento da solubilidade da molécula 3 representa um avanço nos testes de inibição *in vitro*, o que aumenta a expectativa de um MIC<sub>90</sub> melhor para os outros fungos de importância médica. Os resultados apresentados neste trabalho representam um avanço na validação da molécula 3 como inibidor de KRE2 de *P. lutzii*, o que poderá contribuir com dados relevantes para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de micoses de relevância mundial.

Palavras chave: *Paracoccidioides lutzii*,  $\alpha$  - 1,2- manosiltransferase, KRE2, Genômica comparativa, Varredura virtual, Modelagem molecular, *small molecules*.

## ABSTRACT

The occurrence of growth of systemic infections has been the cause of great concern worldwide. The therapeutic options currently available are limited, and are divided into four groups, Polyenes (amphotericin B), fluoropyrimidines (flucytosine), Azoles (ketoconazole, fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole) and Echinocandins (caspofungin, micafungin and anidulafungin). Furthermore, this is observed of resistance to antifungal agents such as amphotericin B and azoles, leading to the need of development of new antifungal agents. Currently, the research and drug development, consume much time and it have high risks. The planning based on structure and mechanism of action has proven to be an efficient and less expensive strategy for development of new drugs. In this context, in preliminar results obtained by the group using *in silico* analysis identified four possible target genes which are present in seven relevant human pathogenic fungi and absent in the human genome. Among these target genes *Kre2* or *Mnt1* is responsible to encode a protein of approximately 49 kDa, the  $\alpha$  - 1,2 mannosyltransferase. This is an important protein for cell viability and virulence of the pathogen within the host. Besides the selection of ten candidate genes, our group identified using *in silico* methods of molecular modeling and virtual screening 17 compounds of low molecular weight (small molecules) that potentially have the ability to inhibit the enzyme  $\alpha$  - 1,2 mannosyltransferase (KRE2) of *P. lutzii*. Of the 17 molecules selected, one highlighted out in susceptibility tests against fungi of medical importance and was called molecule 3. With *in vitro* inhibition tests promising, the need to evaluate if in fact this molecule is able to specifically inhibit the molecular target KRE2 of *P. lutzii* emerged. The results obtained in this study point to the success in getting this protein in heterologous expression system in *Pichia pastoris*. Once this system performs glycosylation of proteins, it allows the correct folding of the target enzyme, favoring the necessary conditions to continue the experiments. Reasonable amounts of protein were produced heterologously, allowing the tests to determine the kinetic parameters and enzyme inhibition tests using the molecule 3 against the target KRE2 *P. lutzii*. Using labeled substrate [<sup>14</sup>C] in the reactions, apparent  $K_m$  of KRE2 of *P. lutzii* was determined, which reached 3.7 pM, demonstrating the high affinity of the enzyme for the substrate in comparison to data in the literature. Similarly, the enzymatic inhibition tests used the radioactive isotope and the molecule 3 was used against enzymes KRE2 of *P. lutzii* and MNT1 of *Candida albicans*. The results obtained for

KRE2 of *P. lutzii* demonstrated that in the presence of the inhibitor molecule, was observed a reduction in the enzymatic activity by 60%. However, reduction of the enzymatic activity of MNT1 of *Candida albicans* was 20%. It is necessary to point out that the molecule 3 shows solubility issues, additional susceptibility testing against species of *Candida spp.* using Pluronic F-127 linked to molecule3 were carried out by our group with promising results. Thus, the improvement of the solubility of the molecule 3 represented an advance in vitro inhibition tests, which increases the expectation of better MIC<sub>90</sub> for other fungi of medical importance. The results presented in this work represents an advancement in the validation of the molecule 3 as an inhibitor of KRE2 of *P. lutzii*, which may contribute to important data for the development of new drugs for the treatment of fungal infections of global relevance.

Keywords: *Paracoccidioides lutzii*,  $\alpha$  - 1,2 mannosyltransferase, KRE2, comparative genomics, virtual screening, molecular modeling, small molecules.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática dos componentes da parede celular da levedura de <i>Paracoccidioides sp</i>	21
<b>Figura 2:</b> Ciclo biológico hipotético do gênero <i>Paracoccidioides</i> .	22
<b>Figura 3:</b> Mapa de distribuição geográfica do gênero <i>Paracoccidioides</i> .	24
<b>Figura 4:</b> Esquema do mecanismo de ação dos grupos de antifúngicos atuais.	26
<b>Figura 5:</b> Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína KRE2 em <i>A. fumigatus</i> , <i>B. dermatitidis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. immitis</i> , <i>H. capsulatum</i> e <i>P. brasiliensis</i> .	29
<b>Figura 6:</b> Estrutura tridimensional predita da proteína KRE2 de <i>P. lutzii</i> (Pb01) obtida por modelagem molecular por homologia.	30
<b>Figura 7:</b> Estratégia de varredura virtual para a busca de novos <i>hits</i> .	32
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática de proteínas da família KRE2/MNT1.	33
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática das formas de glicosilação em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática das formas de glicosilação em <i>Candida albicans</i> .	34
<b>Figura 11:</b> Mapa do vetor pET21a para expressão da proteína em <i>E. coli</i> .	44
<b>Figura 12:</b> Mapa do vetor pPIC9 para expressão da proteína em <i>Pichia pastoris</i> .	45
<b>Figura 13:</b> Mapa do vetor pPICZαA para expressão da proteína em <i>Pichia pastoris</i> .	46
<b>Figura 14:</b> Sequência de nucleotídeos do gene <i>kre2</i> otimizada para <i>E. coli</i> .	49
<b>Figura 15:</b> Sequência de aminoácidos e nucleotídeos correspondente a proteína KRE2 de <i>P. lutzii</i> .	50
<b>Figura 16:</b> Esquema da reação de transferência de manose a partir de GDP-manose para um α-manosídeo catalizado pela KRE2/MNT1.	62
<b>Figura 17:</b> Análise da expressão da proteína KRE2 em <i>E. coli</i> BL21 (λDE3) pLysE de indução em pequena escala.	64
<b>Figura 18:</b> Análise por <i>western blot</i> de purificação da proteína KRE2.	65
<b>Figura 19:</b> Análise de purificação da proteína KRE2 em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%.	65
<b>Figura 20:</b> Perfil de eluição da cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex™ G75.	66
<b>Figura 21:</b> Análise da cromatografia de exclusão molecular em gel de poliacrilamida 12%.	66

<b>Figura 22:</b> Análise de purificação em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12%.	67
<b>Figura 23:</b> Análise por espectrometria de massa da banda 1 vista em gel de poliacrilamida 12%.	68
<b>Figura 24:</b> Análise por espectrometria de massa da banda 2 vista em gel de poliacrilamida 12%.	69
<b>Figura 25:</b> Análise por espectrometria de massa da banda 3 vista em gel de poliacrilamida 12%.	69
<b>Figura 26:</b> Mapa proteolítico de KRE2.	70
<b>Figura 27:</b> Imunocitocalização da proteína KRE2 em <i>P. lutzii</i> .	72
<b>Figura 28:</b> <i>Dot blot</i> do sobrenadante de 96 horas de expressão em <i>P. pastoris</i> .	74
<b>Figura 29:</b> Curva de crescimento dos tempos 0h, 24h, 48h, 72h de indução em <i>P. pastoris</i> .	75
<b>Figura 30:</b> Análise da indução em frascos de <i>P. pastoris</i> transformada com pPIC9 <i>::kre2</i> em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % após 72 horas de indução com zeocina.	76
<b>Figura 31:</b> Curva de crescimento dos tempos 0h, 24h, 48h, 72h, 96h de indução em <i>P. pastoris</i> .	77
<b>Figura 32:</b> Análise da indução em frascos de <i>P. pastoris</i> transformada com pPIC9 <i>::kre2</i> em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % após 96 horas de indução com zeocina.	77
<b>Figura 33:</b> Análise de <i>pellets</i> de indução em frascos de <i>P. pastoris</i> transformada com pPIC9 <i>::kre2</i> em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % com uso de inibidores de protease.	78
<b>Figura 34:</b> Análise de expressão do gene <i>kre2</i> usando vetor pPICZα A, em gel de poliacrilamida 12%.	80
<b>Figura 35:</b> Análise da proteína recombinante KRE2 por <i>Dot blot</i> e corante <i>In Vision In-Gel Stain</i> .	81
<b>Figura 36:</b> Análise da proteína recombinante por Amicon 30μm e purificação em coluna de Níquel.	82
<b>Figura 37:</b> Teste de atividade enzimática com extrato total de dez clones.	83
<b>Figura 38:</b> Análise de atividade enzimática da proteína recombinante KRE2.	84
<b>Figura 39:</b> Teste de inibição de atividade enzimática de KRE2 pela molécula 3.	86
<b>Figura 40:</b> Teste de inibição de atividade enzimática de MNT1 pela molécula 3.	87

**Figura 41:** Alinhamento dos resíduos de aminoácidos das sequências de KRE2 e MNT1. 88

**Figura 42:** Efeito dos íons na atividade enzimática da proteína recombinante MNT1. 90

**Figura 43:** Efeito dos íons na atividade enzimática da proteína recombinante KRE2. 91

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Potenciais genes-alvo selecionados para desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.	28
<b>Tabela 2:</b> Linhagens de <i>E. coli</i> para expressão da proteína recombinante KRE2.	40
<b>Tabela 3:</b> Linhagens de <i>P. pastoris</i> para expressão da proteína recombinante KRE2.	40
<b>Tabela 4:</b> Otimização da expressão heteróloga em <i>E. coli</i> .	52
<b>Tabela 5:</b> Sítios de clivagem da proteína KRE2.	71

## 1 Introdução

### 1.1 Micoses Sistêmicas

A incidência e a gravidade das micoses sistêmicas têm crescido em todo o mundo, principalmente no ambiente hospitalar. Dados atuais têm mostrado um aumento substancial nas últimas décadas, atingindo índices de mortalidade na ordem de 50% (Pfäller, M e Diekema 2007; Diekema *et al.*, 2009, da Matta *et al.*, 2007). Desta forma, as infecções fúngicas invasivas estão associadas à alta morbidade e mortalidade, ao tempo prolongado das internações, e conseqüentemente aos custos elevados (Gudlaugsson *et al.*, 2003; Sable *et al.*, 2008; Kett *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011). O ambiente hospitalar em si, é considerado um grande foco de infecções fúngicas e a internação de indivíduos imunocomprometidos, por longos períodos, aumentam a exposição e paralelamente os riscos às diversas infecções oportunistas.

Entre os fatores de predisposição estão a imunodeficiência humana, na qual os pacientes apresentam uma maior susceptibilidade às infecções invasivas; indivíduos submetidos à quimioterapia, ou terapias imunossupressoras para transplante de órgãos ou de células hematopoiéticas (Netea *et al.*, 2008). Outros fatores que contribuem para a disseminação destas infecções são os procedimentos invasivos, como a utilização de catéteres, nutrição parenteral ou hemodiálise e tratamento com antibacteriano de amplo espectro ou uso intensivo de corticosteróides. Estes pacientes apresentam maior susceptibilidade às infecções causadas principalmente por fungos oportunistas, entre os agentes mais envolvidos estão *Candida spp.* especialmente do tipo não-albicans, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus spp.* (Netea *et al.*, 2008). Já entre os principais agentes etiológicos causadores de micoses endêmicas estão o *Paracoccidioides brasiliensis* e *Coccidioides spp.* (Colombo *et al.*, 2011; Buitrago & Cuenca-Estrella, 2011).

## 1.2 Paracoccidioidomicose

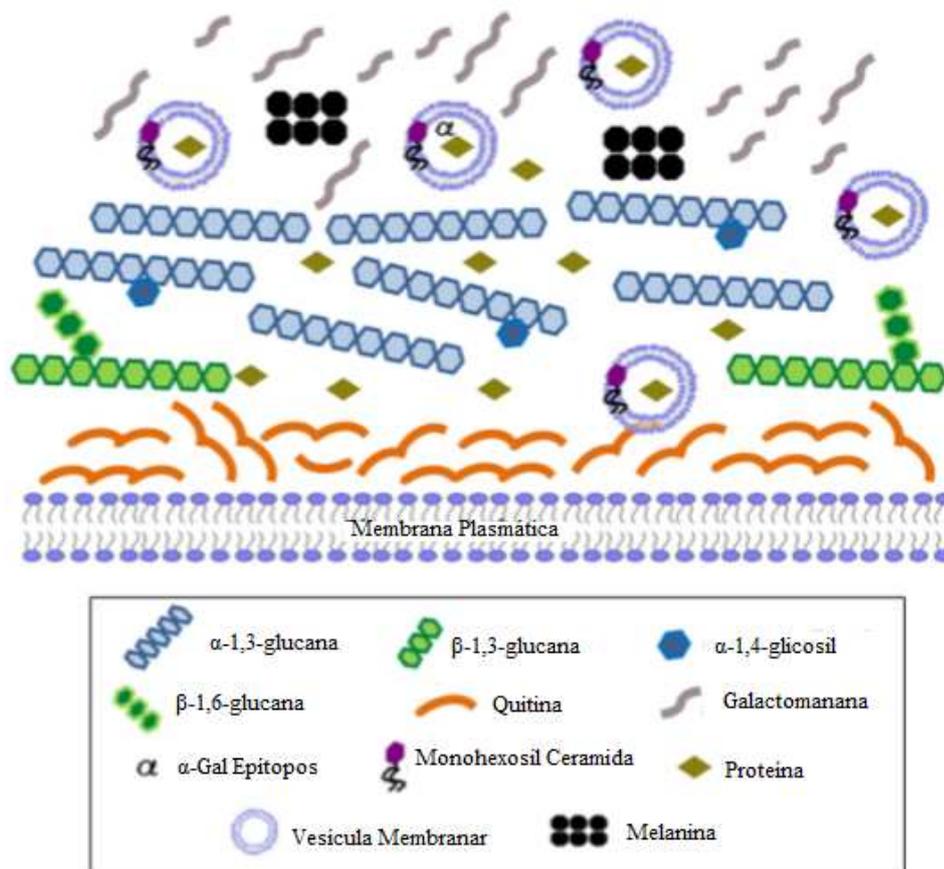
A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de caráter granulomatoso, caracterizada por comprometimento pulmonar, lesões ulceradas de pele, membranas mucosas (oral, nasal, gastrointestinal) e outros tecidos. Tem se destacado como a oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva, entre as infecciosas e parasitárias e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas (Coutinho *et al.*, 2002, Bocca *et al.*, 2013). É endêmica na América Latina, desde o sul do México até o norte da Argentina (Franco *et al.*, 1993, San-Blas *et al.*, 2002, Teixeira *et al.*, 2014). Antigamente conhecida como Blastomicose sul-americana ou Moléstia de Lutz-Splendore e Almeida, é a principal micose sistêmica de caráter endêmico. Tem grande prevalência no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina (Brummer *et al.*, 1993, Bocca *et al.*, 2013). No Brasil é endêmica, tendo a maior concentração de casos reportados nas regiões sul, sudeste e centro-oeste. Entretanto, tem sido relatada a ocorrência de casos em áreas mais recentemente submetidas ao desmatamento, tais como partes da Amazônia, atingindo áreas dos Estados do Maranhão, Tocantins, Pará, Mato Grosso Rondônia, Acre e Amazonas, onde a PCM pode ser considerada uma micose sistêmica emergente (Teixeira *et al.*, 2014). Há relatos de casos de importação da PCM em áreas não endêmicas, tais como: EUA, Europa e Ásia (Buitagro *et al.*, 2011, Bocca *et al.*, 2013).

O agente etiológico da PCM é o fungo patogênico humano do gênero *Paracoccidioides* (Bocca *et al.*, 2013, Teixeira *et al.*, 2014). Até então, era descrito na literatura como sendo o fungo *P. brasiliensis*. Estudos moleculares demonstraram que a espécie de *P. brasiliensis* é na realidade um complexo que compreende quatro espécies crípticas. *P. brasiliensis* S1 largamente distribuído na América do Sul, tem sido associado com a maioria dos casos de PCM até o momento (Teixeira *et al.*, 2014). Esta cepa também tem sido recuperada de tatus, solo e fezes de pinguins (Matute *et al.*, 2006, Teixeira *et al.*, 2014). *P. brasiliensis* PS2 identificado no Brasil e Venezuela (Matute *et al.*, 2006, Teixeira *et al.*, 2014). *P. brasiliensis* PS3 tem sido encontrado em humanos e tatus em áreas endêmicas na Colômbia (Matute *et al.*, 2006, Teixeira *et al.*, 2014). *P. brasiliensis* PS4 tem sido detectado em isolados clínicos na Venezuela (Theodoro *et al.*, 2012, Salgado-Salazar *et al.*, 2010, Teixeira *et al.*, 2014). Além disto, recentemente foi descrito por meio de análise filogenética de isolados clínicos da região centro-oeste do

Brasil e Equador (Pb01-like), uma nova espécie, denominada de *Paracoccidioides lutzii* (Teixeira *et al.*, 2009; Desjardins *et al.*, 2011). O gênero *Paracoccidioides* é classificado como fungo patogênico termodimórfico derivado do filo Ascomycota, família Ajellomycetaceae, e ordem Onygenales que inclui os anamórficos *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Emmonsia parva*, *Emmonsia crescens* e *Lacazia loboi* (Bocca *et al.*, 2013). O gênero *Paracoccidioides* pertencia à família Onygenaceae e foi reclassificado para a família Ajellomycetaceae. Fungos pertencentes a esta família são capazes de se adaptarem a dois tipos diferentes de nichos ecológicos, sendo o primeiro em condições saprofitas no solo e o segundo em tecidos de hospedeiros vertebrados, uma característica encontrada por todos os membros deste grupo (Untereiner *et al.*, 2004, Bocca *et al.*, 2013). É comumente observado em membros da família Ajellomycetaceae (Untereiner *et al.*, 2004, Teixeira *et al.*, 2013) a característica de pleomorfismo, quando o fungo tem a capacidade de se reproduzir de forma sexuada ou assexuada (San-blas *et al.*, 2002, Teixeira *et al.*, 2013). A forma assexuada pode ocorrer de três formas: 1) fragmentação da hifa, 2) produção de conídio em hifa especializada, 3) formação de brotamentos na forma de levedura. A forma de reprodução do gênero *Paracoccidioides* foi considerada por vários anos como assexual e clonal (San-blas *et al.*, 2002, Teixeira *et al.*, 2014). Recentemente, por estudos de genômica comparativa e genética de populações, foram detectados eventos de recombinação tanto em *P. lutzii* quanto em duas cepas de *P. brasilienses* (S1 e PS2), já a cepa PS3 foi considerada clonal (Matute *et al.*, 2006, Teixeira *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2014).

Por ser um fungo termo-dimórfico, do gênero *Paracoccidioides*, vive na natureza a 25°C em condições saprófitas e apresenta-se na forma de micélio. Esta estrutura quando analisada por microscopia óptica, apresenta-se como hifas filamentosas, septadas e finas capazes de formar diferentes tipos de conídios tais como: clamidoconídios, conídios terminais e artroconídios, denominados de propágulos infectantes (Queiroz *et al.*, 2011, Colombo *et al.*, 2007, Lacaz *et al.*, 2002), que podem infectar humanos (Franco *et al.*, 1994) cães (Ricci *et al.*, 2004; Farias *et al.*, 2005) tatus (Naiff *et al.*, 1986, Bagagli *et al.*, 1998; Bagagli *et al.*, 2003; Bagagli *et al.*, 2013, Corredor *et al.*, 1999) e preguiças (Trejo-Chaves *et al.*, 2011). Uma vez inalados e instalados nos alvéolos pulmonares, os propágulos infectantes dão origem a células de leveduras que são conhecidas como a forma parasitária (Capella Machado *et al.*, 2013). Estas estruturas da forma infectante apresentam em sua composição, 51% de

carboidratos, 33% de aminoácidos e 8% de lipídios (Kanetsuna *et al.*, 1972; Puccia *et al.*, 2011). Foram encontrados na camada externa da parede celular da forma de micélio o polímero  $\beta$ -1,3-glicana e na camada interna quitina. A forma leveduriforme pode apresentar brotamentos simples ou multibrotamentos (blastoconídios), sendo neste último conhecido como “roda de leme” (Colombo *et al.*, 2007). Esta forma do fungo se constitui na sua forma parasitária nos tecidos e fluidos do hospedeiro. A forma de levedura pode ser cultivada *in vitro* a temperaturas entre 28 e 37°C, tendo aspecto cerebriforme e coloração creme. A sua parede celular tem composição de 81% de carboidratos, 10% de aminoácidos e 11% de lipídios, sendo rica em  $\alpha$ -1,3-glicana na parte externa e quitina na interna, esta última, encontrada mais abundante neste estágio do fungo (Kanetsuna *et al.*, 1972, Puccia *et al.*, 2011) (**Figura 1**). Maiores concentrações de  $\beta$ -1,3-glicana em relação a  $\alpha$ -1,3-glicana sinaliza como um forte estimulador de resposta inflamatória e, portanto, sua presença em maior proporção torna mais fácil o reconhecimento do fungo pelo sistema imunológico do organismo parasitado e o consequente estabelecimento de resposta inflamatória contra o parasita, visando a sua eliminação (Borges-Walmsley *et al.*, 2002). Além dos compostos citados, foi encontrado o pigmento melanina carregada negativamente tanto em conídios quanto na parede celular de levedura (Gómez e cols. 2001; Puccia *et al.*, 2011). Registros anteriores relataram resistência de leveduras melanizadas de *P. brasiliensis* à fagocitose e morte por macrófagos e redução da susceptibilidade a anfotericina B (da Silva *et al.*, 2006, da Silva *et al.*, 2009; Puccia *et al.*, 2011). A transição micélio-levedura do gênero *Paracoccidioides*, tem expressiva mudança na composição da parede celular, e esta tem papel essencial na patogenicidade do fungo e pode determinar o curso da infecção. (Puccia *et al.*, 2011). Fatores que possivelmente contribuem para o dimorfismo do fungo são: temperatura e nutrientes. Foram encontrados outros fatores que provavelmente podem participar do processo de dimorfismo, possivelmente residentes na parede da célula, epítomos antigênicos de oligossacarídeos que são carregados por glicoesfingolipídios neutros e ácidos, glicosilceramida específica (ClcCer) e glicoinositol fosforil-ceramida (GIPCs) (Toledo *et al.*, 2001, Toledo *et al.*, 2010; Bertini *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2009; Puccia *et al.*, 2011).

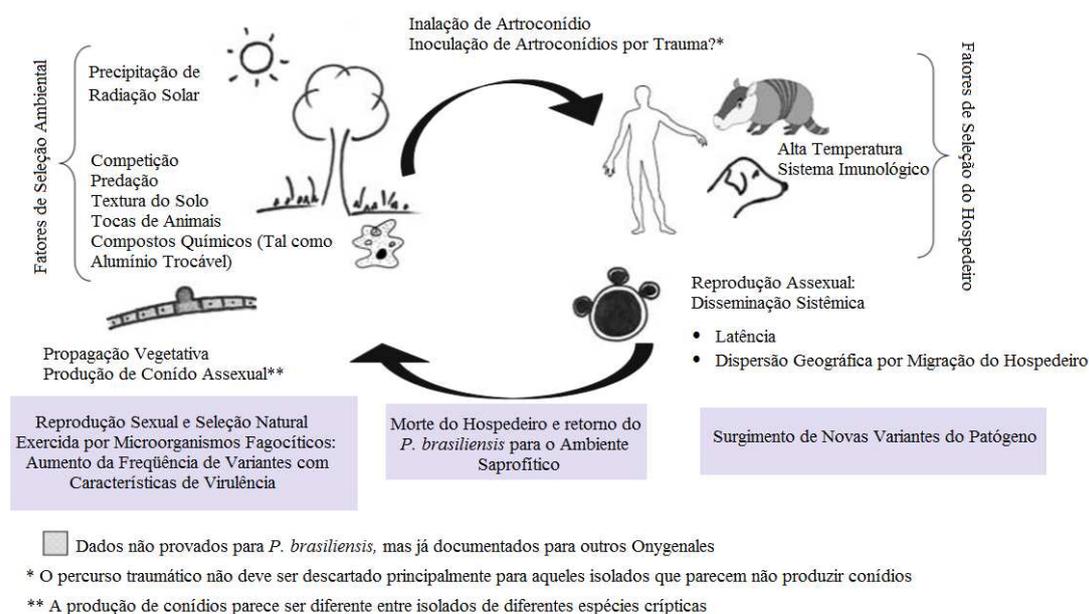


**Figura 1: Representação esquemática dos componentes da parede celular da levedura de *Paracoccidioides sp.* Figura com adaptações retirada de Puccia *et al.*, 2011.**

Em relação ao habitat do gênero *Paracoccidioides* na fase infectante, este é dependente de características climáticas, tais como de temperatura e umidade, além da competição com outros microorganismos (Bagagli *et al.*, 2008). Porém, tem sido observado que o fungo apresenta um bom crescimento em áreas de alta umidade, tanto em solo arenoso quanto argiloso, sendo a disponibilidade de água um fator limitante para o desenvolvimento da fase micelial (Bagagli *et al.*, 2008). Na fase parasitária, dependendo da tolerância do fungo, este pode se adaptar a diversas condições no hospedeiro, tais como aumento de temperatura, influências hormonais e resposta do sistema imunológico (Bagagli *et al.*, 2008), evidenciando a alta capacidade de adaptação do fungo.

A PCM é endêmica em populações que vivem em área rural e acomete principalmente trabalhadores com atividades agrícolas, por manipulação do solo quando inalam aerossóis com propágulos infectantes (Franco *et al.*, 2000, Bocca *et al.*, 2013). Estes se instalam nos alvéolos pulmonares e assim, dão origem às células de leveduras (Bagagli *et al.*, 2013). Tem sido observada grande predominância em pacientes adultos

do sexo masculino na faixa etária produtiva (30-60 anos), e igualdade de ocorrência entre os sexos antes da puberdade. (Yasuda *et al.*, 2006, Bocca *et al.*, 2013, Wanke *et al.*, 2009). Isso provavelmente se deve ao fato de o estrógeno do hospedeiro inibir a transformação do micélio ou conídio para levedura ou pelo fato de que neste tipo de atividade os homens serem mais expostos que as mulheres (Shankar *et al.*, 2011, Bocca *et al.*, 2013). Não tem sido observada a transmissão da micose entre pessoas (dos Santos *et al.*, 2003, Bocca *et al.*, 2013). Após a inalação dos propágulos infectantes, vários fatores estão envolvidos na evolução da micose sistêmica, tais como: quantidade de inóculo, patogenicidade e virulência do fungo, integridade do sistema imunológico do hospedeiro e possíveis fatores genéticos. (Wanke *et al.*, 2009). Uma vez instalados na via aérea inferior, pode haver disseminação para outros órgãos. O controle da infecção depende da resposta do sistema imunológico. Em indivíduos que apresentam boa condição imunológica ocorre a resolução do processo infeccioso sem necessidade de intervenção e assim a infecção é contida. O fungo pode permanecer por anos em estado de latência, em granulomas, porém, continuam viáveis. Algum tempo depois, a infecção pode progredir para a forma crônica ou até mesmo para a forma aguda/subaguda da infância e adolescência, neste caso menos freqüente nesta fase (Wanke *et al.*, 2009). Abaixo está demonstrado o ciclo biológico hipotético do gênero *Paracoccidioides* (Figura 2).



**Figura 2: Ciclo biológico hipotético do gênero *Paracoccidioides*.** Figura com adaptações de Bagagli *et al.*, 2008.

Com a finalidade de auxiliar no entendimento das diversas formas do curso da infecção, foi elaborada pelo Consenso Brasileiro de Paracoccidioomicose (2006) segundo o Colóquio Internacional de Paracoccidioomicose (1986, Mendellín, Colômbia), a classificação relacionada às formas clínicas e à história natural da PCM (Yasuda *et al.*, 2006, Wanke *et al.*, 2009):

Paracoccidioomicose infecção

Paracoccidioomicose doença

Forma aguda/subaguda

Forma crônica

Unifocal

Multifocal

Forma residual ou sequelar

**Paracoccidioomicose infecção:** Indivíduo infectado pelo fungo, mas não apresenta manifestações clínicas.

**Paracoccidioomicose doença:** Há manifestações clínicas em um ou mais órgãos e depende das lesões em atividade ou suas seqüelas.

**Forma aguda/subaguda:** considerada como sendo do tipo juvenil, é predominante em crianças e adolescentes, mas pode ocorrer em adultos com até 35 anos de idade. É caracterizada por uma rápida evolução com manifestações clínicas entre 4 a 12 semanas após a infecção. A forma aguda/subaguda é responsável por 3 a 5% dos casos da doença. Segue por ordem de frequência as principais manifestações clínicas desta doença: linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular, e lesões cutâneas.

**Forma crônica:** Predominante no sexo masculino na faixa etária de 30-60 anos, esta fase da doença corresponde a mais de 90% dos casos. Inversamente ao tempo observado na fase aguda/subaguda para manifestação dos sintomas clínicos, esta apresenta uma progressão lenta e silenciosa, podendo levar anos para ser diagnosticada. Foi observada manifestação pulmonar em 90% dos casos, podendo ser o único órgão afetado em até 25% dos casos. Nesta forma da doença, devido ao tratamento, as sequelas são caracterizadas pela manifestação cicatricial (Yasuda *et al.*, 2006).

**Unifocal:** Micoze restrita somente a um órgão.

**Multifocal:** Envolve mais de um órgão simultaneamente, sendo os pulmões, mucosas e pele os locais mais acometidos.

A incidência anual da PCM no Brasil é de 10-30 casos de infecção por milhão de habitantes. (Coutinho *et al.*, 2002, Teixeira *et al.*, 2014) . Embora não seja uma doença de notificação obrigatória, admite-se que 10 milhões de pessoas que vivem em regiões endêmicas já entraram em contato com o fungo (San-Blas *et al.*, 2002). Em alguns estados do Brasil, tais como Paraná, Rondônia e Mato Grosso do Sul, já acontecem notificação à SES, e na ocasião, ocorre à elaboração de uma ficha de investigação. No Brasil, a PCM tem-se constituído em um grande problema de saúde pública, uma vez que tem se destacado como a oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva, entre as infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas (Coutinho *et al.*, 2002, Bocca *et al.*, 2013). As maiores concentrações de casos reportados estão na região Sul, Sudeste e Centro-oeste (Figura 3).

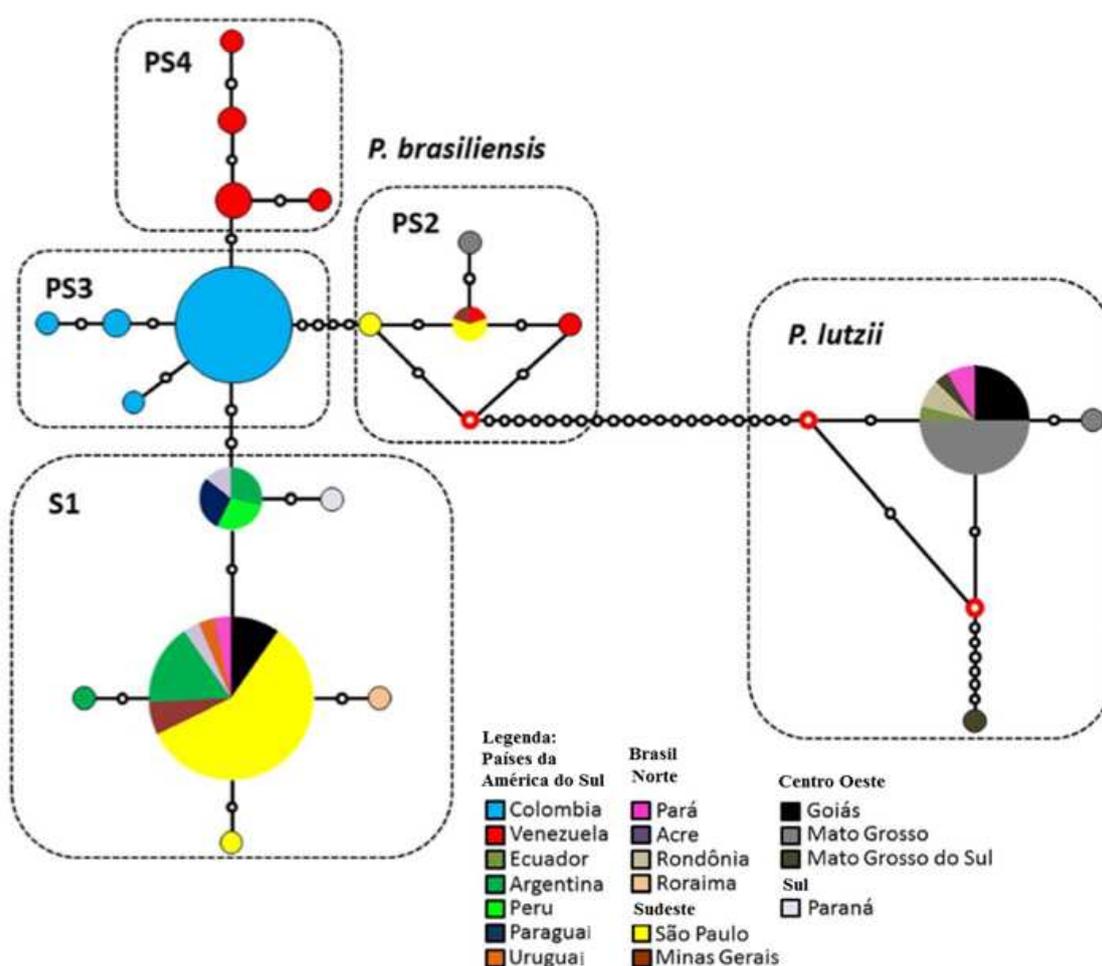


Figura 3: Mapa de distribuição geográfica do gênero *Paracoccidioides*. Figura retirada de Teixeira *et al.*, 2014 com adaptações

### 1.3 Antifúngicos

Devido à problemática atual em relação aos fármacos disponíveis, tais como resistência dos patógenos, toxicidade e interação medicamentosa, entre outros, há a necessidade de busca por novos antifúngicos mais específicos que ofereçam o mínimo possível de efeitos adversos (Baddley & Moser, 2004, da Matta *et al.*, 2007, Mikulska *et al.*, 2011, Cantón *et al.*, 2011, Wills *et al.*, 2000; Kontoyiannis & Lewis, 2002, Moreau *et al.*, 2002, Kuroyanagi *et al.*, 2010). Atualmente existem apenas quatro grupos de agentes antifúngicos disponíveis para tratamento de micoses sistêmicas: os Polienos (anfotericina B), Fluoropirimidinas (flucitosina), Azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol) e Equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina), os quais possuem distintos mecanismos de ação (**Figura 4**). É importante destacar que além das poucas opções terapêuticas, vem sendo observado há algum tempo o surgimento de resistência aos agentes antifúngicos como anfotericina B e derivados azólicos (Baddley & Moser, 2004; da Matta *et al.*, 2007, Mikulska *et al.*, 2011), com por exemplo, para o fluconazol foi encontrada uma taxa de resistência na ordem de 10% em isolados clínicos de *Candida spp.* não albicans, obtidos em hospitais europeus (Tortorano *et al.*, 2006; da Matta *et al.*, 2007). Os dados demonstrados pela literatura apontam para um grave problema nos dias atuais (Cantón *et al.*, 2011). Em virtude da resistência adquirida pelos agentes patogênicos bem como os diversos efeitos adversos causados pelos medicamentos, especialmente pela nefrotoxicidade como é o caso da Anfotericina B, alguns medicamentos com baixo espectro antifúngico, e outros por ampla interação medicamentosa, faz-se deste cenário, situação de grande preocupação, tornando necessária a busca por novos compostos para o desenvolvimento de novos antifúngicos, que ofereçam um tratamento seguro e eficaz contra as micoses sistêmicas.

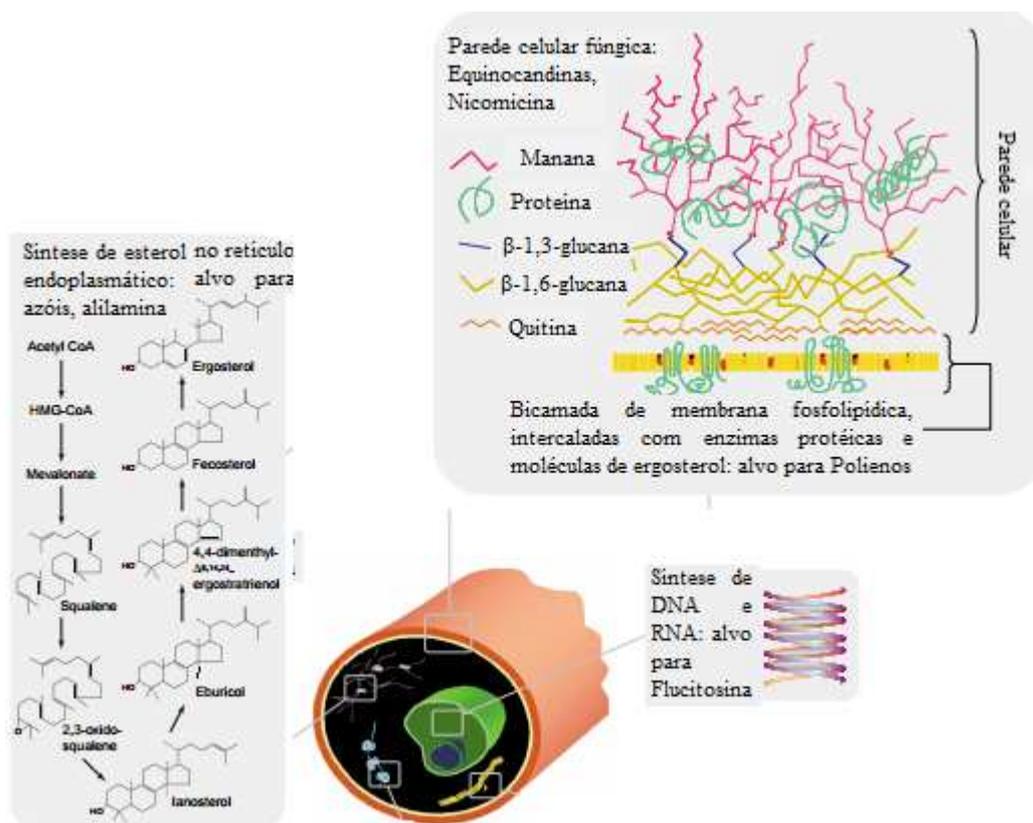


Figura 4: Esquema do mecanismo de ação dos grupos de antifúngicos atuais. Figura com adaptações retirado de Odd *et al.*, 2006.

#### 1.4 Genômica Comparativa

Genômica comparativa é uma ferramenta de estudo biológico que permite analisar semelhanças e divergências, entre genomas de diversos organismos, a partir de sequências já depositadas em banco de dados. Tem auxiliado na identificação de genes-alvos, sendo esta facilitada pela disponibilidade de sequências completas de diferentes patógenos. Através do estudo comparativo é possível identificar genes relevantes homólogos, potencialmente envolvidos na sobrevivência do patógeno e, experimentalmente demonstrar a sua função letal ou de sobrevivência nos hospedeiros, contribuindo assim com informações para o desenvolvimento de novos antifúngicos (Saidani *et al.*, 2009, Rispail *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de novas drogas, é um trabalho que demanda muitos anos, apresenta altos riscos. Com a finalidade de redução do tempo de busca de novas moléculas, tem sido usada a técnica de avaliação *in silico*. Embora haja custos, é

possível reduzir o tempo de pesquisa na fase inicial da busca por novos *hits*. A associação destas ferramentas fornece suporte para a busca de novos genes que podem ser alvos para drogas (White & Kell, 2004, Kumar *et al.*, 2007, Caffrey *et al.*, 2009).

A partir da combinação das ferramentas, tais como: a disponibilidade do genoma de patógenos, ferramentas de busca de novas moléculas inibidoras e genômica comparativa, Abadio e cols. (2011) investigaram no genoma de *P. lutzii* e mais oito fungos patógenos humanos de relevância mundial (*A. fumigatus*, *B. dermatitidis* ER3, *C. albicans* WO1, *C. immitis* H538.4, *C. gatii*, *H. capsulatum* NAm1, *P. brasiliensis* (Pb3) e *P. brasiliensis* (Pb18)), a presença de genes que pudessem ser essenciais ou que estivessem relacionados com a viabilidade celular desses patógenos, devendo ser ausentes no genoma humano. Foi usado como ponto de partida os estudos de Roemer e cols. (2003) e Hu e cols. (2007), nos quais foram descritos 55 genes considerados essenciais apresentando amplo espectro de funções. Além dos 55 genes já citados, outros dois genes considerados não essenciais (*kre2* e *erg6*), porém descritos como potenciais alvos para drogas por serem relevantes para a sobrevivência do patógeno no hospedeiro (Felipe *et al.*, 2005) também foram utilizados na busca por ortólogos em *P. lutzii*.

Para seguir adiante com as análises, foram levados em consideração, alguns critérios. Dentre eles, estão:

Ser um gene essencial ou de relevância para a sobrevivência do fungo;

Presença do gene na maioria dos fungos, para que a droga tenha um amplo espectro de ação;

Estar ausente no genoma humano, objetivando ausência e/ou redução de efeitos colaterais;

Não ser auxotrófico.

Baseados nestes critérios, Abadio e cols. (2011) identificaram 10 genes ortólogos presentes em fungos patogênicos humano de relevância mundial e ausentes no genoma humano. Destes, foram selecionados quatro genes candidatos a alvo molecular de drogas para estudos, entre eles um gene não essencial, porém, importante para a sobrevivência do fungo no interior do hospedeiro o gene *kre2* (**Tabela 1**). Este gene está presente no genoma dos fungos citados e ausente no genoma humano. A **Figura 5** mostra o alinhamento da sequência de resíduos de aminoácidos revelando os domínios conservados da proteína em todos os fungos relevantes analisados.

**Tabela 1. Genes alvo-potenciais selecionados para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.**

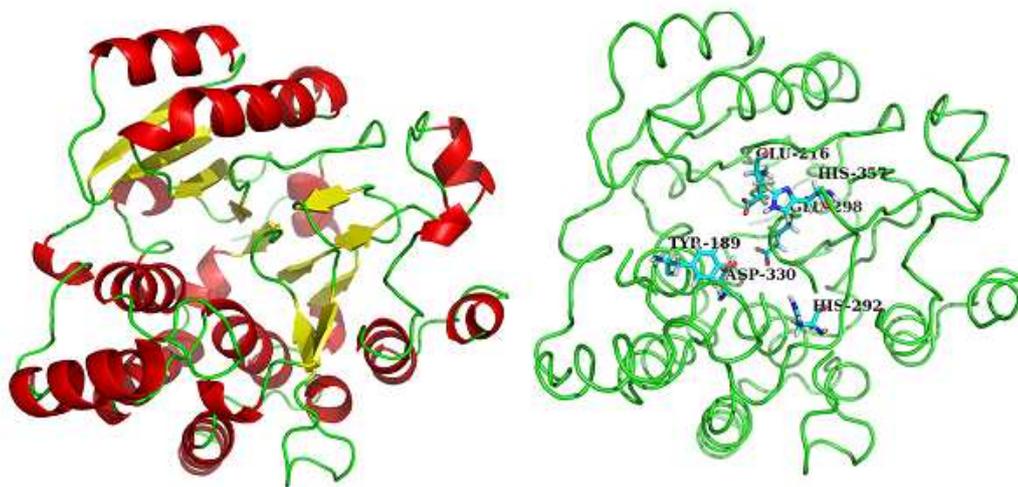
Gene	Processo Biológico	Citocalização	Molde PDB	Organismo	E-value	Identidade de Sequência PDB %
<i>trr1</i>	Manutenção do estado redox da célula	Citoplasma	3ITJ	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	3e-115	65
<i>aur1</i>	Metabolismo celular	Golgi e membrana	1VDC	<i>Arabidopsis thaliana</i> *	1e-94 *	57 *
<i>mak5</i>	Biossíntese de ribossomo	Nucléolo	1HVS	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	7e-42	30
<i>chs1</i>	Biossíntese/degradação da parede celular	Membrana	*	*	*	*
<i>tom40</i>	Transporte de proteínas	Membrana da Mitocôndria	2QK9	<i>Homo sapiens</i>	0,8	34
<i>kre6</i>	Biossíntese/degradação da parede celular	Aparato do Golgi Membrana	2VY0	<i>Pyrococcus</i>	6e-4	32
<i>fts1</i>	Biossíntese/organização da parede celular	Membrana	1R1M	<i>Neisseria meningitidis</i>	0,3	32
<i>kre2</i>	Manosilação de proteínas	Membrana do Golgi	1S4N	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	6e-96	50
<i>erg6</i>	Biossíntese de ergosterol	Membrana do retículo endoplasmático	3BUS	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	5e-18	32
<i>rim8</i>	Regulador da resposta ao pH	Citoplasma	3GL3	<i>Bacteroides fragilis</i>	3,9	38

Fonte: Abadio *et al.* 2011. \* Estrutura ausente no PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)



*al.*, 2012). Visando diminuição dos custos e do tempo envolvido, a modelagem molecular por homologia, tem se tornado uma aliada, e pode ser aplicada na busca de novos compostos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Abadio e cols. (2011) usaram como ferramenta a técnica de modelagem molecular. Para obtenção de uma estrutura tridimensional de uma proteína, deve-se levar em consideração as dificuldades, desde a obtenção da proteína, até as técnicas sofisticadas de alta resolução tais como raio-X e ressonância magnética nuclear (RMN) (Barreiro & Rodrigues, 1997). A disponibilidade da proteína purificada para se proceder a obtenção de cristais para a resolução da sua estrutura tridimensional (3-D) bem como as dificuldades técnicas inerentes ao processo de cristalização e resolução da estrutura limitam em muito os trabalhos de biologia estrutural e seu uso na busca de moléculas inibidoras de proteínas-alvo. Neste contexto, pode-se lançar mão de estruturas homólogas nos bancos de dados (se existentes) para se proceder os experimentos *in silico* de modelagem molecular. Abadio e cols. (2011) obtiveram um modelo teórico para a proteína KRE2 de *P. lutzi*, a qual não possui estrutura tridimensional resolvida (**Figura 6**) tendo como base a proteína homóloga Kre2p/Mnt1p de *S. cerevisiae* (**Tabela 1**) determinada experimentalmente e depositadas no banco de dados de estrutura de proteínas – Protein Data Bank (PDB – <http://www.pdb.org>).

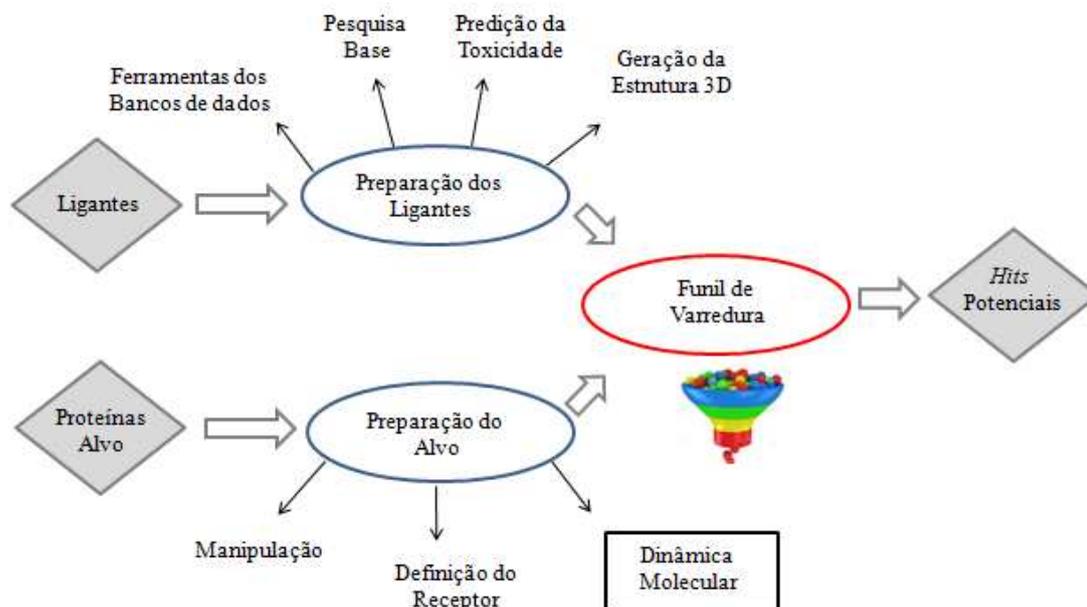


**FIGURA 6:** Estrutura tridimensional predita da proteína KRE2 de *P. lutzii* (Pb01) obtida por modelagem molecular por homologia. As  $\alpha$ -hélices estão representadas pela cor vermelha, as folhas  $\beta$  pela cor amarela e os *loops* pela cor verde. Os aminoácidos envolvidos nos sítios catalíticos da proteína estão destacados na figura B (Abadio e cols. 2011).

## 1.6 Varredura virtual de quimiotecas na busca de novos antifúngicos

Os avanços nas técnicas computacionais e *hardware* tem possibilitado o desenvolvimento de métodos *in silico* que podem acelerar a identificação e otimização de possíveis novas drogas. A principal vantagem dos estudos *in silico* é que eles permitem a rápida varredura de grandes bibliotecas de pequenas moléculas (*small molecules*), para identificar as de melhores *hits*, que podem ser sintetizadas, e avaliadas experimentalmente (**Figura 7**). Essas bibliotecas geralmente contêm grande número de compostos com características físico-químicas muito semelhantes e com propriedades *drug-like* (Kairys *et al.*, 2006).

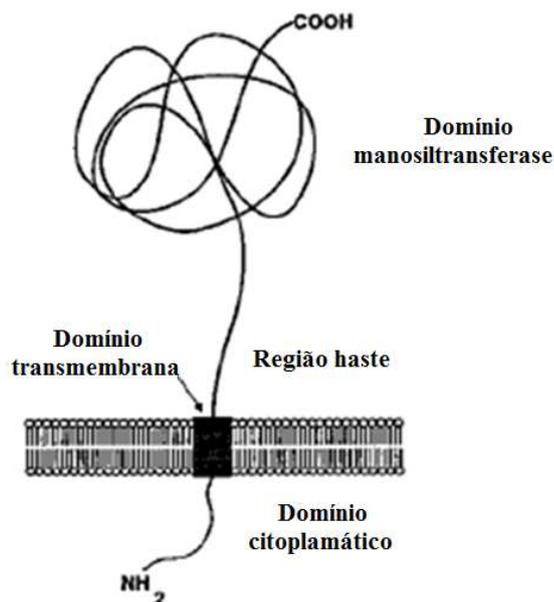
A abordagem de varredura virtual de quimiotecas para compostos ativos que possam interagir com a proteína-alvo, tem-se tornado uma ferramenta muito útil e despertado o interesse no desenvolvimento de novas drogas, considerando a velocidade e custo envolvidos (Shoichet, 2004, Stahura & Bajorath, 2004, Werner *et al.*, 2012). Devido à melhoria das ferramentas de busca, Abadio e cols. (2011) utilizaram técnicas de modelagem molecular e varredura virtual de diversos compostos, partiu de 75.000 moléculas do banco da *Life Chemicals* e após processo de filtração obteve-se 3.000 moléculas. Esta análise resultou na identificação de 17 compostos de baixa massa molecular (*small molecules*), que potencialmente inibem a enzima alfa 1,2-manosiltransferase (KRE2) de *P. lutzii*. Estes compostos são candidatos a novos antifúngicos, pois podem bloquear a atividade desta enzima, importante para viabilidade dos fungos. Os resultados dos testes *in vitro* utilizando estas moléculas contra fungos patogênicos humanos têm sido promissores (Abadio *et al.*, dados não publicados). Dentre os 17 compostos de baixa massa molecular identificados e testados *in vitro*, o composto denominado de Molécula 3 (nome oficial sob sigilo de patente) foi a que apresentou a melhor atividade antifúngica.



**Figura 7: Estratégia de varredura virtual para a busca de novos hits.** Figura com adaptações retirado de Beutraït *et al.*, (2008).

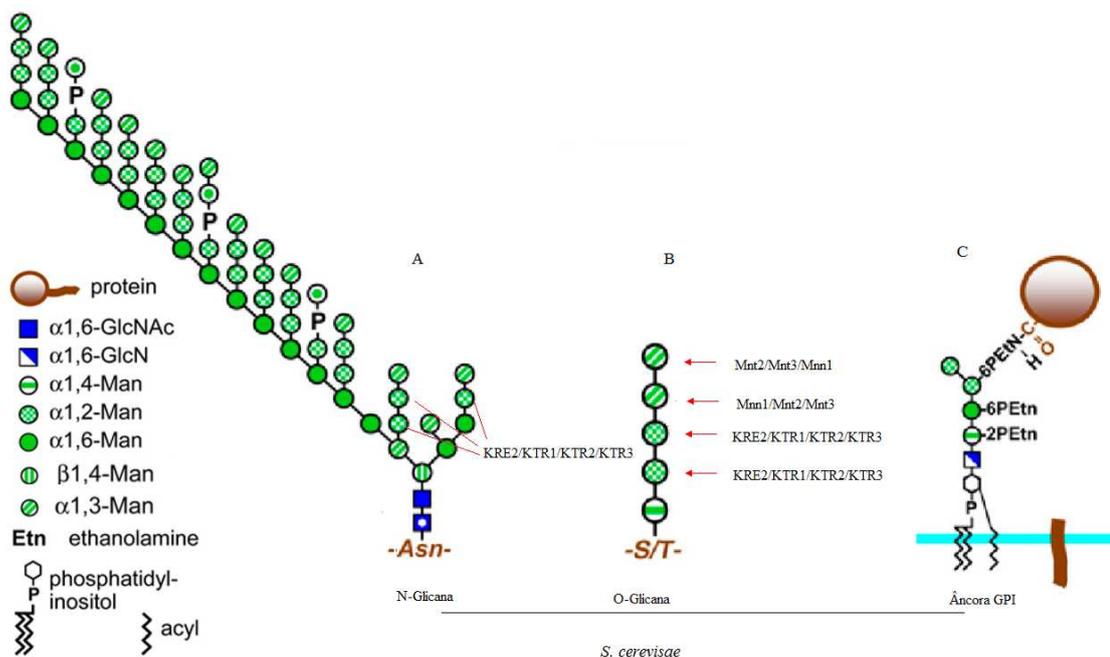
## 1.7 A proteína KRE2

O gene *kre2* ou *mnt1* é altamente conservado em fungos patogênicos e codifica uma proteína de aproximadamente 49 kDa, a  $\alpha$  - 1,2 manosiltransferase. Localizada no complexo de Golgi, pertence a uma classe de enzimas que atuam na adição de resíduos de manose em proteínas que se localizarão na parede celular do fungo. As proteínas pertencentes à família KRE2/MNT1 apresentam um domínio citoplasmático N-terminal, uma pequena porção transmembrana hidrofóbica e o sítio ativo C-terminal voltado para o lúmen do complexo de Golgi, sendo responsável pela glicosilação de proteínas da parede celular do fungo. (Lussier *et al.*, 1995, Lussier *et al.*, 1999, Thomson *et al.*, 2000) (**Figura 8**).

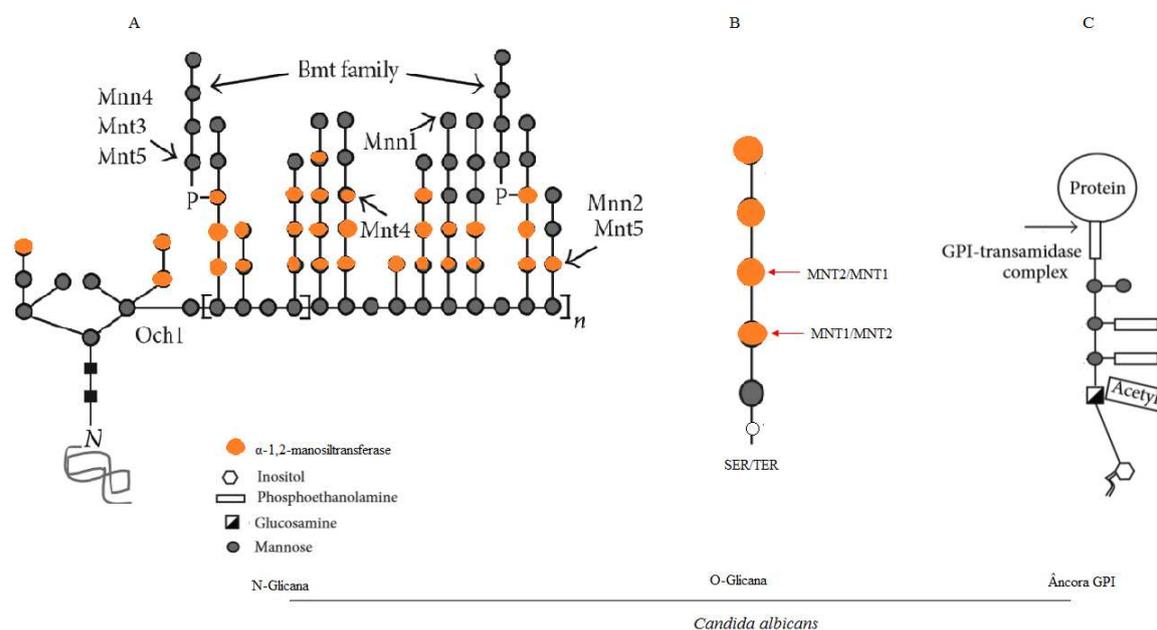


**Figura 8: Representação esquemática de proteínas da família KRE2/MNT1.** Está evidenciado as regiões dos três domínios da proteína. Domínio citoplasmático, transmembrana e manosiltransferase. O domínio catalítico é ligado ao domínio transmembrana pela região haste. Figura com adaptações de Lussier *et.al.*, 1996.

O processo de glicosilação é responsável pela adição de resíduos de manose às cadeias polipeptídicas nas posições O- e N-, em especial dos resíduos de aminoácidos serina, treonina e asparagina respectivamente. Este processo é catalisado pela ação das manosiltransferases da família Kre2/Mnt1. Em fungos, este processo ocorre no retículo endoplasmático e Complexo de Golgi (Lussier *et al.*, 1999, Levitz & Specht, 2006). Existem três tipos de glicosilação. Além das rotas de O- e N-glicanos que são mais estudadas, há uma terceira via denominada de âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI). As N-glicanas são estruturas complexas e são iniciadas no retículo endoplasmático e ocorrem no nitrogênio da amida nas cadeias laterais de asparagina. As O-glicanas são cadeias laterais que ocorrem no grupamento hidroxila de serina/treonina, iniciadas no retículo endoplasmático (**Figuras 9 e 10**). Este processo tem continuidade após as proteínas serem transportadas para o aparato de Golgi (Herscovics y Orlean, 1999). As figuras 8 e 9 mostram esquematicamente as etapas do processo de glicosilação em *S. cerevisiae* (**Figura 9**) e em *C. albicans* (**Figura 10**).



**Figura 9: Representação esquemática das formas de glicosilação em *Saccharomyces cerevisiae*.** KRE2/MNT1 codifica  $\alpha$ -1,2-manosiltransferase que é responsável pela adição de resíduos de manose às cadeias peptídicas nas posições O- e N-glicano. A) N-glicosilação B) O-glicosilação C) Âncora GPI. Fonte: Orlean P. 2012; Días-Jimenez *et al.*, 2012 com modificações



**Figura 10: Representação esquemática das formas de glicosilação em *Candida albicans*.** KRE2/MNT1 é responsável pela adição de resíduos de manose às cadeias peptídicas na posição de O-glicano. A) N-glicosilação B) O-glicosilação C) Âncora GPI. Fonte: Martínez-Duncker *et al.*, 2014; Días-Jimenez *et al.*, 2012 com modificações.

O gene *kre2* codifica para uma proteína importante para viabilidade celular e virulência do patógeno no interior do hospedeiro. A sua ausência ou defeito, pode ocasionar dobramento errado da proteína a ser glicosilada, instabilidade e redução da sua atividade biológica, acarretando em efeitos deletérios para a sobrevivência do agente patogênico (Wagener *et al.*, 2008, Thomson *et al.*, 2000). Esta enzima pertence a uma família de 15 glicosiltransferases, sendo conhecidas nove proteínas em *S. cerevisiae* (Ktr2, Ktr3, Ktr4, Ktr5, Ktr6, Ktr7, e Yur1) (Lussier *et al.*, 1999), e cinco em *Candida albicans* (Mnt1, Mnt2, Mnt3, Ktr2, e Ktr4) (Thomson *et al.*, 2000). Em *S. cerevisiae* está envolvida na biossíntese de glicoproteínas da parede celular, e em outros fungos, está ligada a virulência como é o caso de *Candida albicans*, não possuindo genes homólogos em humanos ou eucariotos superiores (Lobsanov *et al.*, 2004). Estes genes, dependendo do organismo, podem ter uma diferenciação quanto as suas funções como, por exemplo, em *S. cerevisiae* onde *Kre2*, *Ktr1* e *Ktr3* tem como função, adição do segundo e terceiro resíduos de manose, em *Candida albicans*, *Mnt1* adiciona o segundo resíduo de manose, ambos em proteínas manosiladas de parede celular (Häusler *et al.*, 1992, Romero *et al.*, 1997, Buurman *et al.*, 1998). Recentemente, foi isolada e caracterizada bioquimicamente e funcionalmente a  $\alpha$ -1,2 manosiltransferase de *Sporothrix schenckii* (Hernández *et al.*, 2012), confirmando sua presença e atividade nesse organismo patogênico humano.

Em estudos anteriores foi demonstrado que as manoproteínas da parede celular de *C. albicans* são necessárias para sua adesão e conseqüentemente sua virulência no hospedeiro (Thomson *et al.*, 2000). Em *A. fumigatus* foi demonstrado que defeitos nestas vias induzem diversas alterações, como alteração na espessura da parede celular das hifas e no crescimento, e redução na esporulação decorrente do rompimento da parede celular, bem como a redução do padrão de reconhecimento do sistema imunológico (Wagener *et al.*, 2008).

Considerando a importância desta proteína em processos tais como, aderência e desenvolvimento do patógeno no interior do hospedeiro, torna-se relevante um estudo mais aprofundado do seu papel na patogenicidade bem como um potencial alvo-molecular para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas. A inativação da sua função poderá controlar e ou mesmo inibir o crescimento e conseqüentemente a infecção pelo *P. lutzii*. Uma vez que não há estruturas 3D resolvidas experimentalmente, faz-se necessário a utilização de recursos computacionais para prever teoricamente essas estruturas. Desta forma, por modelagem molecular foi

possível prever a estrutura tridimensional teórica da proteína KRE2 de *P. lutzii* (Pb01) (Figura 6).

### 1.8 Sistema de expressão em *Escherichia coli*

A expressão em bactéria tem a vantagem de produzir proteínas recombinantes na forma de corpos de inclusão, os quais são facilmente separados do restante das proteínas celulares e podem proteger a proteína recombinante das proteases bacterianas, embora isto dificulte a solubilização da proteína recombinante em sua renaturação, ou seja, um processo que garante a manutenção da atividade biológica da proteína de interesse. Dentre os vários sistemas de expressão disponíveis para a produção de proteínas heterólogas, a bactéria *E. coli* é um dos mais utilizados. Isto se deve à sua capacidade de crescer rapidamente, em altas concentrações celulares e em substratos baratos, além de sua genética ser bem conhecida e haver disponibilidade de muitos vetores e cepas mutantes (Baneyx, 1999).

Um dos vetores mais utilizados é da série pET, como por exemplo o plasmídeo pET-21a (Figura 11), por ser um sistema altamente controlável de expressão da proteína-alvo. O controle da expressão nesse plasmídeo é realizado em nível transcricional pelo promotor T7-lac. O genoma de *E. coli* BL21DE3 possui o gene que codifica para a T7 RNA polimerase sob controle do promotor lacUV5. Além desse gene, o genoma possui o gene lacI, que codifica para o repressor lac, o qual se liga ao promotor lac, impedindo assim que a T7 RNA polimerase seja produzida em ausência de IPTG. O gene lacI também está presente no vetor pET. Sob condições de repressão (ausência de indutor IPTG), tanto o gene T7 RNA polimerase quanto o gene alvo estão transcionalmente bloqueados por causa da ligação do repressor lacI na região operadora. Após a adição do indutor IPTG, a repressão é eliminada.

A presença dos plasmídeos pLysS e pLysE na linhagem de *E. coli* BL21 DE3 promove maior controle na produção da proteína recombinante. Estes plasmídeos não são vetores de clonagem, mas são utilizados em cepas de *E. coli*  $\lambda$ DE3 para suprimir a expressão basal da T7 RNA polimerase, através da produção de lisozima T7, um inibidor natural da T7 RNA polimerase. Estes plasmídeos são importantes se a proteína recombinante for tóxica para as células de *E. coli*. A presença de lisozima T7 aumenta a tolerância da bactéria à toxicidade. Os dois plasmídeos diferem apenas pela orientação

do gene de lisozima T7. Em pLysS a sequência de codificação da lisozima T7 está na orientação anti-senso relativamente ao promotor *tet*, portanto, apenas uma pequena quantidade de lisozima T7 é produzida. Em pLysE grandes quantidades da lisozima T7 são produzidos a partir do promotor de *tet* (Moffatt & Studier, 1987).

## 1.9 Sistema de expressão em *Pichia pastoris*

*Pichia pastoris* é uma levedura unicelular, capaz de realizar modificações pós-traducionais tais como processamento proteolítico, dobramentos, formação de pontes dissulfeto, glicosilação e manosilação, entre outros (Higgins *et al.*, 1995). É um microrganismo de fácil manipulação em meio de cultura (Romanos *et al.*, 1995). É uma levedura metilotrófica, ou seja, capaz de metabolizar o metanol como única fonte de carbono e energia (Romanos *et al.*, 1995). A primeira etapa dessa via é a oxidação de metanol a formaldeído pela enzima álcool oxidase (AOX). Existem dois genes que codificam para AOX – AOX 1 e AOX 2. O AOX 1 é responsável pela maioria das atividades da AOX na célula. O promotor AOX1 é um promotor forte e altamente regulado a nível transcricional. Ele se encontra reprimido em meio contendo glicose e é induzido em meio contendo somente metanol como fonte de carbono. (CEREGHINO *et al.*, 2002). O promotor AOX1 foi o primeiro a ser desenvolvido para expressão em *P. pastoris* e até hoje é um dos mais utilizados. Os vetores pPIC9 e pPICZ $\alpha$ A utilizam este promotor para expressarem as proteínas de interesse em *P. pastoris* (**Figuras 12 e 13**).

O sistema de expressão em *P. pastoris* é capaz de produzir altos níveis de proteínas, que podem ser expressas em ambiente intracelular ou secretadas para o meio de cultura. A secreção destas proteínas para o meio de cultura pode ser um mecanismo indispensável para o correto dobramento das cadeias polipeptídicas, além de ser vantajosa, por facilitar o processo de purificação (Romanos *et al.*, 1992). A detecção da expressão da proteína, facilita a utilização de vários parâmetros de otimização e produção heteróloga neste microrganismo (Cereghino *et al.*, 2000).

## 2 JUSTIFICATIVA

O aumento de infecções causadas por fungos em indivíduos imunodeprimidos, as taxas crescentes de resistência aos antifúngicos e as opções restritas de medicamentos (McNeil *et al.*, 2001), são um alerta para necessidade de desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.

Em trabalhos anteriores, nosso grupo identificou genes ortólogos com potencial de serem investigados como alvos moleculares promissores para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas, presentes em fungos patogênicos humanos de relevância mundial (*Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitides*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* e o gênero *Paracoccidioides sp.*) e ausentes no genoma humano. Esta análise apontou dez genes, entre os quais foram selecionados, preliminarmente, quatro genes candidatos a alvo de drogas (*trr1*, *kre2*, *erg6* e *rim8*).

A utilização de métodos *in silico* de modelagem molecular e *screening* virtual, permitiu a identificação de 17 compostos de baixa massa molecular (*small molecules*), que tem potencialmente capacidade de inibir a enzima  $\alpha$  - 1,2- manosiltransferase (KRE2) de *P. lutzii*. enzima importante para a viabilidade celular e virulência dos fungos no interior do hospedeiro. Das 17 moléculas, 04 apresentaram capacidade de inibir o crescimento do fungo *P. lutzii in vitro*, sendo a molécula 3 a melhor delas, o que mostrou a necessidade de avaliar se de fato esta molécula é capaz de inibir especificamente o alvo molecular KRE2 deste patógeno. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo principal produzir heterologamente e purificar a proteína KRE2 para demonstrar a capacidade inibitória específica da molécula 3 sobre este alvo e, conseqüentemente seguir para o potencial desenvolvimento de uma nova droga antifúngica para este patógeno.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Determinar se a molécula 3 inibe especificamente a atividade enzimática de KRE2 de *P. lutzii*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- 1) Produzir KRE2 recombinante purificada.
- 2) Otimizar os ensaios enzimáticos com a proteína recombinante.
- 3) Testar a inibição da atividade enzimática da proteína recombinante pela molécula 3.

## 4 MATERIAIS

### 4.1 Microorganismos

#### 4.1.1 Bactérias

**Tabela 2: Linhagens de *E. coli* para expressão da proteína recombinante KRE2**

Linhagem	Genótipo
DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80lacZ.M15.(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-,mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\lambda$ -
BL21(DE3)pLysE	B F – ompT hsdSB (rB – mB –) gal dcm (DE3) pLysE(Cm <sup>r</sup> )

Fonte: Elaborada pela autora

#### 4.1.2 Fungos:

**Tabela 3: Linhagens de *P. pastoris* para expressão da proteína recombinante KRE2**

Linhagem	Genótipo
GS115	his4
X-33	Wild type

Fonte: Elaborada pela autora

### 4.2 Meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados com água destilada e autoclavados a 120°C por 20 minutos. Reagentes termosensíveis foram esterilizados por filtração utilizando membranas de 0,22 $\mu$ m.

#### 4.2.1 Meio para cultivo de bactérias

**Meio Luria-Bertani (LB caldo) pH 7,2:** Peptona de Caseína 1%; Extrato de Levedura 0,5%; Cloreto de Sódio 1%; H<sub>2</sub>O d q.s.p.

**Meio LB Ágar:** Meio LB acrescido de ágar Bacteriológico 1,5%

Ampicilina: Adicionado ao meio LB caldo e/ou LB ágar quando foi necessário em concentração final de 100  $\mu$ g/mL.

Cloranfênicol: Adicionado ao meio LB caldo e/ou LB ágar quando foi necessário em concentração final de 20  $\mu$ g/mL.

**Meio 4YT pH 7,2:** Peptona de Caseína 32% (p/v); Extrato de Levedura 2% (p/v); Cloreto de Sódio 0,5% (p/v).

**Meio TB:** Peptona de Caseína 1,2% (p/v); Extrato de Levedura 2,4% (p/v); Glicerol 0,4% (p/v).

#### 4.2.2 Meio para cultivo de leveduras

**YPD pH7,2:** Extrato de levedura 1% (p/v), Peptona de Caseína 2% (p/v), Glicose 2% (p/v)

**YPD ágar:** acrescido de ágar bacteriológico a 1,5%

**Meio com Glicose (MD):** YNB 1,34% (p/v), Biotina  $4 \times 10^{-5}$ % (p/v), Glicose 2% (p/v)

**Meio MD ágar:** acrescido de ágar bacteriológico a 1,5%

**Meio com Metanol (MM):** YNB 1,34% (p/v), Biotina  $4 \times 10^{-5}$ % (p/v), Metanol 2% (p/v)

**Meio MM ágar:** acrescido de ágar bacteriológico a 1,5%

**Meio Complexo Tamponado com Glicerol (BMGY):** Extrato de Levedura 1% (p/v), Peptona de Caseína 2% (p/v), Tampão Fosfato de Potássio pH 6,0 100 mM, YNB 1,34% (p/v), Biotina  $4 \times 10^{-5}$ % (p/v), Glicerol 1% (v/v)

**Meio Complexo Tamponado com Metanol (BMMY):** Extrato de Levedura 1% (p/v), Peptona de Caseína 2% (p/v), Tampão Fosfato de Potássio pH 6,0 100 mM, YNB 1,34% (p/v), Biotina  $4 \times 10^{-5}$ % (p/v), Metanol 0,5% (v/v)

**Meio Sabouraud caldo:** Meio Sabouraud 30g/L;

**Meio Sabouraud ágar:** Meio Sabouraud caldo acrescido de ágar Bacteriológico 1,5% (p/v)

**Meio RPMI 1640:** Envelope RPMI (glutamina e vermelho de fênol sem bicarbonato - GIBCO), MOPs 34,53g/L.

#### 4.3 Soluções

As soluções foram preparadas com água destilada e quando necessário autoclavadas a  $120^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos ou filtradas em membranas com poros de  $0,22\mu\text{m}$ .

#### 4.3.1 Soluções para extração de DNA plasmidial

**Tampão TE:** Tris-HCl pH 8,0 10 mM ; EDTA pH 8,0 1,0 mM;

**Solução II:** Hidróxido de sódio 200 mM; SDS 1% (p/v)

**Solução III:** Acetato de sódio ou de potássio 5M, pH 4,8

#### 4.3.2 Soluções para eletroforese de DNA em gel de agarose

**Tampão de corrida Tris-EDTA-Borato (TEB)0,5 X:** Trizma base 45 mM;  
Ácido Bórico 45 mM ; EDTA 1mM

**Gel de agarose 0,8%:** Agarose 0,8%%; Tampão TEB 0,5X; Brometo de etídio 0,5 µg/mL

**Tampão de amostra 10X:** Azul de bromofenol 0,1% (p/v); Glicerol 50% (v/v); Xileno cianol 0,1% (p/v).

#### 4.3.3 Soluções para eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

**Tampão de amostra 2X:** Tris-HCl 200 mM; SDS 4% (p/v); β-mercaptoetanol 4% (v/v); Glicerol 20% (v/v); azul de bromofenol 0,1% (p/v)

**Tampão de corrida - Tris-glicina 5X (solução estoque):** Trizma base 125 mM; Glicina 0,96 M; SDS 0,5% (p/v)

##### **Gel de poliacrilamida:**

**Separador para 1 gel:** Acrilamida/Bisacrilamida 2,0 mL; Tris-HCl 3,0 M pH 8,8 0,625 mL; Água destilada 2,3 mL; SDS 10% (p/v) 0,05 mL; APS 10% (p/v) 0,025 mL; TEMED 0,002 mL

**Gel concentrador:** Acrilamida/Bisacrilamida 0,325 mL; Tris-HCl 0,5M pH 6,8 0,625 mL; Água destilada 1,525 mL; SDS 10% (p/v) 0,025 mL; APS 10% (p/v) 0,0125 mL; TEMED 0,002 mL

#### 4.3.4 Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com azul de *comassie*

**Solução corante:** *Comassie brilliant blue* R-250 0,25% (p/v); Metanol 40% (v/v); Ácido acético 10% (v/v)

**Solução descorante forte:** Metanol 40% (v/v); Ácido acético 10% (v/v)

#### 4.3.5 Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com prata

**Solução I:** Metanol 50% (v/v); Ácido acético 12% (v/v); Formaldeído 0,1% (v/v). **Solução II:** Etanol 50% (v/v).

**Solução III:** Tiosulfato de sódio 0,02% (p/v).

**Solução IV:** Nitrato de prata 0,2% (p/v); Formaldeído 0,075% (v/v).

**Solução V:** Carbonato de sódio 6% (p/v); Tiosulfato de sódio  $4 \times 10^{-4}$  % (p/v); Formaldeído 0,05% (v/v).

**Solução VI:** Metanol 50% (v/v); Ácido acético 12% (v/v).

**Solução VII:** Metanol 50% (v/v).

#### 4.3.6 Soluções para *western blot*

**Tampão de transferência:** Trizma base 48 mM; Glicina 39 mM; SDS 0,037%; Metanol 20%; H<sub>2</sub>O q.s.p.

**PBS 20X (solução estoque):** Cloreto de sódio 2,7378M; KCl 0,053M; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1301M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0229M

**PBST:** PBS 20X 5% (v/v); Tween 20 0,5% (v/v)

**Solução de bloqueio:** PBST acrescido de leite em pó desnatado a 5% (p/v).

**Tampão da fosfatase alcalina (APB):** Cloreto de sódio 100 mM; Tris-HCl pH 9,5 100 mM; Cloreto de magnésio 5 mM

#### 4.3.7 Soluções para purificação da proteína

**Tampão de Lise sem uréia pH 8,0:** Imidazol 10mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 20mM

**Tampão de Lise com uréia pH 8,0:** Imidazol 10mM; Uréia 8M;  $\beta$ -mercaptoetanol 20mM

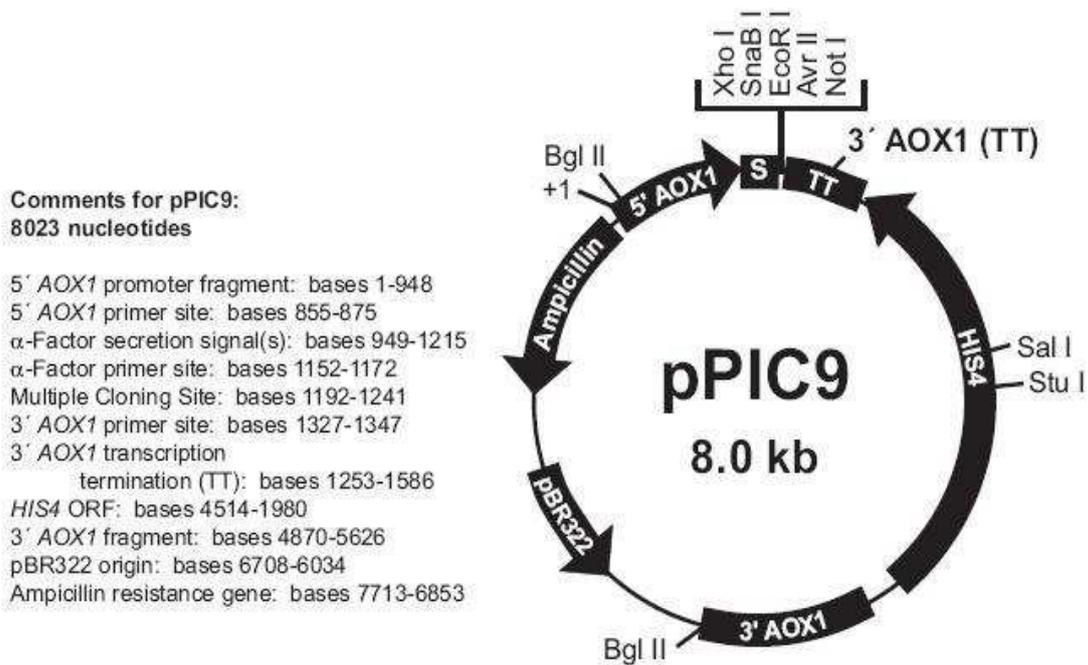
**Tampão de Lavagem:** Imidazol 40mM; Uréia 8M

**Tampão de Eluição:** Imidazol 500mM; Uréia 8M

#### 4.3.8 Soluções para diálise e gel filtração

**Tampão fosfato de potássio pH 8,0 adicionado de 0,15M de NaCl para 1000mL:** Solução A: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 127g; Solução B: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.43g; NaCl 8.766g





**Figura 12: Mapa do vetor pPIC9 para expressão da proteína em *P. pastoris*.** (Manual Invitrogen). O gene AOX 1 é responsável pela maioria das atividades da AOX na célula. É altamente regulado em nível transcricional e fortemente induzido em altas concentrações de metanol

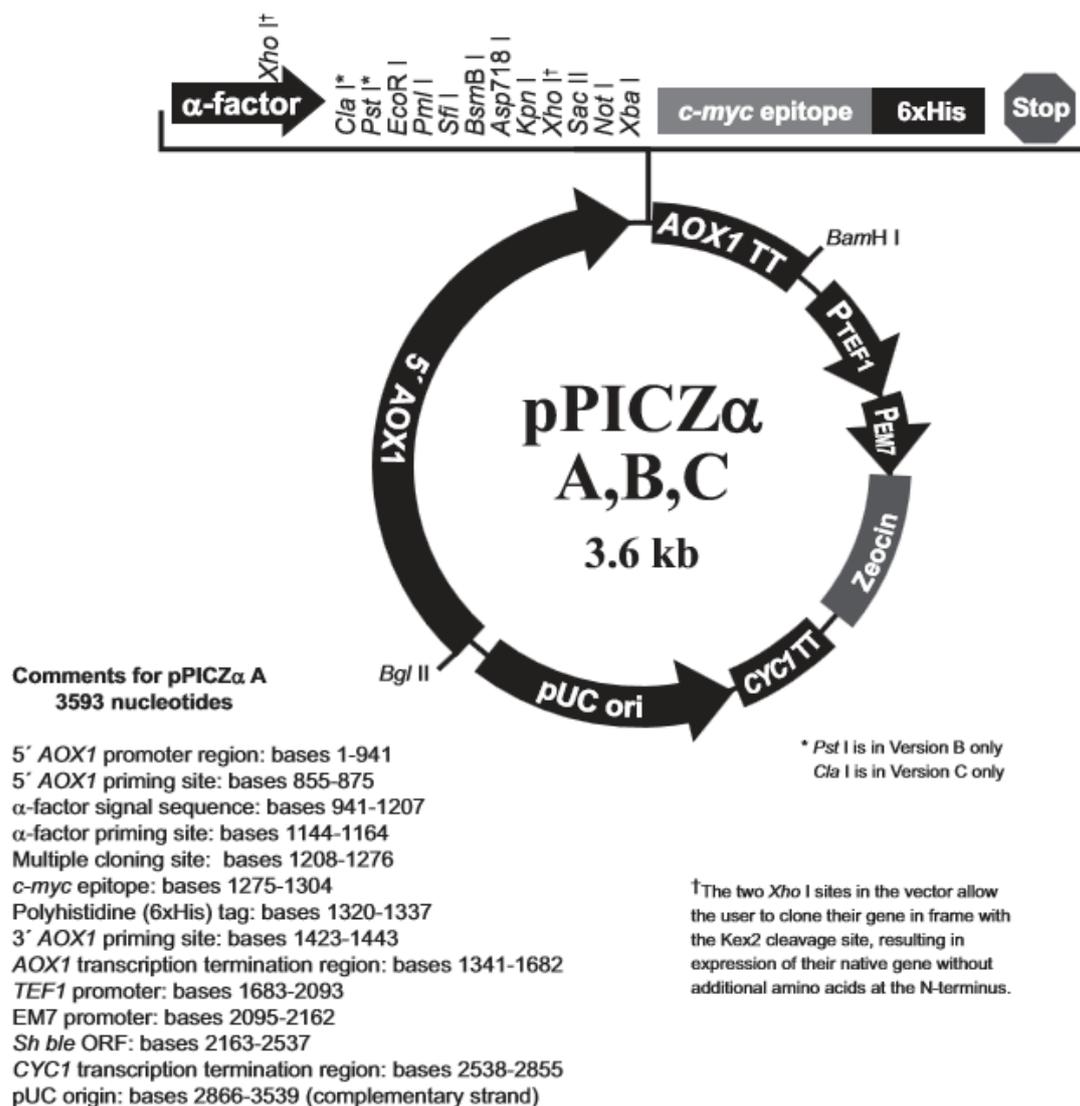


Figura 13: Mapa do vetor pPICZαA para expressão da proteína em *P. pastoris*. (Manual Invitrogen). O gene AOX 1 é responsável pela maioria das atividades da AOX na célula. É altamente regulado em nível transcricional e fortemente induzido em altas concentrações de metanol.

#### 4.6 Enzimas

**Enzimas de restrição** *Xho* I, *Not* I e *Bgl* II (New England Biolabs), manuseio conforme instruções do fabricante.

**Enzima T4 DNA ligase** (New England Biolabs), Utilizada de acordo com as instruções do fabricante.

**Enzima RNase** 0,5 µl em uma concentração de 10 mg/mL em cada miniprep.

#### 4.7 Marcadores

##### **Marcador de massa molecular para DNA:**

GeneRuler 1kb DNA Ladder plus (Fermentas *Life Sciences*)

##### **Marcadores de massa molecular para proteína:**

Unstained Protein Molecular Weight Marker 5µl por gel (Fermentas *Life Sciences*)

Precision Plus Protein Dual Color Standards 5µl por gel (BIO-RAD)

Prestained Protein Molecular Weight Marker 5µl por gel (Fermentas *Life Sciences*)

SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range 5µl por gel (BIO-RAD)

#### 4.8 Anticorpo

Anticorpo policlonal produzido em rato com cauda de histidina (His-Tag; Sigma-Aldrich), diluído em PBS (1:1000)

#### 4.9 Membrana de nitrocelulose

Hybond C Extra (*Amersham Biosciences*), - Utilizada em experimentos de *Western Blot*

#### 4.10 Kits

**GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit** (GE Healthcare): Purificação de DNA a partir de uma banda de gel de agarose.

**NBT/BCIP Kit** (Invitrogen): Revelação de *Western Blot*.

#### 4.11 Placas de 96 poços

TPP (Zellkuetur Test Plate 96F, Suíça)

#### 4.12 Imunocitocalização

Três (03) Camundongos BALB/c para imunização com proteína de interesse

Placas de ELISA TPP (Zellkuetur Test Plate 96F, Suíça)

Células de *P. lutzii* na forma leveduriforme com crescimento em meio líquido por 5 dias

#### 4.13 Ensaio enzimático radioativo

**PIPES:** pH7,2, 50mM

**MnCl<sub>2</sub>:** 10mM

**GDP-[<sup>14</sup>C] manose:** 0,76μM (0,01μCi; atividade específica 262 mCi/mmol)

**α-Metil manosídeo:** 50mM como acceptor

**Enzima:** KRE2 e MNT1

**Resina de Intercambio aniônico Dowex 1-X2:** 0,4ml

**H<sub>2</sub>OM:** q.s.p. 50 μl

#### 4.14 Líquido cintilador da reação enzimática

**Omnifluor:** 0,4% (p/v)

**Triton:** 30% (v/v)

**Tolueno:** 70% (v/v)

## 5 MÉTODOS

### 5.1 Síntese química do gene *kre2*

#### 5.1.1 Otimizado para *E. coli*

Para expressão heteróloga da proteína KRE2 *E. coli*, o gene *kre2* de *P. lutzii* foi sintetizado quimicamente e clonado em vetor de expressão pela empresa Epoch Biolabs. Foi sintetizada a sequência completa correspondente ao gene, incluindo a porção transmembrana. A sequência de nucleotídeos foi otimizada com *codons usage* para *E. coli* e adicionada as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. O gene foi clonado no vetor pET-21a (Novagem) sob o controle transcricional da T7 RNA polimerase. A **Figura 14** mostra a sequência de nucleotídeos otimizada do gene *kre2* para expressão em *E. coli*.

```

NdeI
CATATGATGAATTCGGTTTTCTGGGAAGTACCTACGGTACATTCTATTTGTGGTTTTGGGCCTTACAATTC
TACATTTTATATCCTCCTCCTCGTTACCTCTTCCAAACGCCAACAAATGTCGTATCGAACCTCAAGCCAGG
AGCGATTAACCTGACTTTAGTTCTCTGTCTCAATCACTATTTTTAGAGAAAGTCTACTGAAATCCTAACA
GTTTTATTGGCCTCGGCTCTAGCTCTCGCTGCTCCTGCGCAACGTCCCGCCTACGAACGAGTAAACGCTA
CCTTTGTGACCCCTAGCCAGAAATGAGGATGTCTGGGATATCTCCAAATCGATCCGTCAGGTGGAGGACCG
CTTCAACAGAAATTATCACTATGATTGGGTCTTTATCAACGATAAACCTTTTAACGATGAATTCAGAAG
GTTACTTCCGCGCTCGTATCCGGGAAAACCCATTACGGACACATTCCGTCCGAGCACTGGTCTGTTCCCGG
ACTTCATCGACCAAGAAAGGGCCGCTAAGGTGCGAGAAGATATGAAAGAGAAACAAGTCATATATGGAGA
CTCCATTAGTTACAGGCATATGTGTGATATGAATCTGGTTTCTTTTTTCGCCATGAGCTCCTCAATCAA
TTTGACTACTACTGGCGTGTGGAGCCAGTGTGAGTATTTCTGCGACATCAACTTCGACCCCTTCAAGT
TTATGAAAGACAACAAGAAGAAATACAGTTCGTTCTTAGTCTCTACGAATAACAAGGAAACCGTACCTAC
GCTCTGGGACAGTGTAAAGAAGTTCATGGAAAAATACCCCTCAACACATTGCCGAGGACAACAATATGGAC
TTCATCAGCTCGGACGGAGGAGACACATATAATCTGTGCCATTTCTGGTTCGAATTTGAAAGTTCGGCGATA
TAAACTGGCTACGATCTCAAGAATACCTCGATTACTTCGATGTTCTCGATAAGGACGGAGGATTCTTCTA
CGAAAGATGGGGCGACGCCCCAGTCCACTCCATCGCTGCGGCTCTCATGCTGAAAAAGGAGGAAAGTACAC
TTCTTCAATGAAATCGCCTACCGCCACGTTCCATTGCTCCACTGCCCAACGGGAGAGCAGAAAAGACTAG
ATCTGAAATGCCACTGCAATCCCAAAGACAACCTTGTGACTGGAAGGGACATTCTTGACATCTCGATACTT
CGATGTCAACAAGCTAAAGAAGCCCGAAGGCTACGAGGAGGAGCAGGATCTCGAG
XhoI

```

**Figura 14:** Sequência de nucleotídeos do gene *kre2* otimizada para *E. coli*. Nucleotídeos em destaque representam os sítios de restrição para as endonucleases *NdeI* e *XhoI*.

#### 5.1.2 Otimizado para *Pichia pastoris*

Para expressão heteróloga da proteína KRE2 em *P. pastoris*, utilizou-se duas metodologias. Na primeira, o gene foi sintetizado quimicamente e clonado em vetor de expressão pela empresa Epoch Biolabs, com a sequência completa incluindo a porção transmembrana. Foi adicionado nas extremidades sítios de restrição para *XhoI* e *NotI* e a sequência foi otimizada com *codons usage* para *P. pastoris*. O gene foi clonado no vetor pPIC9 (Invitrogen). Na **FIGURA 15A**, é mostrada a sequência protéica incluindo a porção transmembrana. Na segunda metodologia, o gene foi sintetizado quimicamente pela empresa Genone Biotechnologies, otimizada com *codons usage* para *P. pastoris* e

adicionado sítios de restrição para *XhoI* e *NotI* respectivamente. Foi retirada a sequência de nucleotídeos correspondente a porção transmembrana e o gene foi clonado no vetor pPICZαA (Invitrogen) (**FIGURA 15B**).

**A**

```
>gi|295670067|ref|XP_002795581.1| alpha-1,2 mannosyltransferase KTR1
[Paracoccidioides sp. 'lutzii' Pb01]
MNSVSGKYLRYILFVVLGLTILHFISSSSLPLPNANNVVSNLKPGAIKPDFSSLSQSLFSEKSTEILTIVL
LASALALAAPAQRPAYERNATFVTLARNEDVWDISKSIHQVEDRFRNRYHYDWFVINDKPFNDEFKKT
SALVSGKTHYGHIPSEHWSFPDFIDQERAARKVREDMKEKQVIYGDSISYRHMCRYESGFFFFRHELLNQFD
YYWRVPEPSVEYFCDINFDPFKFMKDNKKYSFVLSLEYKQTVPTLWDSVKKFMEKYPQHIAEDNNMDFI
SSDGGDTYNLCHFWSNFEVGDINWLRSQEYLDYFDVLDKDGFFYERWGDAPVHSIAAALMLKKEEVHFF
NEIAYRHVFPVHCPTGEQKRLDLKCHCNPKDNFDWKGHSCTSRFYFDVNLKPKPEGYEEEQD
```

**B**

```
> Gene kre2 de P. lutzii otimizado para expressão em Pichia pastoris
CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTCATCCTCTCTGCCTTTGCCAAATGCAAACAATGTAGTAAGTAACCT
GAAACCCGGTGCCATAAAGCCTGACTTCTCCTCTCTGTCTCAATCACTGTTCTCTGAAAAGTCAACAGAAA
TCTTGACCGTTTTGCTTGCTTCTGCTCTGGCATTAGCTGCCCTGCCCAAAGACCAGCATAACGAAAGAGTT
AACGCCACATTTGTCACCTTTGGCAAGAAATGAGGACGCTCTGGGACATTTCCAAATCCATACGTCAAGTAGA
GGATAGATTCAACAGAAACTACCATTACGACTGGGTTTTTCATCAACGATAAGCCATTCAACGATGAGTTCA
AGAAAGTCACTCTGCCTTAGTCTCTGGAAAGACCCATTATGGTCATATCCCATCCGAACATTGGTCCCTTT
CCAGACTTCATTGATCAGGAAAGAGCCGCTAAGGTGCGTGAGGACATGAAAGAGAAACAGGTGATCTACGG
TGATTCCATATCTTACAGACACATGTGTAGGTATGAATCAGGATTCTTCTTACAGACATGAACTTTTGAATC
AATTCGACTACTATTGGAGAGTTGAGCCTTCTGTTGAATACTTTTGCACATCAATTTGATCCCTTTAAG
TTCATGAAAGATAACAAGAAGAAGTACTCATTGTTCTTTCTTTGTACGAATACAAAGAAACAGTTCACCAC
TTTATGGGATAGTGTAAAGAAATTCATGGAGAAATACCCACAGCACATTGCTGAAGATAACAATATGGACT
TCATTAGTAGTGACGGAGGAGATACATAAATCTTTGTCACCTTTGGTCTAACTTTGAGGTGGGTGACATC
AACTGGTTGAGAAGTCAGGAGTACTTAGACTACTTTGATGTCCTGGATAAAGACGGTGGATTCTTCTACGA
GAGGTGGGAGACGCACCAGTTCATTCTATCGCTGCTGCCCTTATGTTAAAGAAGGAAGAAGTTCATTTCT
TTAACGAGATCGCTTATAGGCATGTTTCTTTGTCCTTGTCCATTGTCCAAACCGGAGAAACAAAAGAGGCTGGACCTT
AAGTGCCATTGCAACCCCAAAGATAACTTCGATTGGAAAGGTCATTCTTGTACTTCCCCTTACTTCGATGT
GAATAAGCTGAAGAAACCAGAAGGATACGAAGAAGAACAAGACCATCATCATCATCATTAGCGGCCCG
```

**Figura 15: Sequência de aminoácidos e nucleotídeos correspondente a proteína KRE2 de *P. lutzii*.**  
**A)** Sequência de aminoácidos destacando as porções citoplasmática (azul) e transmembrana (vermelho).  
**B)** Sequência de nucleotídeos com códons otimizados para *P. pastoris*, ausência do domínio que corresponde às porções citoplasmática e transmembrana da proteína. Sítios de restrição para *XhoI* e *NotI* respectivamente

## 5.2 Digestão de DNA com enzimas de restrição

A digestão do DNA clonado no vetor pET-21a (Novagen) foi realizada com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* para obter-se uma dupla digestão. O volume de DNA utilizado foi equivalente a 5µg. Especificações de uso das enzimas conforme descrito pelo fabricante.

Para DNA clonado no vetor pPIC9 (Invitrogen) as enzimas de restrição utilizadas foram *Xho I* e *Not I*. Volume de DNA correspondente a 5µg. Instruções de uso conforme indicado pelo fabricante.

Para DNA clonado no vetor pPICZαA (Invitrogen) a digestão dupla foi realizada com enzimas de restrição *Xho I* e *Not I*. Volume de DNA correspondente a 5µg. Instruções conforme fabricante.

### **5.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose**

Gel de agarose foi preparado a 0,8% e a ele adicionado brometo de etídio como agente intercalante de DNA, vertido em cubas de eletroforese. As amostras foram adicionadas ao tampão de amostra de DNA. A voltagem aplicada para a corrida das amostras foi de 70V e posteriormente a visualização do DNA foi realizada em um transluminador de luz ultravioleta e assim sendo possível observar o padrão de bandas.

### **5.4 Transformação de *E. coli* BL21(DE3)pLysE por choque térmico**

Em uma alíquota de 100µl de células competentes foi adicionado 25ng do gene sintético, ou seja, do sistema de ligação (vetor pET-21a::inserto). O sistema de transformação foi mantido em gelo por 30 minutos e em seguida foi levado ao banho-maria a 42°C por 90 segundos para que houvesse o choque térmico. Após o choque térmico foi adicionado 1mL de meio LB caldo e o sistema incubado a 37°C por uma hora, sendo mantida agitação por inversão a cada 15 minutos. As células transformadas foram plaqueadas em concentrações de 50µl, 100µl, em placas contendo meio de cultivo LB ágar adicionado de antibiótico ampicilina 100µg/mL e Cloranfenicol 20 µg/mL. As amostras foram incubadas a 37°C *overnight* (Sambrook *et al.*, 2001-com modificações).

### **5.5 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep)**

Pré-inóculo preparado com uma colônia isolada adicionado de 5mL de meio LB (Sambrook, Joseph, 1989) acrescido de ampicilina (100 µg/mL). A incubação foi mantida a 37°C a uma agitação de 250 RPM (Shaker da Empresa New Brunswick Scientific) por 16 horas aproximadamente. A extração do plamídeo foi realizada utilizando o kit comercial *Plasmid Miniprep Kit* (invitogen), conforme descrito pelo fabricante.

### 5.6 Otimização da expressão heteróloga em *E. coli*

O pré-inóculo foi preparado no dia anterior ao experimento utilizando uma colônia isolada em 5 mL de meio LB caldo adicionado de antibiótico ampicilina na concentração de 100µg/mL e Cloranfenicol 20µl/mL para a cepa *E. coli* BL21 (λDE3) pLysE e ampicilina 100µg/mL para a cepa *E. coli* BL21 (λDE3) e incubados a 37°C sob agitação de 250 RPM (Shaker da Empresa New Brunswick Scientific) *overnight* em falcon de 15mL cada. No dia do experimento para cada cepa foi feito um inóculo de 25mL de LB caldo utilizando 5% do pré-inóculo e incubado na velocidade e temperatura já citadas até atingir D.O.<sub>600nm</sub> de 0,6. O processo de otimização da expressão heteróloga de KRE2 em *E. coli* está demonstrado na TABELA 4.

**Tabela 4: Otimização da expressão heteróloga em *E. coli***

Cepa <i>E. coli</i>	Meio de cultivo	IPTG mM	Tempo de indução (hora)	Temp.	Glicose 5%
BL21 (λDE3)	LB	0,5; 1; 2	30'; 1; 2; 4; 6	37°C	Não
BL21 (λDE3) pLysE	LB	0,5; 1; 2	30'; 1; 2; 4; 6	37°C	Não
	LB	2	30'; 1; 2; 4; 6	37°C	Sim
	LB	2	30'; 1; 2; 4; 6	25°C	Não
	4YT	2	30'; 1; 2; 4; 6	37°C	Não
	4YT	2	30'; 1; 2; 4; 6	37°C	Sim
	4YT	2	30'; 1; 2; 4; 6	25°C	Não
	TB	2	30'; 1; 2; 4; 6	37°C	Não
	TB	2	30'; 1; 2; 4; 6	37°C	Sim
	TB	2	30'; 1; 2; 4; 6	25°C	Não

Fonte: Elaborada pela autora

### 5.7 Análise da expressão heteróloga em *E. coli*

Os géis foram preparados utilizando o sistema de eletroforese *Mini PROTEAN Tetra Cell*, da BIO-RAD. As amostras foram preparadas com pellet referente a 50 µl de volume de cultura adicionados de tampão de amostra com concentração final de 2x e aplicadas em dois géis de poliacrilamida após aquecimento a 100°C por 5 minutos e aplicada voltagem de 170V para obtenção da corrida. Das diversas condições testadas

foram escolhidos os tempos de 0 hora, 2 horas, 4 horas em meio LB a 37°C, LB a 37°C adicionado de 5% de glicose e LB a 25°C das cepas *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) e *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysE para comparar se haveria alguma alteração do padrão de indução quando expostos a temperaturas diferente e quanto ao fornecimento de glicose.

Para análise em *Western Blot* foram escolhidos os tempos de 0 hora e 5 horas de indução nos meios LB, 4YT nas condições já citadas para ambas as cepas com a finalidade de obter a melhor condição de indução. As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 12% e coloração com corante azul de *Comassie*. Foram utilizados como marcadores SDS-PAGE Molecular Weight Standards (Broad Range) e para análise por *Western Blot*, (Precision Plus Protein Dual Color Standards da BIO-RAD ou Prestained Protein Molecular Weight Marker da Fermentas Life Sciences).

Coloração do gel SDS-PAGE (12%) com azul de *Comassie*:

Para corar com azul de *Comassie*, aplicou-se o corante por pelo menos 1 hora sob agitação e em seguida retirou-se o corante e aplicou-se a solução descorante. A solução descorante foi retirada após o clareamento do gel, quando foi possível a visualização do padrão de bandas.

## 5.8 Indução em frasco em da proteína KRE2 *E. coli*

O pré-inóculo foi preparado no dia anterior ao experimento utilizando uma colônia isolada em 25 mL de meio LB caldo também em 25mL de 4YT adicionado de antibiótico ampicilina (100 $\mu$ g/mL) e Cloranfenicol (20 $\mu$ g/mL) para a cepa *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysE e incubados a 37°C sob agitação de 250 RPM (Shaker da Empresa New Brunswick Scientific) *overnight* em *erlenmeyer* de 250mL cada. No dia do experimento foi feito um inóculo de 250mL nas duas condições citadas utilizando 5% do pré-inóculo (12,5mL) e incubado na velocidade de 260 RPM (Shaker da Empresa New Brunswick Scientific) a 37°C até atingir D.O.<sub>600nm</sub> de 0,6. A indução foi iniciada com IPTG em uma concentração final de 2,0mM e mantida por 6 horas. Foram coletados 2mL do inóculo após a adição de IPTG marcando o tempo zero e o tempo final, aliqotado 40mL em falcons novos e centrifugados a 8.000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet armazenado a -80°C.

### 5.9 Análise por *western blot*

O gel de poliacrilamida foi incubado em tampão de transferência por 15 minutos após a eletroforese. A membrana de nitrocelulose e papel filtro hidratados no tampão de transferência. O sistema de transferência utilizado foi o Trans-Blot SD - Semi Dry Transfer Cell da BIO-RAD seguindo as instruções do fabricante, Observou-se a transferência do marcador para membrana (*Precision Plus Protein Dual Color Standards* da BIO-RAD ou *Prestained Protein Molecular Weight Marker* da Fermentas *Life Sciences*). Em seguida a membrana foi bloqueada com PBS adicionado de leite em pó desnatado a 5% e mantido por 1 hora, a temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi lavada com solução de PBS-Tween 20 a 0,05% sob agitação. Retirou-se a última lavagem e foi adicionado à membrana o anticorpo anti-polyHis diluído em PBS (1:1000), sob agitação de 1 hora em temperatura ambiente. Passado o período de incubação com o anticorpo, este foi retirado e após outras lavagens com solução de PBS-Tween 20 a 0,05% e efetuou-se uma lavagem rápida da membrana com APB. Para revelação da membrana, utilizou-se o kit NBT/BCIP sendo 1 mL da solução A e 1mL da solução B completado com H<sub>2</sub>O destilada para um volume final de 10mL. Esta solução foi utilizada até o aparecimento das bandas. A membrana foi lavada com H<sub>2</sub>O destilada e secou em temperatura ambiente.

### 5.10 Purificação da proteína

A purificação da proteína obtida por indução em larga escala deu-se de duas maneiras, visto que foi feito em condições diferentes para observar em qual ocorria uma otimização efetiva da proteína.

Cada *pellet* obtido de um volume de 50ml de cultura foi mantido em gelo e lisado em sonificador (Vibra Cell – Sonics) utilizando os seguintes parâmetros: 60% de amplitude com 10 pulsos de 10 segundos e 59 segundos de intervalo gerando um timer de 1 minuto e 40 segundos. As amostras foram sonicadas com 8ml de tampão de lise sem uréia e em seguida a retirada do sobrenadante, a adição de 8ml de tampão de lise com uréia 8M. Em cada sonicação aplicou-se uma centrifugação de 5.000xg por 30 minutos a 4°C.

O produto de purificação foi obtido por resina de agarose acoplado ao níquel, (Ni Sepharose 6 Fast Flow da GE Healthcare), e esta resina foi equilibrada em tampão de lise pH 8,0 momentos antes da adição da amostra. O sobrenadante oriundo de duas sonicações foi mantido sob agitação leve em orbital por 1 hora e 30 minutos em câmara fria. Foram coletadas amostras de proteínas que não se ligaram a esta coluna antes da eluição efetiva, realizou-se 5 lavagens de 1mL com tampão de eluição com uréia 8M. Após esta etapa, efetuou-se em média 5 eluições com o devido tampão. O produto obtido da purificação foi analisado tanto SDS-Page 12% corado por *Comassie Blue*, como por *Western Blot*.

### **5.11 Quantificação de proteína pelo ensaio de Bradford**

Para realizar a quantificação da proteína pelo Ensaio de Bradford, (1976), utiliza-se a albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A leitura foi realizada em 595nm, após incubação de 5 minutos utilizando 980 $\mu$ L da solução adicionado de 20 $\mu$ L da amostra.

### **5.12 Ultrafiltração da proteína**

As eluições obtidas por purificação da proteína foram concentradas em Amicon utilizando membrana de 30 kDa, assim ficando retida proteínas maiores que 30 kDa. Este procedimento foi realizado para fazer a troca do tampão contendo uréia por tampão de fosfato de potássio adicionado de 0,15M de NaCl pH 8,0. Nesta etapa, o objetivo era preparar a amostra para realizar o procedimento de gel filtração. Antes de montar o sistema Amicon a membrana deve ser hidratada por 1 hora. Com o aparato devidamente montado, adicionou-se a amostra com o tampão de fosfato de potássio a 0,15M de NaCl e o sistema foi fechado para iniciar a diálise. Foram realizadas 8 trocas de tampão com volume de 8mL cada.

### **5.13 Purificação da proteína heteróloga em *E. coli* por exclusão molecular**

A gel filtração também conhecida como cromatografia por exclusão molecular, separa as moléculas de acordo com as diferenças de tamanho à medida que passam por uma coluna. O procedimento foi realizado utilizando coluna Superdex G75 e o equipamento ÄKTA Purifier da GE Healthcare. O tampão utilizado para fazer a gel filtração foi o tampão de fosfato de potássio adicionado de 0,15M de NaCl pH 8,0

filtrado em membrana de poro de 0,45 $\mu$ m e deaerado em equipamento de ultrassom por 10 minutos.

Utilizou-se tubos de vidro para coletar frações de 1mL de filtração da proteína/tampão que passaram pelo *looping* do equipamento ÄKTA. Foi aplicada no loop de equipamento, 1mL de KRE2 purificada por coluna de níquel na concentração de 1mg. Os tubos contendo as frações de interesse coletadas foram precipitados com TCA 100% para que fossem concentradas e aplicadas em gel de poliacrilamida 12% e posteriormente, corado por prata para analisar o padrão de bandas.

#### **5.14 Precipitação com TCA 100%**

Para cada fração de interesse com volume de 1mL foi adicionado 250 $\mu$ l de TCA 100%. Este material foi mantido na câmara fria em gelo *overnight*. No dia seguinte foi feita uma centrifugação de 8.000xg por 30 minutos a 4°C. O *pellet* foi lavado 2x com 1mL de acetona gelada cada e centrifugado na mesma velocidade por 15 minutos cada lavagem. A acetona foi retirada e o *pellet* foi ressuscitado em 50 $\mu$ l de tampão de amostra 1x. Para aplicação em gel de poliacrilamida, a amostra foi submetida fervura por 5 minutos. O gel foi corado por prata.

#### **5.15 Coloração do gel de poliacrilamida por prata**

A coloração do gel por prata é baseada no protocolo de (Ansorge, 1985). Todo o processo utiliza 7 soluções. A primeira solução de fixação, o gel fica incubado sob agitação por 15 minutos. Passado o tempo de incubação, é trocada a solução, sendo adicionada a solução 2 realizando no total 3 lavagens de 10 minutos cada, e mantida a agitação. A solução 3 de tratamento é incubada por 10 minutos e em seguida é realizada a troca pela solução 4, por 10 minutos. A revelação ocorre na solução 5 e o tempo é estipulado até o aparecimento de bandas. A solução 6 é aplicada para interromper o processo de revelação sendo mantida por 10 minutos. Por último aplica-se a solução 7.

### **5.16 Espectrometria de massa (MS) e identificação de proteínas por “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF)**

As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massa Autoflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics). A calibração externa foi realizada utilizando um “kit” de peptídeos padrão fornecido por Bruker Daltonics (Peptide calibration standard (1000–3200 Da): angiotensina II, angiotensina I, substância P, bombesina, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39, somatostatina 28).

Espectros de massas foram obtidos em modo refletido positivo para os peptídeos, utilizando o programa Flex Control v. 2.4 (Bruker Daltonics). O programa Flex Analysis v. 2.4 (Bruker Daltonics) foi utilizado para adquirir e editar as listas de picos. Tais listas foram utilizadas para buscas contra o banco de dados de proteínas do NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EUA) usando Bio Tools v. 2.0 (Bruker Daltonics) acoplado ao programa Mascot v. 2.1 ou 2.2 (<http://www.matrixscience.com/>). As massas monoisotópicas dos peptídeos trípticos foram utilizadas para identificar as proteínas por “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF) apenas em modo MS.

A tolerância de erro de massa molecular estabelecida para os peptídeos foi menor que 100 ppm. Estabeleceu-se oxidação de metionina como modificação variável e propionamidação de cisteína (alquilação com acrilamida) como modificação fixa. Os possíveis sítios de clivagem perdidos foram estabelecidos como zero ou, no máximo, um. Identidades foram consideradas significativas se o score de identificação de proteína ultrapassasse o limiar variável calculado pelo programa Mascot, assumindo valor de  $p < 0,05$ .

### **5.17 Produção de Anticorpo anti-KRE2**

Para a produção de anticorpos anti-KRE2 foi encaminhada e autorizada pelo comitê de ética a documentação que solicita permissão para o manuseio e imunização dos animais. Foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c para obtenção de anticorpos policlonais contra KRE2, devendo ter no início do experimento idade entre 6 a 8 semanas. O experimento foi realizado utilizando a proteína recombinante purificada por cromatografia de afinidade, e introduzida por via intradérmica, após emulsificação com adjuvante de Freud. O processo ocorreu em três etapas onde, em cada

administração foi injetado 50µg de proteína e o intervalo entre manipulações, de 2 semanas. Foram analisados os títulos de IgG e os clones resultantes selecionados por ELISA. A reação foi incubada com 10 µg/mL de proteína recombinante seguida por uma solução de bloqueio com leite desnatado a 5%. As placas foram incubadas com diluições do soro dos camundongos imunizados, lavadas e incubadas com anti-IgG de camundongo conjugada a fosfatase alcalina. A reação foi detectada por pNPP e a leitura por espectrofotometria em comprimento de onda a 405nm.

### **5.18 Imunocitocalização**

As células de *P. lutzii* foram cultivadas em meio Fava Neto líquido em agitação de 200 RPM (Shaker da Empresa New Brunswick Scientific) e coletadas com cinco dias de crescimento. As células foram adicionadas a uma solução de paraformaldeído a 4% em PBS com pH 7,0 para fixação, após centrifugação de 4000 xg/5 minutos. As células foram lavadas 1 vez com solução de PBS a 4000xg/2 minutos. Após o processo de lavagem, foram ressuspensas em metanol e incubados por 10 minutos a -20°C. Foi realizado outro processo de lavagem das células, e ressuspensas com 400µl de PBS. Deste volume pós lavagem, tomou-se 100µL adicionados de 890µL de PBS e por fim, acrescentado 10 µL de anticorpo policlonal anti-KRE2 produzidos em camundongos BALB/c em concentração de 1:1000. Em seguida, foi incubado anticorpo secundário marcado com FITC. As células foram ressuspensas com 1 gota de Prolong Gold, e do volume em eppendorf, foram coletados 10µL para montagem da lâmina. Aguardou-se um período de dois dias para que as lâminas fossem seladas e posteriormente realizada a leitura. Para coletar as imagens, foi utilizado um microscópio Zeiss Axio Observer Z1 equipado com objetiva 63x NA 1.4 e câmera de CCD AxioCam MRm. As imagens foram processadas por deconvolução no software ZEN, da Zeiss.

### **5.19 Transformação de *Pichia pastoris* por eletroporação**

Para transformação de *P. pastoris* (linhagem GS115 / X-33) foi utilizada uma colônia isolada de uma cultura fresca (2 dias). O pré-inóculo foi preparado em 4 mL de meio YPD em um *erlenmeyer* de 125 mL e incubado a 30°C, sob agitação de 200 RPM *overnight* (Shaker da Empresa New Brunswick Scientific), por aproximadamente 24 horas. Em tubos tipo eppendorf foram aliqüotadas 80µl de células competentes e adicionado 10 µg de DNA linearizado com SacI. As células foram transferidas para

cubeta de 0,2 cm gelada e incubada em gelo por 5 minutos e aplicado os seguintes parâmetros para eletroporação: 1500V, 25  $\mu$ F e 400  $\Omega$  com campo de 7,5 KV/cm. Imediatamente após o choque foi adicionado 1 mL de sorbitol gelado a cubeta. Alíquotas de 50 $\mu$ l foram plaqueadas em meio mínimo com glicose utilizando pérolas de vidro estéreis. As placas foram e incubadas a 30°C, por aproximadamente 48 horas (Manual Invitrogen - Catalog no. K1710-01 e Catalog. no. K1740-01).

### **Indução em placa *Deep well***

Em placa *deep well* foi adicionado em cada poço 800 $\mu$ l de BMGY e inoculado um transformante, vindo da placa MD. As placas foram vedadas com adesivo e furos foram feitos no adesivo para permitir a aeração. O período de incubação foi de 72h, a 30°C e sob agitação de 200 RPM (Shaker da Empresa New Brunswick Scientific). No último dia de incubação aplicada centrifugação de 3000xg por 5 minutos e o sobrenadante retirado com o auxílio de uma ponteira. Então 800 $\mu$ l de meio BMMY foram adicionados aos poços e as células ressuspendidas com auxílio de agitação. A placa foi incubada por mais 96h, a 30°C, sob agitação de 200 RPM (Shaker da Empresa New Brunswick Scientific). A cada 24 horas foi adicionado 0,5% de metanol para manter a indução. Um *dot blot* foi realizado com 200 $\mu$ l do sobrenadante da indução após 96 horas. O último poço de cada placa era destinado ao controle positivo (Boettner *et al.*, 2002 com modificações).

### **5.20 Análise dos transformantes por *dot blot***

Para análise dos transformantes por *dot blot*, foi aplicada à membrana de nitrocelulose 20 $\mu$ l do sobrenadante da indução em placa *deep well*. Após secagem, a membrana foi bloqueada em PBS-T com leite desnatado 5% por 1 hora em temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C. A membrana foi lavada 3 vezes de cinco minutos com PBS-T, sob agitação. Em seguida, foi incubada com anticorpo anti-polyHis (1:1000) por 1 hora. Passado o tempo estimado foi realizada mais três lavagens de 5 minutos com PBS-T e revelada com APB seguido de solução reveladora (NBT/BCIP).

### **5.21 Indução de recombinantes de *Pichia pastoris* em frasco usando vetor pPIC9**

Para esta etapa a indução foi realizada de duas maneiras, a finalidade era selecionar a melhor condição onde pudesse haver diminuição de atividade de proteases.

Foram preparados dois pré-inóculos contendo 25 mL de BMGY mantido *overnight* por 24 horas. O inóculo foi preparado em frascos não aletado e a D.O.<sub>600nm</sub> calculada para 1,0 e 0,3. No frasco da D.O.<sub>600nm</sub> 1,0 foi adicionado metanol no seguinte tempo e concentrações: 12h – 0,5%, 24h – 1%, 36h – 1%, 48h – 1%. No frasco da D.O.<sub>600nm</sub> 0,3 foi adicionado metanol no tempo e concentrações: 24h, 36h, 48. Foi realizada a precipitação de 1ml do sobrenadante por TCA 100%. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% e, corados por *Comassie Blue*, e/ou Prata.

## **5.22 Indução de recombinantes de *Pichia pastoris* em frasco usando vetor pPICZαA**

Inoculou-se uma colônia fresca de *P. pastoris* recombinante em 25ml de meio YPD em frasco de 250ml. A cultura foi incubada a 30°C por aproximadamente 16h. O meio de cultivo foi centrifugado a 1500xg/ 5 minutos e realizada a troca do meio de cultivo para BMMY e o ajuste da DO<sub>600nm</sub> 1. A cultura foi incubada a 30°C por período de 96h e adicionou-se 1% de metanol estéril a cada 24h. Foram coletados 2ml dos tempos de 0h, 24h, 48h, 72h, 96h e analisados em géis de poliacrilamida corados com *comassie blue* / prata e *western blot*. (Manual Invitrogen - Catalog. no. K1740-01 com modificações.

## **5.23 Purificação da proteína recombinante em *Pichia pastoris* usando vetor pPICZαA**

A purificação da proteína recombinante obtida por indução em frasco utilizou-se de cromatografia de afinidade ao níquel e ao cobalto.

O meio de cultura foi centrifugado a 3000xg por 20 minutos a 4°C para obtenção do extrato bruto livre de células. Nesta etapa todos os procedimentos foram realizados em gelo. Foram utilizados 6ml de extrato bruto para purificação e mantidos sob agitação por 1:30 minutos, em câmara fria, em contato com 2ml de resina de agarose acoplado ao níquel (Ni Sepharose 6 Fast Flow da GE Healthcare). A resina foi equilibrada em tampão de lise nativo pH 8,0 momentos antes da adição da amostra. Foram coletados as amostras referente ao FT (*Flow-through*), 3 lavagens e 5 eluições com seus respectivos tampões. O material obtido da purificação foi analisado tanto SDS-Page 12% corado

por *Comassie Blue* / prata, como por *Western Blot* (metodologia de análise já citada). A purificação por cobalto (HisPur<sup>TM</sup> Cobalt Chromatography Cartridges) foi realizada da mesma maneira, porém, não houve resultado positivo.

#### 5.24 Ensaio enzimático

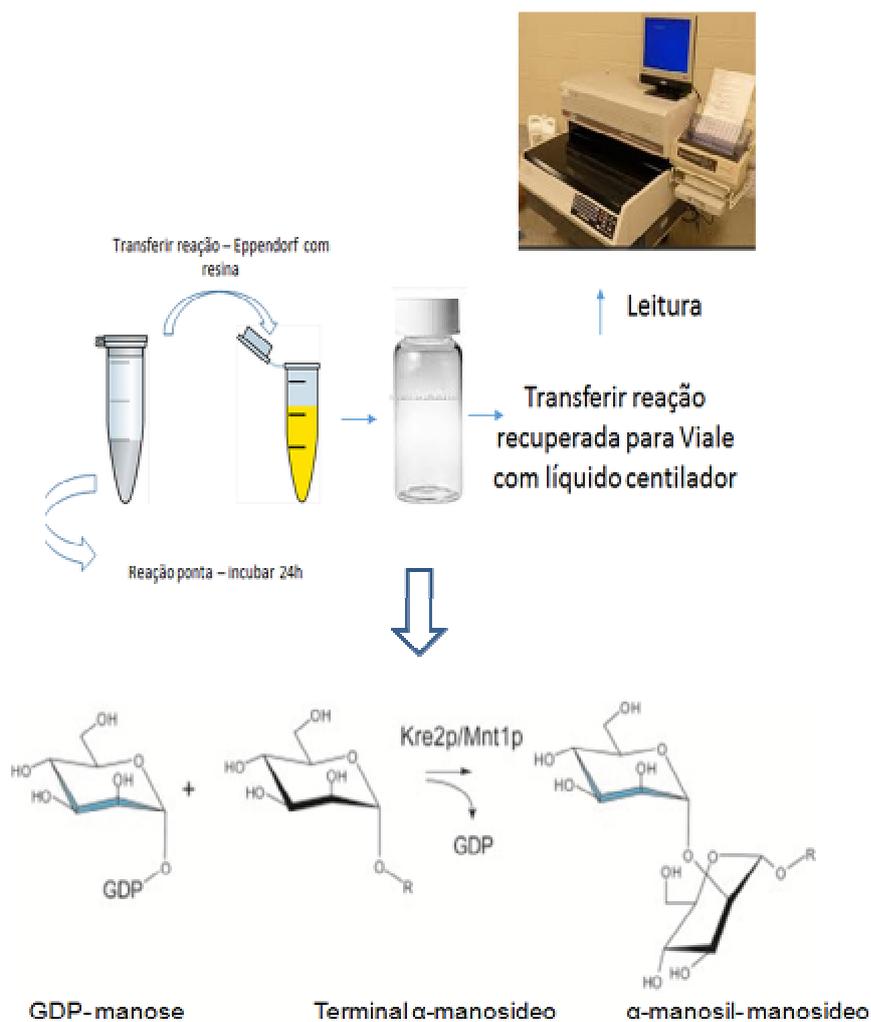
O ensaio de atividade enzimática foi realizado como descrito por Nakijama e Ballou (1975). A reação foi preparada nas concentrações citadas em materiais, para um volume final de 50  $\mu$ l, e incubada a 28°C por um período de 24h. Para retirar a GDP-manose-[<sup>14</sup>C] não ligada, o volume da reação foi passado pela resina de intercâmbio aniônico Dowex 1-X2. O volume neutro foi adicionado em um vial contendo 2mL de líquido cintilador. A radioatividade foi determinada utilizando um contador cintilógrafo da marca Beckman Ls 6500 (**FIGURA 16**). Após a leitura, realizado os cálculos de atividade específica para cada amostra.

Para realização da cinética enzimática o reagente que sofreu variação foi o GDP-[<sup>14</sup>C] manose, adicionado nas concentrações de 1pM, 2pM, 4pM, 8pM, 16pM e 32pM, sendo a concentração de uso 4pM. Volume final da reação foi de 50 $\mu$ l.

Para os testes de inibição enzimática foi adicionada a molécula inibidora variando as concentrações e conseqüentemente a quantidade de água disponível na reação (50 $\mu$ l).

No estudo para avaliar o efeito de diversos íons na atividade enzimática da proteína KRE2, na reação padrão (utilizada pelas demais reações) o íon utilizado foi o  $MnCl^{2+}$ , conforme descrito por Díaz-Jimenez e cols. (2012). Desta maneira, o íon  $MnCl^{2+}$  foi substituído individualmente pelos íons  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  em cada reação.

A técnica enzimática baseia-se na utilização de GDP-manose como doador e metil- $\alpha$ -D-manopiranosídio (exemplo de bom aceptor) resultando na formação do produto metil-2- $\alpha$ -D-manopiranosil- $\alpha$ -D-manopiranosideo (Nakijama e Ballou, 1975),  $\alpha$ -1,2-manosil-manosideo (Lobsanov *et al.*, 2004) (**Figura 16**).



**Figura 16: Esquema da reação de transferência de manose a partir de GDP-manose para um  $\alpha$ -manosídeo catalizado pela KRE2/MNT1.** *In vitro* KRE2/MNT1 utiliza  $\alpha$ -manose, metil- $\alpha$ -manose,  $\alpha$ -1,2 manobiose e metil- $\alpha$ -1,2-manobiose como aceptor. Figura da reação retirada e com adaptações de Lobsanov e cols. (2004). Metodologia retirada de Nakijama e Ballou (1975).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

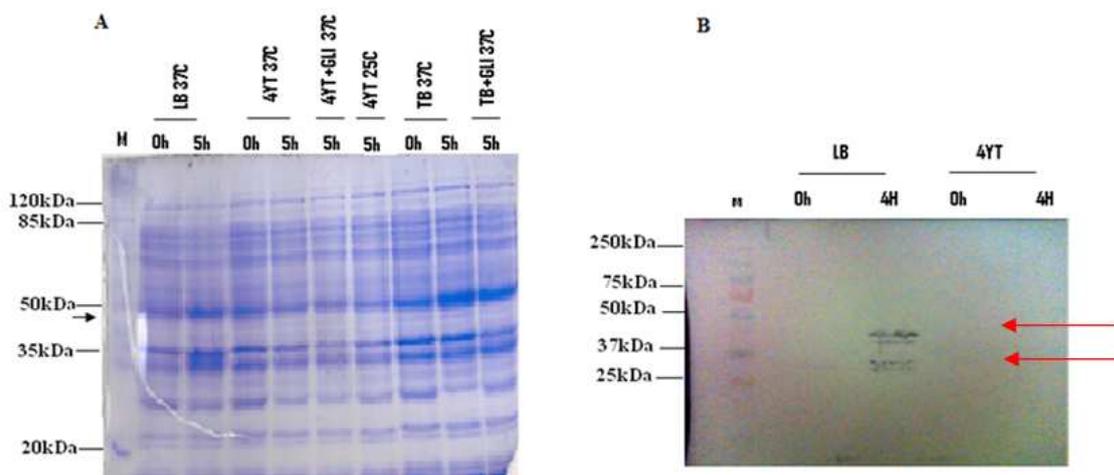
A proposta de expressão do gene alvo *kre2* contou com três estratégias, uma em *E. coli* e duas em *P. pastoris*. Nas três estratégias os genes foram sintetizados quimicamente com *códons usage* adequados para cada sistema de expressão.

### 6.1 Expressão do gene *kre2* em *E. coli*

O gene sintético foi otimizado para o *códon usage* de *E. coli*. Nesta etapa o gene foi sintetizado incluindo a porção transmembrana e uma cauda de 6 histidinas. As linhagens BL21 ( $\lambda$ DE3) e BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysE de cepas de expressão de *E. coli* foram transformadas por choque térmico conforme protocolo citado em métodos. Utilizou-se duas cepas empregando 2mM de IPTG como agente indutor ao meio de cultura LB a 37°C, LB acrescido de 5% de glicose a 37°C e LB a 25°C, para determinar a linhagem na qual ocorreria melhor expressão da proteína recombinante. Nesta etapa inicial constatou-se que ambas haviam expressado a proteína contudo, a linhagem BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysE, apresentou-se mais produtiva.

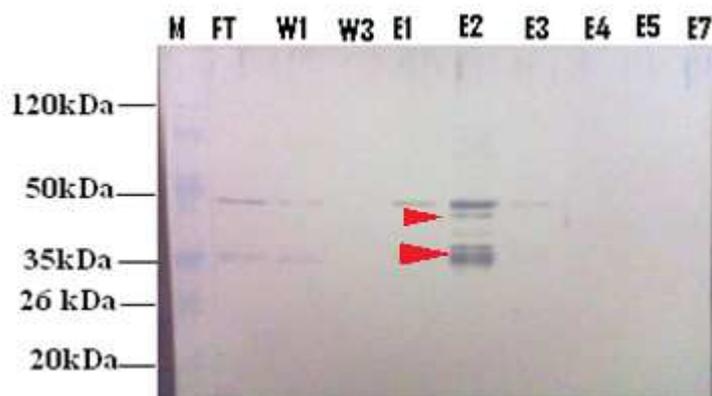
Partindo do ponto de otimização da indução da proteína em pequena escala, foram testadas várias condições na linhagem BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysE. Entre elas utilizando os meios LB, 4YT e TB a 37°C acrescidos de 2mM de IPTG, 4YT e TB adicionado de 5% de glicose a 37°C, e por último 4YT e TB a 25°C, visto em gel de poliacrilamida a 12% corado por *Comassie blue* (**Figura 17A**). Foram analisados os tempos de 0h e 5h para os meios LB, 4YT e TB em condições de crescimento a 37°C. Nas condições de crescimento a 25°C e nas induções adicionadas de glicose, somente foi utilizado o último tempo de indução. Nesta etapa, a expressão da proteína recombinante proveniente do meio LB a 37°C foi considerada a melhor entre as demais, sendo visto em gel um aumento no padrão de expressão entre o tempo de 0h e 5h, na altura esperada inferior a 50kDa, mostrado por uma seta. Em seguida foram selecionadas para análise por *western blot* as amostras LB e 4YT a 37°C para confirmar clones positivos na indução da proteína nas condições citadas (**Figura 17B**). Foi possível observar na amostra de cultura do meio LB algumas bandas no tempo de indução de 4h. A primeira delas está abaixo de 50kDa, o que seria correspondente a proteína recombinante, porém,

outras bandas de massa molecular inferior eram vistas e seria sugestivo de que a proteína KRE2 pudesse estar degradando.



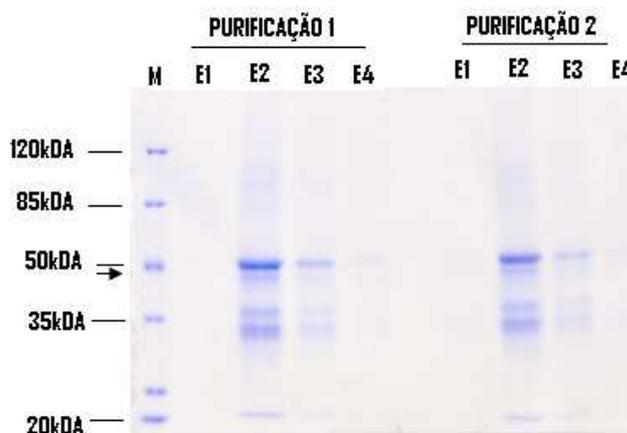
**Figura 17: Análise da expressão da proteína KRE2 em *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) pLysE de indução em pequena escala.** (A) Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% de amostras em diversas condições. (B) *Western Blot* das amostras LB a 37°C e 4YT a 37°C. A seta indica o padrão de bandas. (M) Marcador de massa molecular *Prestained Protein Molecular Marker* (Fermentas), *Precision Plus Protein Standards* (BIORAD), respectivamente.

O processo de purificação da proteína foi realizado posteriormente às análises de indução em pequena escala. Utilizou-se nesta etapa, resina de agarose acoplada ao níquel, (*Ni Sepharose 6 Fast Flow* da GE Healthcare). A detecção da proteína recombinante foi possível, pois, possui uma cauda de 6 histidinas ligada ao C-terminal, tendo esta cauda afinidade pelo níquel o que facilita o processo de purificação. A coluna de cromatografia foi equilibrada em tampão de lise. O processo de lise das células contou com a utilização do tampão de lise duas vezes, sendo o primeiro sem uréia e o segundo adicionado de uréia 8M. Após incubação sob agitação foi coletada a fração não ligada à coluna Flow-through (FT), com três lavagens de 1mL cada, com tampão de lavagem e sete eluições da proteína ligada à coluna contendo 1mL cada uma para avaliar em qual ponto haveria uma maior concentração da proteína de interesse. Os tampões de lavagem e eluição eram adicionados de uréia 8M. Do material coletado individualmente em tubo do tipo eppendorf foi analisada uma pequena alíquota por *western blot*, utilizando o anticorpo anti-polyHis. Foi observado (**Figura 18**) que ocorre um padrão de bandas mais forte com massas moleculares aproximadas de 47kDa e 37kDa respectivamente, sugerindo uma possível degradação da proteína.



**Figura 18: Análise por western blot de purificação da proteína KRE2.** (FT) Flow-Through. (W1 e W3) lavagens 1 e 3 com 4mL. (E1, E2, E3, E4, E5, E7) eluições com 1 mL. (M) Marcador de massa molecular *Prestained Protein Molecular Marker* (Fermentas). Setas mostram bandas de menor massa molecular.

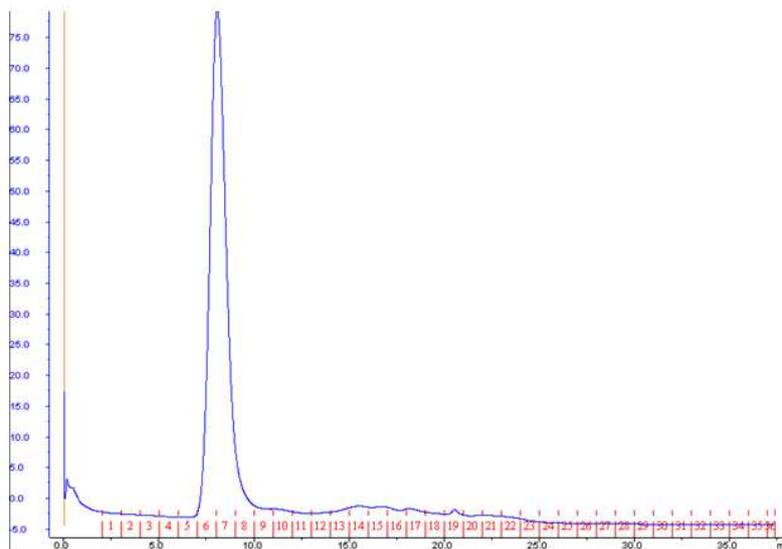
Em seguida o gel foi corado com *comassie blue* e analisado somente as eluições de duas purificações para observar se ocorreria o mesmo padrão de bandas (**Figura 19**).



**Figura 19: Análise de purificação da proteína KRE2 em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%.** Foram analisadas as eluições (E1, E2, E3, E4) de duas purificações. Seta indica a banda correspondente a proteína KRE2. (M) Marcador de massa molecular *Prestained Protein Molecular Marker* (Fermentas).

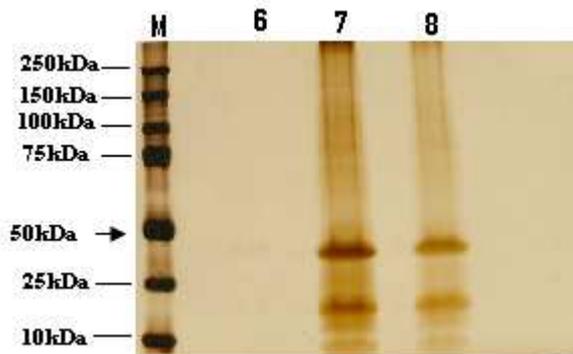
No intuito de eliminar a banda menor foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular (Gel Filtração) coluna Superdex™ G75, (GE Healthcare), para excluir proteínas de massa molecular inferior a 30kDa. Durante a corrida da filtração foi possível acompanhar o perfil de eluição. Esperava-se ao menos dois picos, pois, quando

visto em gel nota-se duas bandas de maior intensidade. O pico eluído na cromatografia por exclusão molecular corresponde ao tamanho de 30kDa (**Figura 20**).



**Figura 20:** Perfil de eluição da cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex™ G75. Foram coletadas as frações 6, 7, 8 de 1mL para análise em gel de poliacrilamida 12%.

Para analisar as frações coletadas 6, 7, e 8, estas foram reunidas e precipitadas com TCA 100% e analisadas em gel de poliacrilamida (coloração com prata). Foi possível observar que a proteína de interesse não estava presente no gel, as bandas correspondem aos tamanhos não esperados de aproximadamente 30kDa e 20kDa, o que sugere perda ou degradação da proteína durante o processo de purificação em coluna de exclusão molecular (**Figura 21**). A degradação da proteína já era um processo observado em etapas desde a indução.



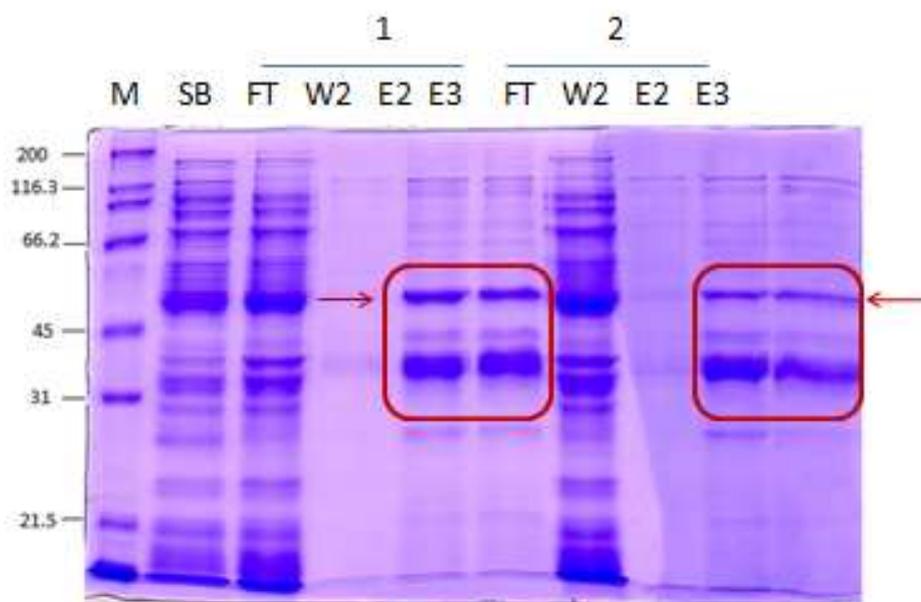
**Figura 21:** Análise da cromatografia de exclusão molecular em gel de poliacrilamida 12%. (6, 7, 8) frações coletadas do pico correspondente na gaussiana. Observa-se na seta a ausência do padrão de banda de interesse. (M) *Precision Plus Protein Standards* (BIORAD).

Com todas as tentativas frustradas de eliminar as bandas resultantes possivelmente de degradação, com massa molecular inferior a 49kDa, utilizou-se outra metodologia para averiguar a real situação dessas proteínas. A metodologia empregada foi a espectrometria de massa (MS) para identificação de proteínas por “*Peptide Mass Fingerprinting*” (PMF). O objetivo neste experimento seria de constatar a presença da proteína recombinante mesmo que degradada, para confirmar a sua expressão.

Para este fim, a proteína proveniente da purificação, foi colocada em gel de poliacrilamida 12% gerando o padrão observado na **Figura 22**. Cada uma das bandas do gel foi analisada separadamente, fazendo um *spot* do próprio gel. As proteínas foram clivadas em peptídeos de acordo com sua razão massa ( $m$ ) sobre carga ( $z$ ),  $m/z$  e analisados com auxílio de ferramentas de busca, tal como o Mascot da Matrix Science, auxiliando na identificação dessas proteínas.

Este experimento foi realizado no equipamento espectrômetro de massa Autoflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics).

Abaixo, está mostrado o gel contendo as proteínas de estudo que foram utilizadas neste experimento. Nota-se, no campo apontado em vermelho, a presença de três bandas, sendo a maior de tamanho esperado para a proteína íntegra KRE2 de cerca de 49 kDa e as outras duas de menor tamanho (**Figura 22**)

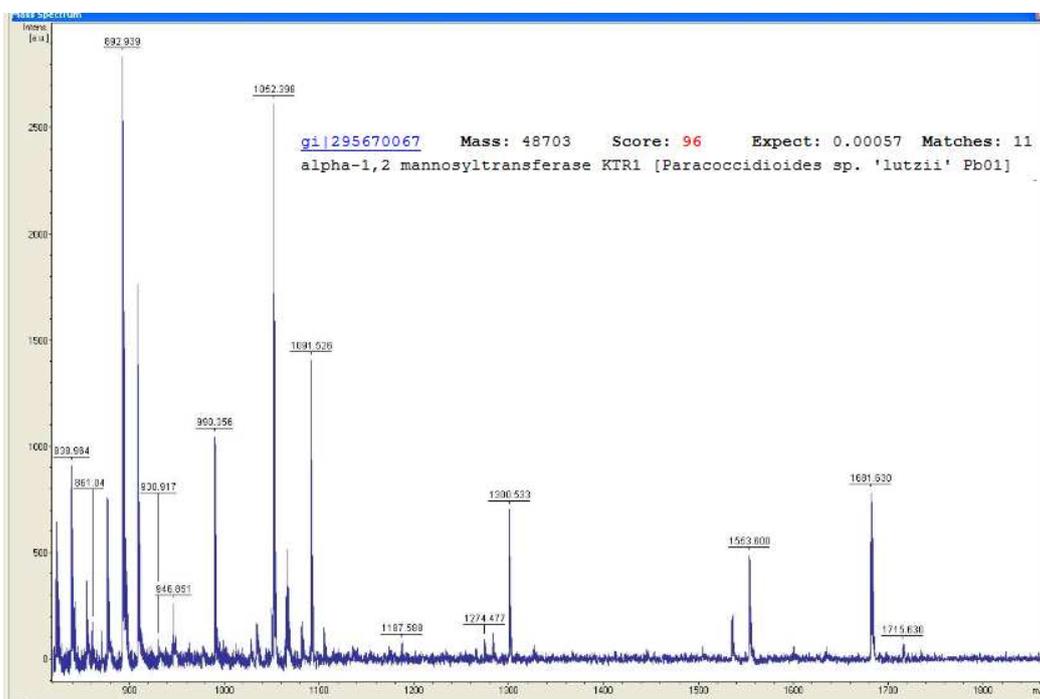


**Figura 22:** Análise de purificação em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12%: A seta mostra proteína de interesse. Campo circundado em vermelho evidencia a presença da proteína de interesse adicionada de mais duas outras de menor massa molecular. FT (*Flow-through*), W (*Wash*), E (*eluições*) SB sobrenadante antes da purificação.

Cada banda eluída do gel de poliacrilamida foi digerida e analisada por espectrometria de massa.

Nas três figuras que seguem (**Figuras 23, 24 e 25**), vemos os espectros de massa gerados, apresentando a proteína fragmentada em peptídeos. No eixo X, os espectros estão relacionados à razão massa/carga dos peptídeos gerados, e os valores dessa massa/carga estão situados logo acima de cada espectro. No eixo y, a intensidade de sinal de cada peptídeo. Os peptídeos encontrados conferem com o que tem sido depositado nos bancos de dados relacionados com a proteína  $\alpha$ -1,2 manosiltransferase de *P. lutzii*. A **FIGURA 23** representa a banda 1 e foi encontrado um *score* de 96%. Na **FIGURA 24** referente a banda intermediária, o score foi de 100%. Para a última (**FIGURA 25**) banda vista em gel a análise demonstrou um score de 126%.

As proteínas identificadas neste experimento apontaram para presença da mesma proteína em todas as bandas, a  $\alpha$ -1,2 manosiltransferase de *P. lutzii*, o que confirma que as duas bandas de menor tamanho correspondem à de degradação da proteína KRE2 e o mais importante é que o sistema de expressão em *E coli* funcionou adequadamente mas, que no entanto, a proteína estava sofrendo degradação, provavelmente durante o processo de indução.



**Figura 23:** Análise por espectrometria de massa da banda 1 vista em gel de poliacrilamida.

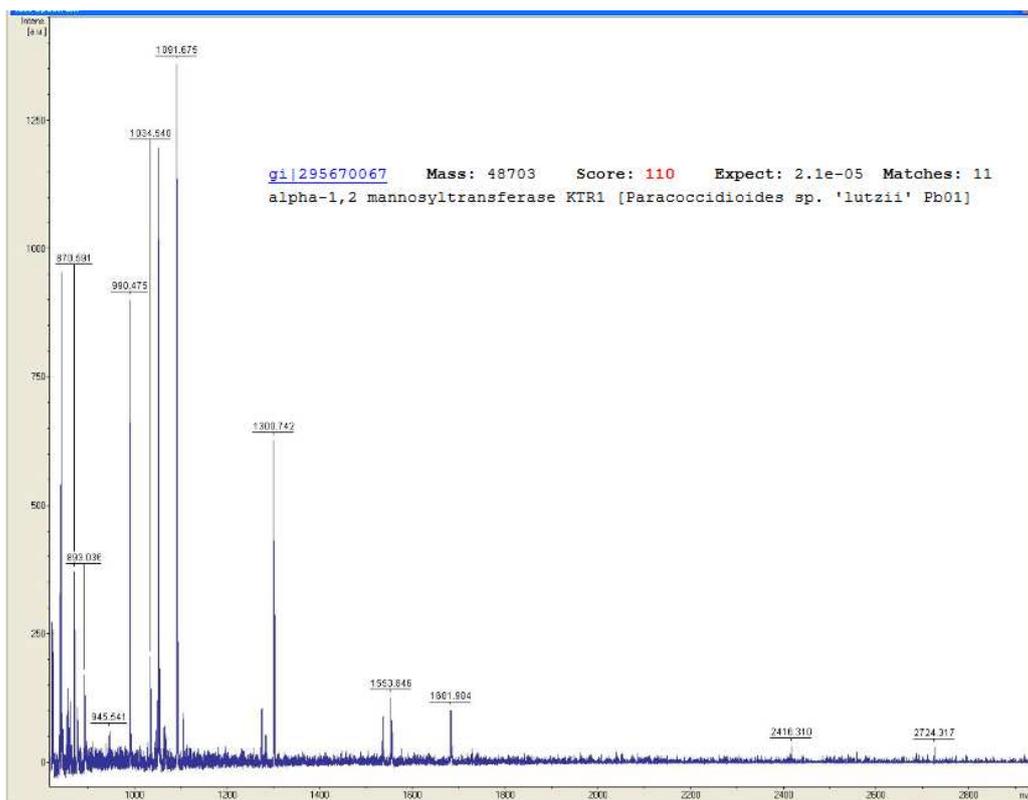


Figura 24: Análise por espectrometria de massa da banda 2 vista em gel de poliacrilamida.

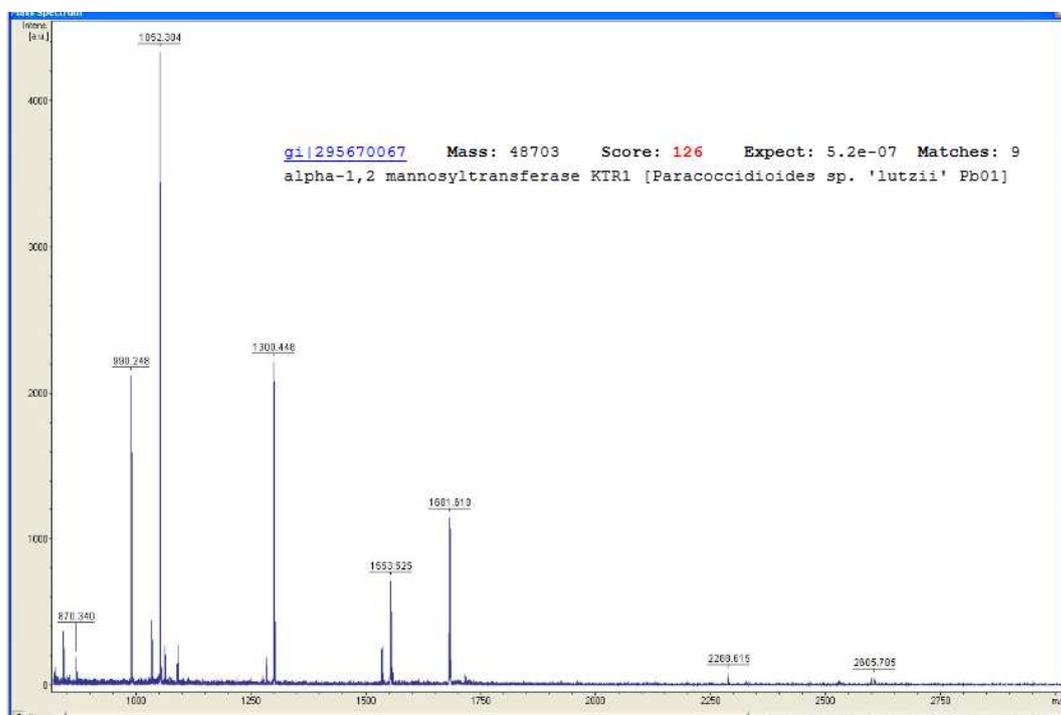


Figura 25: Análise por espectrometria de massa da banda 3 vista em gel de poliacrilamida.

Com a finalidade de aprofundar na investigação após a confirmação de degradação da proteína recombinante em estudo, foi realizado o cálculo da distância percorrida por cada banda vista em gel de poliacrilamida, com o objetivo de localizar a real massa molecular de cada uma. O objetivo desta etapa foi identificar sítios específicos de clivagem e assim, utilizar inibidores de proteases direcionados para essas regiões, possibilitando, a obtenção da proteína recombinante de trabalho com o mais alto nível de pureza, ou seja, livre de degradação.

Foi encontrado para cada banda referente:

Maior massa molecular: 48kDa

Massa molecular intermediária: 31kDa

Menor massa molecular: 24kDa

Os possíveis sítios de clivagem foram obtidos através do programa Expsy Peptide cutter ([http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/)) (FIGURA 26). Para os pontos onde ocorrem as clivagens, foram identificadas enzimas que podem estar atuando no processo de degradação da proteína (Tabela 5). A identificação destas proteases poderá auxiliar na produção da  $\alpha$ -1,2 manosiltransferase com pureza satisfatória, e assim, avançar na realização de experimentos de caracterização estrutural desta proteína por cristalografia e dicroísmo circular e resolução da estrutura 3D.

10	20	30	40	50	60
MALARPLRLL	LAFCFILSLF	LIFHVSQSPT	VLTAGKGRYD	NGLKRDPLLD	PTGEPPEPLW
70	80	90	100	110	120
RAKDDAYAPD	NPNSARINAT	LLVLVRNEEL	NELIMTMKDL	ERTWNSKFNY	PWTFNDKEF
130	140	150	160	170	180
TEEFKTRTQA	ETKAKCSYEL	IPKEHWDVPG	FINMDLYEES	SKILEENGVQ	YGSMMSYHQM
190	200	210	220	230	240
CRWNSGMFYK	HPALENVQYY	WRVEPKVHFF	CDVDYDVFRY	MQDHNKTYGF	TINLYDAPQS
250	260	270	280	290	300
IPTLWPQTLK	FLEAHPEHLH	KNNALDWLVD	NKQRPQHKN	ANGYSTCHFW	SNFEIADMSF
310	320	330	340	350	360
FRSKAYEDYF	NYLDLAGGFF	YERWGDAPVH	SIGLGLFEDK	GKIHWFRDIG	YQHVPYFNCP
370	380	390	400		
NSPKCKGCAP	GRFYAGDSSL	QLEDCRANWF	KYVGMDDHHH	HH	

Figura 26: Mapa proteolítico de KRE2. O mapa demonstra os possíveis sítios de clivagem da proteína.

**Tabela 5: Sítios de clivagem da proteína KRE2**

kDa	Aminoácido	Possíveis sítios de clivagem
48	140	Asp-N endopeptidase, Glutamil-endopeptidase, LysC, LysN, Pepsina pH 1,3, proteinase K, Tripsina.
31	200	Asp-N endopeptidase + N-terminal Glu, Arg-C proteinase, Clostripaína, ácido fórmico, Glutamil-endopeptidase, ácido iodoisobenzonico, LysN, Pepsina pH 1,3, proteinase K, termolisina, tripsina.

Fonte: Elaborada pela autora

## 6.2 Imunocitocalização

Utilizando a proteína produzida em *E. coli*, foram feitos os experimentos de imunocitocalização de KRE2 em *P. lutzi*. Para isto foi realizada a produção de anticorpos anti-KRE2 utilizando a proteína total mesmo degradada produzida em *E. coli*.

Anticorpos são imunoglobulinas que reconhecem epítopos de antígenos (proteínas) específicos. A produção de anticorpo de interesse envolve dentre algumas etapas, a inoculação da proteína antigênica em animais para a produção do anticorpo policlonal.

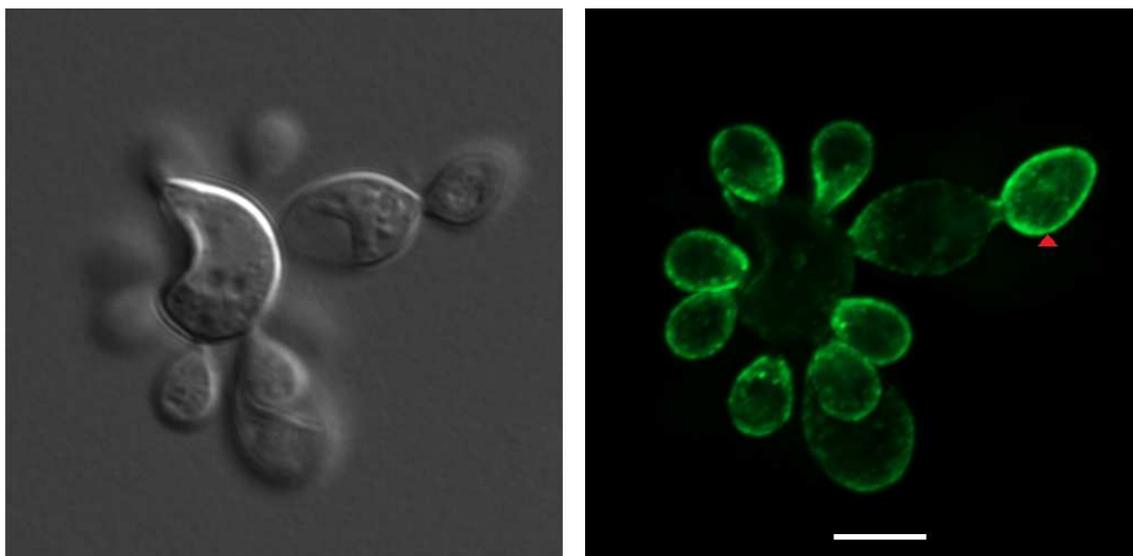
No trabalho em questão, com aprovação do comitê de ética, o anticorpo anti-KRE2 foi produzido em camundogos BALB/c respeitando os tempos como descrito na metodologia e em protocolo segundo Cooper e cols., (2008). O objetivo na produção do anticorpo policlonal contra KRE2 foi o de identificar sua localização celular no *P. lutzi*. A utilização da proteína KRE2 como um alvo molecular potencial para o desenvolvimento de novos antifúngicos pressupõe preferencialmente uma localização celular mais superficial, de modo a se ter uma possibilidade melhor de acesso da droga. Em um trabalho de colaboração com o Prof. Dr. André Nicola e sua aluna de doutorado Fabiana Oliveira, utilizando a proteína KRE2 recombinante obtida em *E. coli*, foi possível produzir o anticorpo desejado.

A coloração das lâminas se deu pela utilização de anticorpo anti-KRE2 que reage com o tecido em estudo e em outro momento, a adição de anticorpo secundário marcado com fluorescência. Para gerar as imagens, foi utilizado um microscópio Zeiss

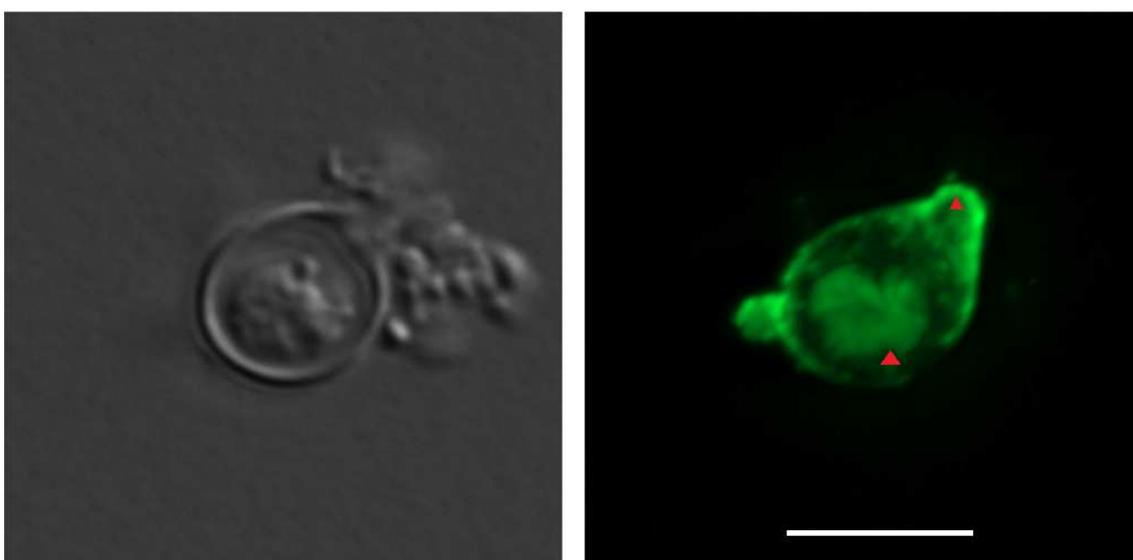
Axio Observer Z1 equipado com objetiva 63x NA 1.4 e câmera de CCD AxioCam MRm. As imagens foram processadas por deconvolução no software ZEN, da Zeiss.

A **Figura 27** mostra o resultado obtido da localização da proteína, a qual se encontra presente preferencialmente na superfície celular (**Figura 27A**), embora tenha sido observada também uma marcação mais dispersa no interior celular (**Figura 27B**).

A



B



**Figura 27: Imunocito-localização da proteína KRE2 em *P. lutzii*.** A) Mostra uma célula onde a coloração está restrita a parede celular. B) Salienta uma célula com marcação na parte interna e externa do conteúdo celular. Barra de escala corresponde a cinco  $\mu\text{m}$ .

Na primeira etapa do desenvolvimento deste trabalho utilizou-se o sistema de expressão heteróloga de *E. coli*. Fazendo uso desta estratégia foi possível atingir um dos objetivos deste trabalho que era a expressão da proteína KRE2 de *P. lutzii*, porém, obtida parcialmente purificada. Conforme demonstrado experimentalmente por *western blot* e confirmado por espectrometria de massa a proteína sofreu um processo de degradação.

Thomson e cols. 2000, afirmaram (dados não mostrados) que a MNT1 de *Candida albicans*, embora a expressão da proteína recombinante ocorra em altos níveis no sistema de expressão em *E. coli*, porém, a mesma estava inativa. Sendo assim, não seria possível alcançar o objetivo de obter uma proteína com atividade que pudesse ser utilizada nos experimentos de avaliação do potencial de inibição da atividade enzimática promovida pela molécula 3, selecionada por varredura virtual. Nem mesmo teríamos proteína ativa para futuros experimentos de cristalização e resolução da sua estrutura 3D.

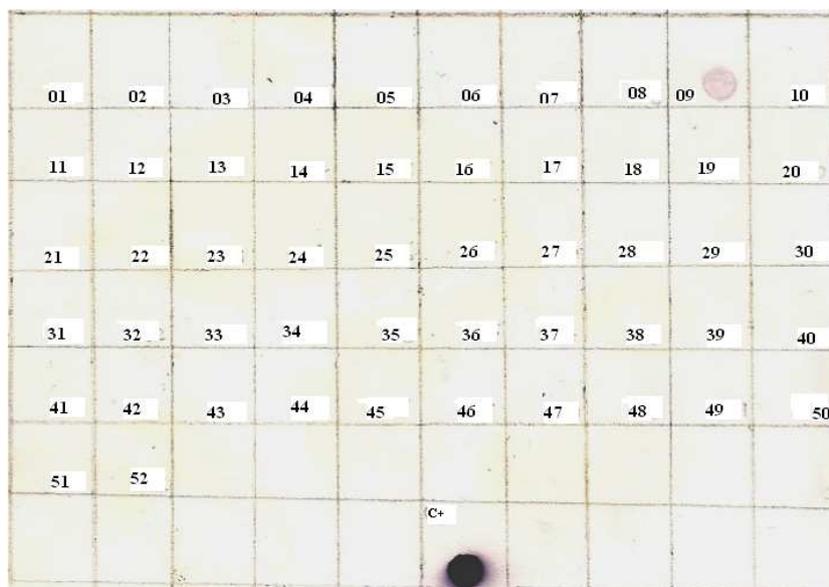
Entretanto, a proteína KRE2 produzida no sistema de expressão de *E. coli* foi utilizada para a produção de anticorpos anti-KRE2 e posteriormente empregada no ensaio de imunocitocalização. As imagens obtidas demonstraram que KRE2 localiza-se tanto na superfície celular quanto na parte interna da célula. A localização de KRE2 na superfície da parede celular demonstra ser um alvo molecular de fácil acesso para novos antifúngicos.

### **6.3 Expressão do gene *kre2* em *P. pastoris* usando vetor pPIC9**

A proposta de trabalhar com o sistema de expressão em *P. pastoris* para expressar o gene *kre2* baseou-se de acordo com a literatura, pois, tem sido utilizado como uma ferramenta de trabalho útil e eficiente (Romanos *et al.*, 1995). Adicionalmente, tem se mostrando uma técnica bem sucedida na produção de uma grande variedade de proteínas recombinantes entre as quais KRE2/MNT1 de outros organismos tais como de *C. albicans* (Lussier *et al.*, 1999; Diaz-Jiménez *et al.*, 2012) e *Ktr1* de *S. cerevisiae* (Lussier *et al.*, 1999). O gene sintético foi otimizado para *codon usage* em *P. pastoris* e clonado no vetor pPIC9 (**FIGURA 12**), que utiliza a Zeocina como marca de seleção.

Os clones obtidos por eletroporação foram submetidos à indução em placa do tipo *deep well* com finalidade de localizar um clone positivo após indução de 96h. A indução foi mantida adicionando diariamente metanol 0,5% como agente indutor.

A análise da indução em *deep well* foi realizada por *dot blot* do sobrenadante nos tempos de 72 horas e 96 horas, sendo o último a melhor indução. Observou-se indução da proteína apenas no clone 9 (**Figura 28**).

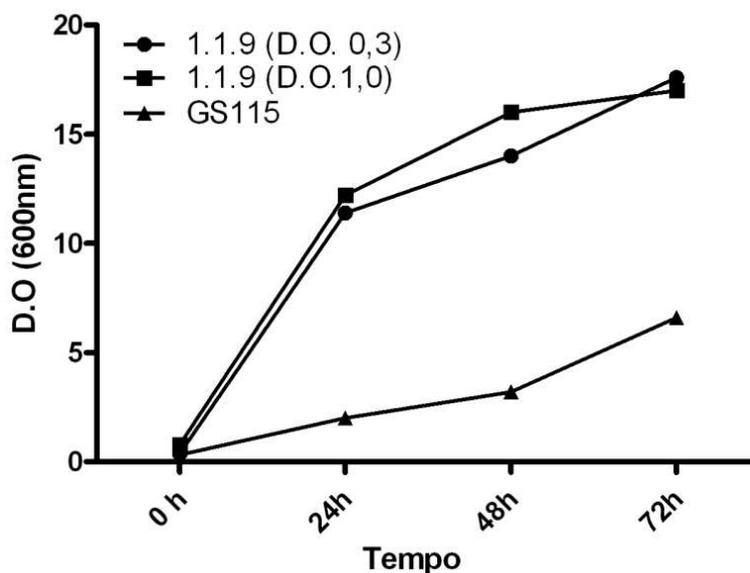


**Figura 28:** *Dot blot* do sobrenadante de 96 horas de expressão em *P. pastoris*. Indução da expressão do gene *kre2* em *P. pastoris* utilizando o vetor de expressão pPIC9. Clone positivo na posição 9.

Após a seleção do clone, por *dot blot*, foram realizadas as induções em frascos para obter uma maior quantidade de proteína recombinante. Foi possível observar presença de uma banda de aproximadamente 60kDa ao longo do tempo. No entanto, nos resultados de *western blot* não foi possível observar uma banda correspondente a este tamanho nem qualquer outra banda que pudesse sugerir uma dimerização, uma vez que o tamanho da banda esperada era de 49 kDa (dados não mostrados).

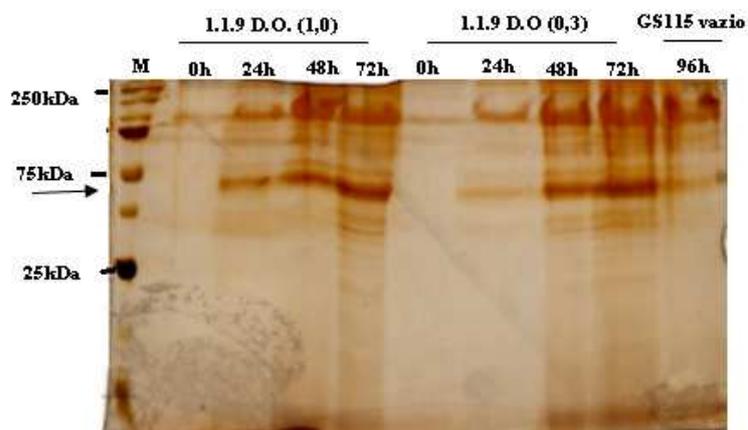
Nesta primeira indução utilizamos uma quantidade relativamente pequena de metanol (0,5% a cada 24 horas). Como *P. pastoris* apresentou um crescimento rápido, concluímos que possivelmente estas bandas deveriam ser proteases, que talvez pudessem estar degradando a proteína KRE2. Para otimizar os experimentos e analisar o melhor tempo de indução e conseqüentemente diminuir a ação de proteases, dois inóculos com D.O.<sub>600nm</sub> de 0,3 e 1,0 foram preparados no intuito de otimizar a quantidade ideal de inóculo para o início da indução. Um inóculo com a cepa de trabalho sem adição de vetor também foi utilizada e denominada de GS115. A

quantidade de metanol também foi alterada, sendo adicionado 1% de metanol a cada 24 horas. O sobrenadante dos tempos de 0h, 24h, 48h, 72h de indução foram coletados e analisados. A cada tempo de indução foi determinado a D.O. para avaliar o perfil de crescimento durante a indução. Observou-se que para o inóculo inicial menor (D.O.<sub>600nm</sub> inicial de 0,3), no tempo de 72h a quantidade de células era aproximadamente o mesmo quando comparado ao inóculo inicialmente maior (D.O.<sub>600nm</sub> inicial de 1,0) (**Figura 29**).



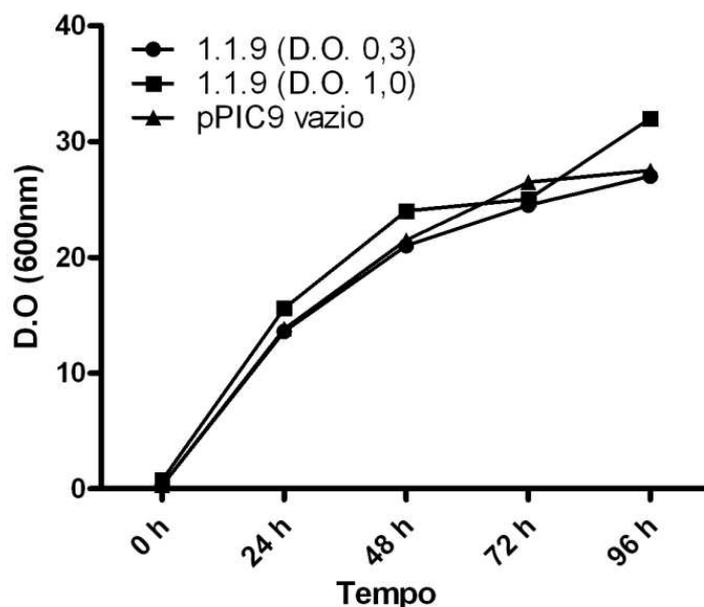
**Figura 29:** Curva de crescimento dos tempos 0h, 24h, 48h, 72h de indução em *P. pastoris*. Foi adicionado 1% de metanol a cada 24 horas e coletado o sobrenadante para análise.

O padrão de bandas obtido em gel de poli-acrilamida durante os tempos de indução independente do inóculo inicial utilizado, mostraram-se menos densas na altura de ~60kDa, sugerindo uma diminuição da ação de proteases (**Figura 30**). No entanto, nos experimentos de *western blot*, não foram detectadas bandas quando utilizado anticorpo anti-polyHis.

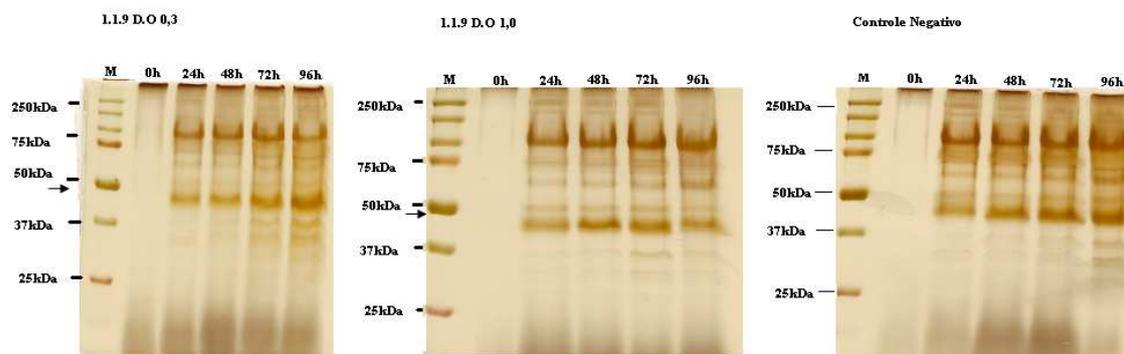


**Figura 30:** Análise da indução em frascos de *P. pastoris* transformada com pPIC9 ::*kre2* em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % após 72 horas de indução com zeocina. Foram coletadas a cada 24 horas, frações de indução dos inóculos com D.O.<sub>600nm</sub> de 0,3 e 1,0. A cada 24 horas foram adicionados 1% de metanol a cultura. As bandas com diminuição da ação de protease são indicadas por uma seta. (M) Marcador de massa molecular *Precision Plus Protein Standards* (BIORAD).

Em outro momento realizou-se a adição de metanol duas vezes ao dia, sendo 1% a cada manhã e 0,5% no fim de cada tarde. Nota-se que o crescimento do inóculo inicial maior (D.O.<sub>600nm</sub> inicial de 1,0) foi ligeiramente maior em relação ao inóculo inicial menor (D.O.<sub>600nm</sub> inicial de 0,3) e ao controle (**Figura 31**). Nesta etapa de otimização, sugere-se que o aumento da quantidade de metanol nas induções, resultou na diminuição da quantidade de protease (**Figura 32**). No entanto, as bandas visíveis em gel de poliacrilamida eram semelhantes ao controle negativo e os resultados de *western blot* continuavam negativos.



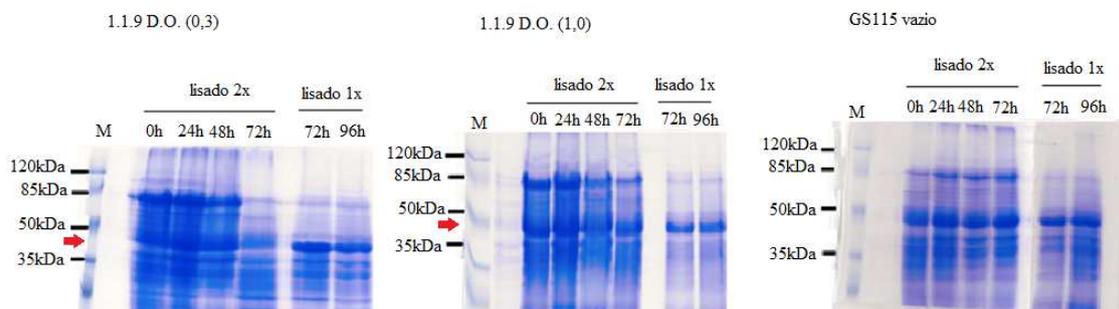
**Figura 31:** Curva de crescimento dos tempos 0h, 24h, 48h, 72h, 96h de indução em *P. pastoris*. Foi adicionado 1% de metanol a cada manhã e 0,5% no fim de cada tarde. Para análise foram coletados os sobrenadantes.



**Figura 32:** Análise da indução em frascos de *P. pastoris* transformada com pPIC9 ::*kre2* em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % após 96 horas de indução com zeocina. Foram coletadas frações de indução dos inóculos com D.O.<sub>600nm</sub> de 0,3 e 1,0 e do controle negativo nos tempos de 0h, 24h, 48h, 72h, 96h. Foi adicionado a cultura 1% de metanol a cada manhã e 0,5% no fim de cada tarde. São indicadas por uma seta as bandas com diminuição da ação de protease. (M) Marcador de massa molecular *Precision Plus Protein Standards* (BIORAD)

O grande objetivo do sistema de expressão em *P. pastoris* é a secreção da proteína recombinante para o meio de cultura. Portanto, as análises utilizando o sobrenadante livre de células não foram satisfatórias. Sendo assim, foi realizada a análise dos *pellets* da indução, para averiguar se a proteína recombinantes poderia estar sendo expressa, porém não sendo secretada. Desta forma, os *pellets* foram lisados utilizando uma solução preparada com 10 mL de tampão *Complete Lysis-Y* adicionado

de uma pastilha de inibidor de protease. Cada *pellet* sofreu duas lises. O sobrenadante resultante de cada lise foi coletado e analisado em gel de poliacrilamida e corado por *Comassie blue* (Figura 33).



**Figura 33:** Análise de *pellets* de indução em frascos de *P. pastoris* transformada com pPIC9 ::*kre2* em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % com uso de inibidores de protease. Foram coletados os sobrenadantes provenientes de duas lises com tampão *Complete Lysis-Y*. As setas indicam o padrão de bandas. (M) Marcador de massa molecular *Prestained Protein Weight Marker* (Fermentas).

Sendo assim, o sistema de expressão em *P. pastoris*, mesmo sendo considerado como um bom sistema de expressão, não está isento de dificuldades e desvantagens (Romanos *et al.*, 1995). Nesta situação, nos deparamos com alguns obstáculos na produção da proteína recombinantes, tais como o aparecimento de bandas muito densas em géis de poliacrilamida nos primeiros experimentos, o que foi melhorado ao longo do tempo devido ao aumento da fonte de carbono disponibilizadas diariamente. Em virtude da alta concentração celular em frasco, a disponibilidade de 1,5% de metanol ao invés de 0,5% foi positivo, porém, diversas dificuldades em detectar a proteína recombinante KRE2 persistiram de forma que não foi possível definir se não houve de fato a expressão da proteína KRE2 recombinante utilizando o vetor pPIC9 ou se o rendimento era demasiadamente baixo.

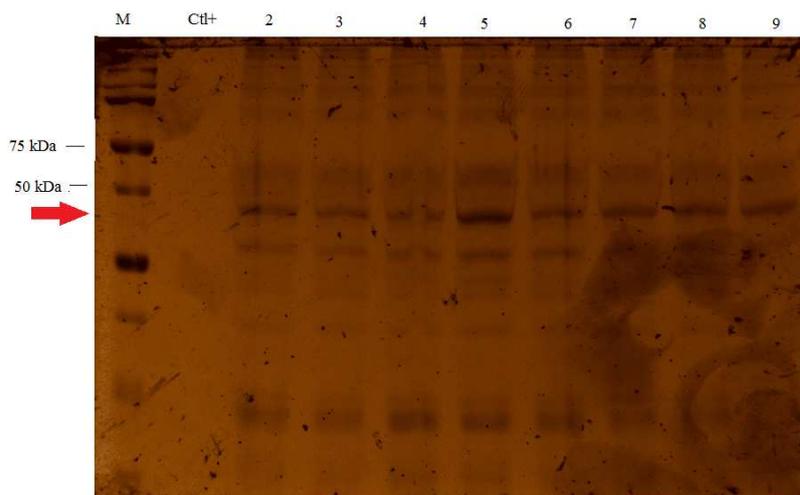
Devido às dificuldades apresentadas ao longo do desenvolvimento do trabalho, foi estabelecida uma colaboração com um grupo de pesquisa da Universidade de Guanajuato no México, coordenado pelo Prof. Dr. Héctor Manuel Mora Montes, o qual tem trabalhos publicados com manosiltransferases de *Candida spp.* e *S. schenkii.*, além de possuírem protocolos otimizados para expressão em *P. pastoris* bem como os testes de atividade enzimática. Na ocasião da colaboração foi sugerido que o trabalho de expressão do gene *kre2* fosse realizado novamente em *P. pastoris*, o que já tinha realizado aqui no Brasil mas, infelizmente sem sucesso. Este trabalho de colaboração teve duração de 4 meses no México para realização de toda a parte experimental. O

trabalho realizado por mim e sob supervisão do Prof. Dr. Héctor Mora Montes, contou com o auxílio do seu aluno de doutorado Nahum Hernandez Valente. Nesta etapa foi utilizado o vetor integrativo pPICZ $\alpha$ A (**FIGURA 13**) para a obtenção da proteína KRE2 recombinante no sistema de expressão de *P. pastoris*.

#### 6.4 Expressão do gene *kre2* em *P. pastoris* usando vetor pPICZ $\alpha$ A

Além da expressão e purificação, outro importante objetivo deste trabalho foi a caracterização da atividade enzimática da proteína KRE2 recombinante. A proteína foi produzida no sistema de expressão heteróloga de *P. pastoris*, usando como vetor de expressão o pPICZ $\alpha$  A (**Figura 13**). O gene foi otimizado com *códons usage* para *P. pastoris* e sintetizado pela empresa Genone Biotechnologies. Foi retirada a sequência de nucleotídeos equivalente à pequena porção citoplasmática e porção transmembranar da proteína. Desta forma, para a expressão heteróloga foi selecionada somente a sequência de aminoácidos equivalente a porção solúvel da proteína, correspondente do aminoácido 27 ao 411. Foi adicionado ao gene a sequência de nucleotídeos equivalente a cauda de 6 histidinas para detecção da proteína por métodos de cromatografia de afinidade. A **Figura 15A** mostra a sequência de aminoácidos destacando as porções citoplasmática e transmembranar, enquanto na **Figura 15B** é mostrado a sequência de nucleotídeos utilizada para síntese do gene *kre2* otimizada para *P. pastoris* com objetivo de obtenção da proteína recombinante somente com a porção solúvel.

O gene sintético foi linearizado com a enzima Sac I e a transformação ocorreu por eletroporação em *P. pastoris*, linhagem X-33, utilizando o vetor pPICZ $\alpha$ A que é integrativo. Os clones resultantes foram submetidos à PCR, com o objetivo de selecionar quais integraram o plasmídeo no DNA genômico (dados não mostrados). Do total dos clones testados dez foram positivos por PCR. Foi realizada então uma indução teste com os dez clones para avaliar a expressão e assim, eleger o melhor clone para trabalho (**Figura 34**).



**Figura 34:** Análise de expressão do gene *kre2* usando vetor pPICZa A, em gel de poliacrilamida 12%. Seta mostra a expressão da proteína em 8 clones diferentes, estando um pouco abaixo de 50kDa.

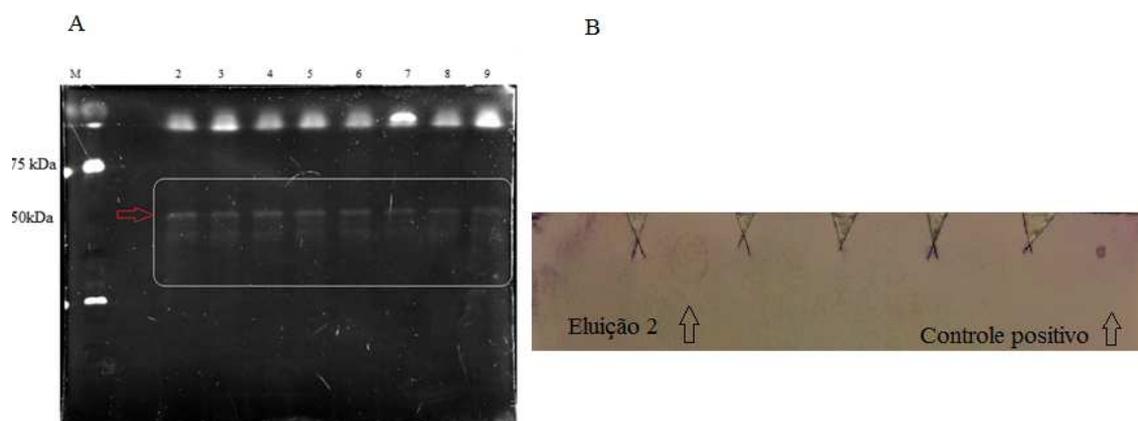
Para assegurar que de fato os clones eram positivos, foi realizado um *dot blot*, o qual para detecção de expressão utilizou-se anticorpo anti-His. Em paralelo, foi empregado outra metodologia para detecção, e na ocasião foi usado o corante *In Vision In-Gel Stain*. Este corante tem uma propriedade fluorescente conjugado ao níquel, que por sua vez tem alta afinidade por proteínas com cauda de 6 histidinas, sendo capaz de detectar quantidades de proteína a partir de 0,5 picomol no comprimento de onda de 302nm. Todos os clones foram positivos para expressão da proteína recombinante (**Figura 35**).



**Figura 35:** Análise da proteína recombinante KRE2 por *Dot blot* e corante *In Vision In-Gel Stain*. A) *Dot blot* de extrato bruto. Seta vista corresponde ao controle positivo. B) Análise de indução de 96h de KRE2 em gel de poliacrilmida 12%, corado com *In Vision In-Gel Stain*. Em gel, seta mostra proteína KRE2 com massa molecular de 49 kDa e, logo abaixo, bandas de menor massa molecular.

Os resultados mostrados na **Figura 35 e 36** indicam que a expressão do gene *kre2* foi realizada com sucesso em *P. pastoris*, quando foi utilizado o vetor integrativo pPICZαA, o que não ocorreu nos experimentos iniciais deste trabalho quando foi feita a tentativa de expressão em *P. pastoris* usando o vetor replicativo pPIC9. Nas **Figuras 35A e 36A**, notam-se a presença de bandas positivas correspondentes a proteínas com cauda de 6 histidinas, que podem ser proteínas da própria *P. pastoris* ou ainda de novo resultante de degradação da KRE2, a semelhança do que ocorreu no sistema de *E. coli*. Objetivando reduzir a quantidade de contaminantes, o extrato bruto obtido e livre de células foi submetido a purificação em filtro Amicon de 30 kDa. Após o processo de “semi purificação”, houve uma importante melhora na qualidade do material em estudo, o que pode ser visto na **Figura 36A**, embora ainda continue apresentando bandas menores de possível degradação. Todo o processo de manipulação da proteína foi realizado em baixa temperatura, pois, como trata-se de uma enzima, esta poderia perder sua atividade. A outra etapa da purificação foi realizada por cromatografia de afinidade e contou com a utilização de colunas de cobalto e níquel, onde foram utilizadas as concentrações variadas de imidazol, com a finalidade de localizar o ponto ótimo de eluição da proteína. Porém, o único resultado alcançado e visível foi em coluna de

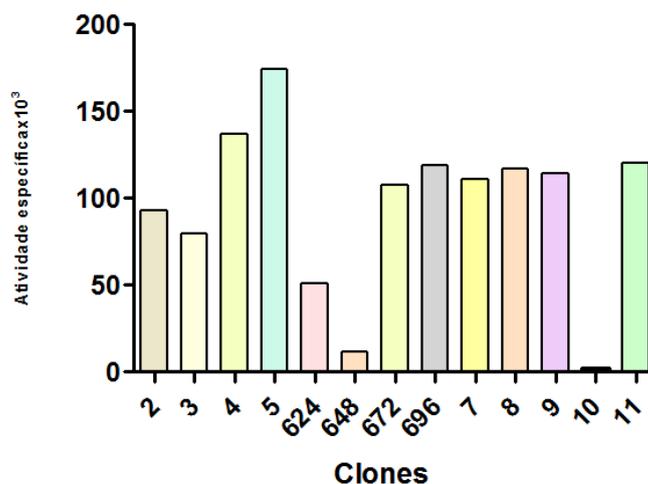
níquel, visto na eluição 2 (**Figura 36B**). A grande problemática nesta etapa de visualização da proteína pode estar relacionada ao baixo rendimento.



**Figura 36: Análise da proteína recombinante por Amicon 30µm e purificação em coluna de Níquel.** (A) Purificação com Amicon 30µm, visualizado em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12%. (B) Purificação com coluna de Níquel, amostra vista na eluição 2. Setas indicam eluição 2 e controle positivo, respectivamente.

Para ter segurança de estar trabalhando com um clone efetivamente positivo, os dez clones foram submetidos a um ensaio de atividade enzimática (**FIGURA 37**). A partir do meio de cultura livre de células, chamado de extrato bruto, todas as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (NANODROP 2000 da *Thermo Scientific*) em comprimento de onda de 280nm, para padronizar a quantidade da proteína em cada reação. Para o clone seis, o ensaio de atividade enzimática foi realizado nos tempos de 24h, 48h, 72h, e 96h, pois aparentemente esse clone era o mais promissor conforme observado nos géis de poliacrilamida. O propósito de avaliar todos os tempos seria para o caso de utilizar um bom clone, diminuir o tempo de indução, ou seja, otimizar as condições de indução. Em contrapartida, o clone cinco foi selecionado por ser o clone com maior atividade específica (**Figura 37**). O nível de expressão heteróloga de KRE2 foi considerado baixo, tendo um rendimento de 1,8 mg da proteína secretada por litro de meio de cultura, em tempo de indução de 96h. O cálculo da atividade específica foi realizado e expresso em  $\text{cmp}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

### Clones com Atividade Enzimática



**Figura 37:** Teste de atividade enzimática com extrato total de dez clones. Clone 6 analisado nos tempos de 24h, 48h, 72h, 96h. Em azul, clone 5. Atividade específica determinada por cmp/min/mg de proteína.

Para avaliar o perfil cinético da enzima KRE2 recombinante de *P. lutzii*, a reação foi preparada como descrito na metodologia e incubada a 28°C por 24h. Foi utilizada GDP-manose marcada com [<sup>14</sup>C] para detecção da atividade enzimática. O [<sup>14</sup>C] emite partículas de radiação do tipo beta ( $\beta$ ), e demanda certos cuidados de manipulação, como todo material radioativo.

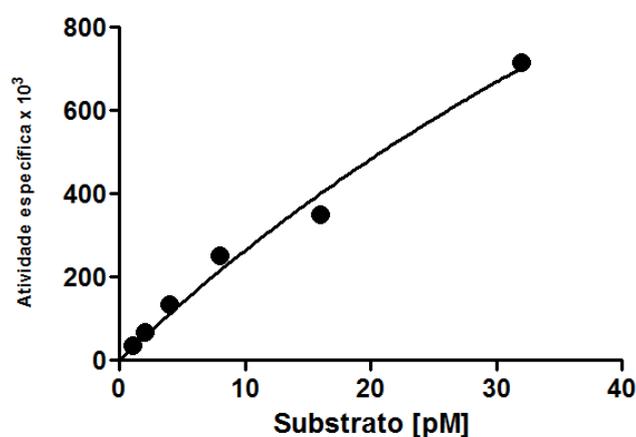
Lobsanov (2004) propôs um modelo de reação entre a enzima KRE2/MNT1 de *S. cerevisiae* associada ao doador e ao acceptor (**FIGURA 16**). No modelo proposto foi demonstrado a participação de KRE2/MNT1 na transferência de manose da GDP-manose para um  $\alpha$ -manosídeo, como receptor, que pode ser uma  $\alpha$ -manose, metil-  $\alpha$ -manose,  $\alpha$ -1,2-manobiose, metil-  $\alpha$ -1,2-manobiose.

Neste trabalho, a GDP-manose marcada com [<sup>14</sup>C] foi utilizada como substrato na reação, nas concentrações de 1pM, 2pM, 4pM, 8pM, 16pM e 32pM. O ensaio de atividade enzimática foi realizado conforme descrito por Nakijama e Ballou (1975). A técnica enzimática se baseia na utilização de GDP-manose como doador e metil-  $\alpha$ -D-manopiranosídeo (exemplo de bom acceptor) resultando na formação do produto metil-2- $\alpha$ -D-manopiranosil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo (Nakijama e Ballou, 1975),  $\alpha$ -1,2-manosil-manosídeo (Lobsanov *et al.*, 2004). Para a determinação dos parâmetros cinéticos foi utilizado o programa GraphPad Prism. Na ocasião, não se atingiu o ponto de saturação da enzima, o que ocasionou a formação de uma discreta hipérbole (**Figura 38A**). Entretanto, esses dados foram usados na construção do gráfico de duplo-recíproco de

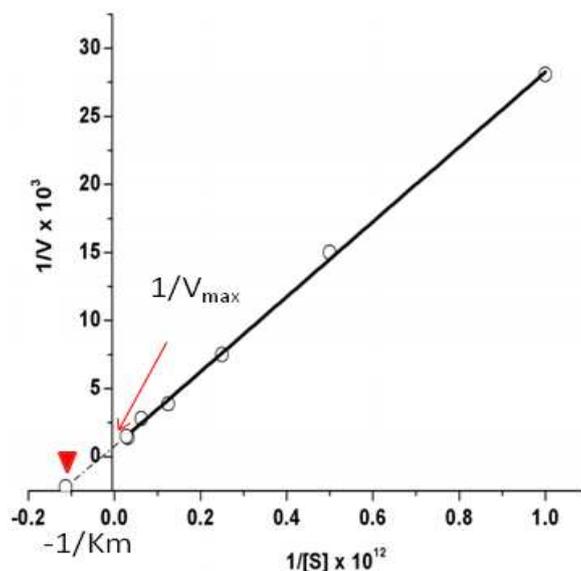
Lineweaver-Burk (**Figura 38B**). O  $K_m$  aparente foi de 3,7pM. Thompson e cols. (2000) determinaram os parâmetros cinéticos de MNT1 de *C. albicans* como sendo o  $K_m$  55 $\mu$ M e  $V_{max}$  86.2 pmol/min/mg de proteína. Para a determinação dos parâmetros cinéticos de KRE2/MNT1 de *S. cerevisiae*, Lobsanov e cols. (2004) obtiveram um  $K_m$  aparente de 0,024mM. Levando em consideração os valores de  $K_m$  obtidos por esses autores, pode-se inferir que a enzima KRE2 de *P. lutzii* aparentemente demonstra ter uma alta afinidade pelo substrato GDP-manose (**Figura 38**).

A

## Ensaio de atividade enzimática



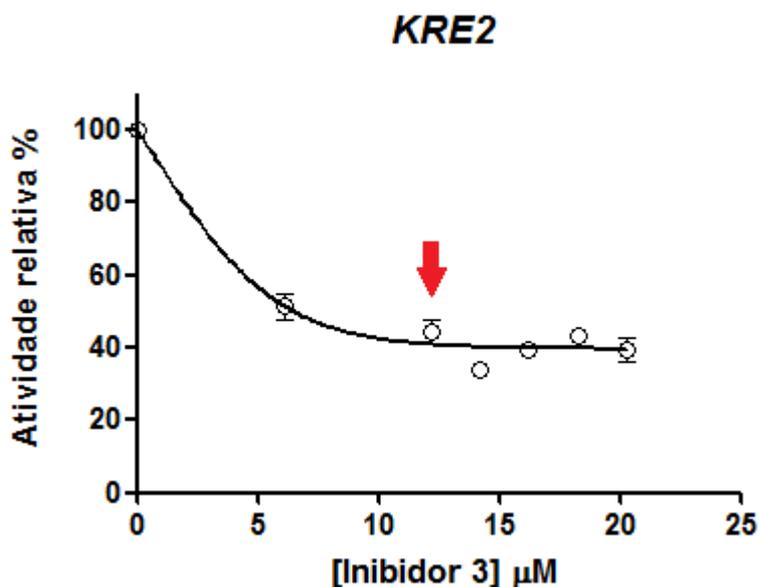
B



**Figura 38: Análise de atividade enzimática da proteína recombinante KRE2.** A) Ensaio de atividade enzimática com variação da concentração do substrato. Substrato foi utilizado nas concentrações de 1pM, 2pM, 4pM, 8pM, 16pM, e 32pM. B) Duplo recíproco de Lineweaver-Burk. O valor do  $K_m$  aparente da reação foi de 3,7pM ( $-1/K_m$ ). Seta demonstra o  $V_{max}$  aparente. Atividade específica foi determinada por  $\mu$ mol/min/mg de proteína.

Objetivando a busca por novos compostos que efetivamente possam inibir a atividade enzimática da  $\alpha$ -1,2 manosiltransferase, a partir dos compostos selecionados por varredura virtual foi realizado o ensaio de atividade antifúngica *in vitro*. Os compostos utilizados, foram testados contra de *P. lutzii* (Pb01), 2 isolados de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265), *C. albicans* (ATCC 90028), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. neoformans* (H99). Dos 17 compostos analisados, 4 apresentaram atividade antifúngica em pelo menos 3 fungos. Dentre as 4 moléculas que apresentaram atividade antifúngica, a molécula 3 foi considerada como um bom MIC contra as espécies de *Candida spp.*, porém, mais alto que em *P. lutzii*. (Abadio *et al.*, dados ainda não publicados). Apesar da molécula 3 ter sido selecionada baseada na interação com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo de KRE2 de *P. lutzii*, um alinhamento das sequências de aminoácidos de outros fungos mostrou os domínios catalíticos conservados da proteína KRE2. Realizado os ensaios de atividade antifúngica *in vitro*, a molécula 3 foi então selecionada para ser empregada em testes de inibição de atividade enzimática com a proteína KRE2 após processo de purificação. Considerada como a melhor molécula foi então, utilizada nos ensaios de inibição com KRE2 de *P. lutzii* e MNT1 de *C. albicans*. Em colaboração com o grupo de pesquisa no México sob supervisão do Prof. Dr. Héctor Mora foi possível a realização dos ensaios de inibição enzimática utilizando as enzimas KRE2 de *P. lutzii* e MNT1 de *C. albicans*.

Nos testes de inibição da enzima, o primeiro ponto da curva, a atividade enzimática foi considerada 100% e representa a atividade da proteína na ausência de inibidor. Quando na presença da molécula 3, foi observada uma inibição da atividade enzimática de KRE2 de até 60% na concentração de 12,18 $\mu$ M (**Figura 39**). Os demais pontos são representados por diferentes concentrações do inibidor capazes de reduzir a atividade enzimática de KRE2 de *P. lutzii*. No ensaio de susceptibilidade de *P. lutzii* com a molécula 3 realizado por Abadio e cols. (2011), o MIC<sub>50</sub> foi de 16,2 $\mu$ M, enquanto que no ensaio enzimático de inibição da atividade enzimática de KRE2 foi encontrada a concentração de 12,18 $\mu$ M da molécula 3 capaz de reduzir a atividade da enzima em até 60%. Desta forma, valida-se que de fato a molécula 3 inibe a atividade da proteína alvo e apesar das drogas de referência, Anfotericina B e Fluconazol terem um MIC inferior, 0,54 $\mu$ M e 1,6 $\mu$ M respectivamente (Abadio *et al.*, 2011), confirma-se a grande eficiência antifúngica deste composto como observado nos testes de cultura *in vitro*.

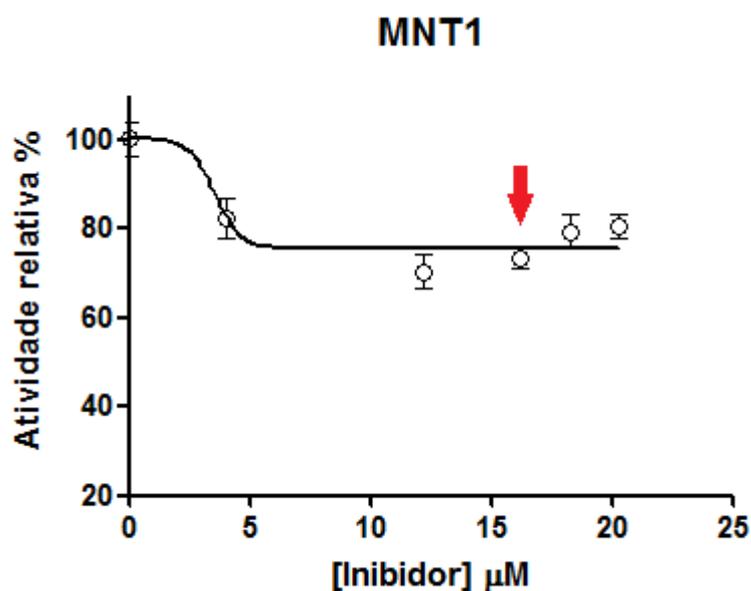


**Figura 39: Teste de inibição de atividade enzimática de KRE2 pela molécula 3.** Molécula 3 utilizada para teste de inibição enzimática. Ponto 1 na curva representa a atividade da enzima na ausência de molécula inibidora com atividade em 100%. Os outros 6 pontos representam as concentrações do inibidor que foram utilizadas, nesta ordem: 2) 6,09μM, 3) 12,18μM, 4) 14,21μM, 5) 16,24μM, 6) 18,27μM, 7) 20,3μM.

Além do ensaio de inibição da enzima KRE2 de *P. lutzii*, também foi realizado um teste de inibição enzimática de MNT1 de *C. albicans* pela molécula 3. Os resultados mostram uma inibição de cerca de 20% utilizando a concentração de 16μM da molécula inibidora (**Figura 40**). No ensaio de susceptibilidade de *C. albicans* com a molécula 3 realizado por Abadio e cols. (2011), O MIC<sub>90</sub> foi de 129μM enquanto que no ensaio de inibição da atividade da enzima MNT1, foi encontrada a concentração de 16μM da molécula capaz de inibir a atividade desta enzima em até 20%. Para as drogas de referência Anfotericina B e Fluconazol contra a cepa de *C. albicans*, o MIC<sub>80</sub> encontrado foi de 0,54μM, >51,2 respectivamente (Abadio *et al.*, 2011).

A expectativa de inibição da atividade de MNT1 não foi tão eficiente quanto em KRE2. Durante os experimentos realizados, foi observado que a molécula 3 apresenta problemas de solubilidade em altas concentrações. A partir de uma inspeção macroscópica das amostras contendo a molécula 3 nas concentrações utilizadas no ensaio enzimático, não foi possível verificar formação de precipitado, porém, ao analisar microscopicamente, observou-se a presença de pequenos cristais. Diante disso, tem-se a necessidade de melhorar a solubilidade da molécula 3 para garantir a realização de ensaios de inibição da atividade enzimática com concentrações exatas. Com a finalidade de melhorar a solubilidade deste inibidor foi testada a associação da

molécula 3 ao Pluronic F-127. Este composto é um surfactante que tem sido utilizado para auxiliar na solubilização de compostos insolúveis em água. Como o preparo da molécula 3 é feito em solução aquosa, a associação deste reagente à molécula em estudo poderá aumentar sua disponibilidade em solução. Desta forma, em estudos recentes do nosso grupo, utilizando cepas de *Candida spp.* (dados não mostrados) foi possível verificar um aumento significativo no potencial de inibição desta molécula associada ao Pluronic F-127. Sendo assim, tem-se a expectativa de definir uma concentração mínima inibitória mais baixa da molécula 3. Neste caso, será necessária a realização de novos testes para avaliar o perfil de inibição da molécula 3 com melhor solubilidade nos diversos fungos, já que em *C. albicans* os resultados foram animadores nesta condição experimental.



**Figura 40: Teste de inibição de atividade enzimática de MNT1 pela molécula 3.** Molécula 3 utilizada para teste de inibição enzimática. Ponto 1 na curva representa a atividade da enzima na ausência de molécula inibidora com atividade em 100%. Os outros 6 pontos representam as concentrações do inibidor que foram utilizadas, nesta ordem: 2) 4,06 $\mu\text{M}$ , 3) 12,18 $\mu\text{M}$ , 4) 16,24 $\mu\text{M}$ , 5) 18,27 $\mu\text{M}$ , 6) 20,3 $\mu\text{M}$ .

Levando em consideração que a molécula 3 possivelmente interage no sítio catalítico da proteína alvo  $\alpha$ -1,2 manosiltransferase, foi realizado um alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas KRE2 e MNT1, para avaliar a conservação desses resíduos do sítio catalítico das duas manosiltransferases (**Figura 41**). As



A partir do programa *Disulfide by design* (<http://cptweb.cpt.wayne.edu/DbD2/>) foi realizada a busca de pontes dissulfeto nas proteínas KRE2 e MNT1. As pontes dissulfeto realizam um importante papel na manutenção da conformação estrutural e estabilidade de algumas proteínas extracelulares e proteínas secretadas (Douglas e Alan, 2013). Desta forma, o objetivo foi buscar alguma mudança conformacional entre as duas proteínas que justificasse a variação na taxa de inibição da atividade enzimática de MNT1 pela molécula 3. Foi descrito por Lobsanov e cols. (2004) que MNT1 de *S. cerevisiae* possui três pontes dissulfeto entre os resíduos Cys254-Cys406, Cys322-Cys421, e Cys394-Cys408 que parecem ajudar na estabilidade do subdomínio C-terminal da proteína. Em relação a KRE2 de *P. lutzii*, de forma semelhante a MNT1 foram encontradas três pontes dissulfeto, porém, entre os resíduos Cys193-Cys291, Cys223-Cys363 e Cys377-Cys390. Desta forma, KRE2 e MNT1 têm muitas semelhanças, porém, uma variação na conformação estrutural da proteína MNT1 pode ser um fator que justifique a baixa inibição da atividade enzimática desta proteína pela molécula 3, e por fim, outro fator que possa estar relacionado e/ou associado, seria a solubilidade da molécula que deve ser melhorada para ser utilizada em novos testes .

De modo a avaliar uso de cofatores, está descrito na literatura a necessidade de KRE2/MNT1 utilizar o íon metal  $Mn^{2+}$  como cofator na regulação da atividade enzimática desta manosiltransferase (Lobsanov *et al.*, 2004, Díaz-Jimenez *et al.*, 2012). Os íons metálicos são elementos essenciais para manter o funcionamento celular, pois, têm grande participação em inúmeros processos metabólicos, tais como no metabolismo de DNA, regulação da síntese protéica e no processamento pós-transcricional da maioria das proteínas. Desta forma, Díaz-Jimenez e cols. (2012) avaliaram o comportamento de MNT1 de *C. albicans*, utilizando os íons  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ , para determinar atividade enzimática da proteína MNT1. Foi observado ausência de atividade enzimática quando o íon metal  $Mn^{2+}$  não foi adicionado à reação, demonstrando que a proteína MNT1 é dependente de  $Mn^{2+}$ . Além do íon  $Mn^{2+}$ , MNT1 mostrou ser capaz de utilizar o  $Co^{2+}$  como cofator, e em menor porcentagem pode usar o  $Ca^{2+}$ . Para os demais íons, não houve atividade enzimática (**Figura 42**).

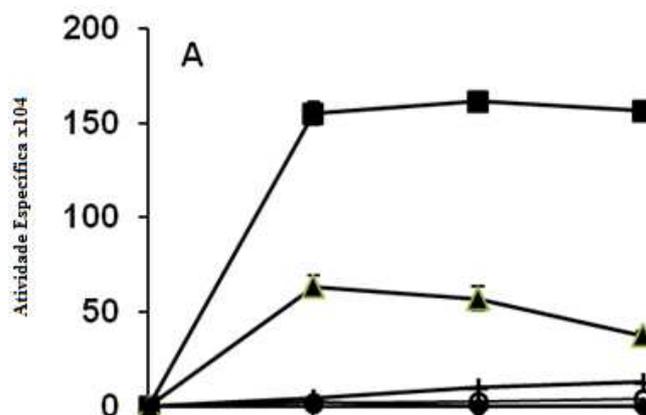


Figura 42: Efeito dos íons na atividade enzimática da proteína recombinante MNT1. Retirado do material suplementar de Díaz-Jimenez *et al.*, 2012. ■ Mn<sup>2+</sup>, ▲ Co<sup>2+</sup>, ○ Ca<sup>2+</sup>, ◊ Mg<sup>2+</sup> e ◆ Zn<sup>2+</sup>.

De forma semelhante, esses íons foram avaliados no presente trabalho. Para averiguar semelhanças entre MNT1 e KRE2 em relação à necessidade da utilização de outros cofatores, KRE2 de *P. lutzii*, foi submetida à análise enzimática em presença dos íons Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>. As reações foram preparadas conforme descrito em métodos, porém os íons foram adicionados separadamente. A atividade enzimática foi determinada (duas triplicatas). O íon Mn<sup>2+</sup> serviu como controle positivo de atividade enzimática. Observou-se nesta etapa uma diferença entre KRE2 e MNT1. KRE2 foi capaz de utilizar todos os íons metais como cofator, sendo o cobre com a menor afinidade (Figura 43). Esses dados podem estar relacionados a características intrínsecas ao patógeno específico, no caso *P. lutzii*.

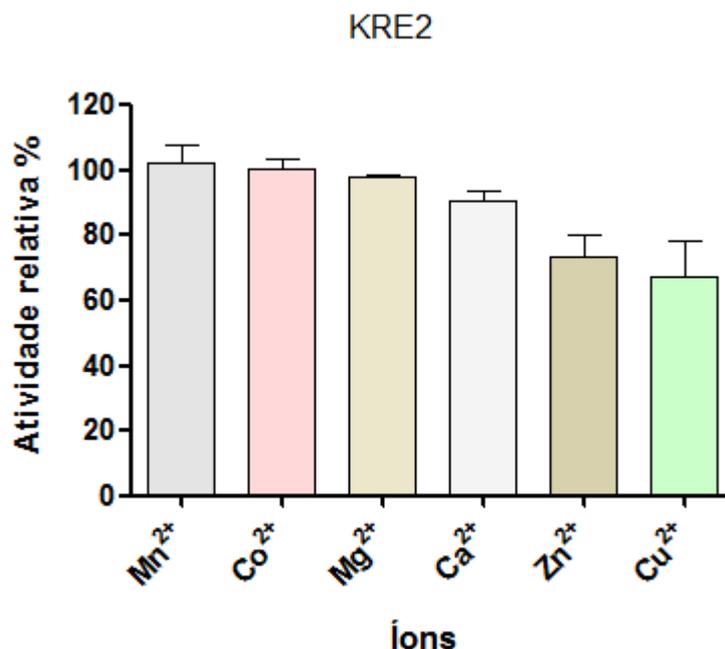


Figura 43: Efeito dos íons na atividade enzimática da proteína recombinante KRE2. Mn<sup>2+</sup> foi utilizado como controle positivo da atividade enzimática. Cu<sup>2+</sup> foi o íon com menor afinidade.

A análise de inibição da atividade enzimática utilizando a molécula 3 deverá ser repetida para KRE2 de *P. lutzii* e MNT1 de *C. albicans*, pois, não foi possível determinar o tipo de inibição promovido por este composto. Desta forma, os próximos testes serão realizados utilizando o Pluronic F-127 associado a molécula 3 na tentativa de melhorar a solubilidade do composto e assim, reduzir a concentração mínima da molécula necessária para inibir a atividade das enzimas KRE2 e MNT1. O melhoramento da molécula 3 é um passo importante, e testes futuros utilizando outros fungos deverão ser realizados, pois, os resultados obtidos nos testes *in vitro* do Pluronic F-127 associado à molécula 3 em *C. albicans* foram promissores. Poderá ocorrer uma melhora significativa nos resultados de inibição tanto para MNT1 de *C. albicans*, como poderá diminuir consideravelmente a concentração necessária de molécula 3 para inibir a atividade de KRE2 de *P. lutzii*. Desta forma, poderá apresentar melhores resultados nos testes de inibição *in vitro* com fungos de relevância médica e nos testes de inibição enzimática com as proteínas-alvo, e assim, poderá contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos.

## 7 CONCLUSÕES

Nosso grupo de pesquisa desenvolve um projeto (PRONEX/FAP-DF/CNPq - Pós- Genoma de Fungos Patogênicos Humanos Visando o Desenvolvimento de Novas Drogas Antifúngicas) – onde o objetivo principal refere-se ao desenvolvimento de novos antifúngicos para o tratamento de micoses de relevância mundial. Além da busca de novos genes alvos de drogas, realizou-se busca de novos compostos que possam ser testados contra diversos fungos de importância médica. Este projeto abriga projetos menores tais como o presente projeto de estudos do gene *kre2*, incluindo a produção da proteína recombinante e testes de inibição enzimática utilizando uma molécula selecionada por varredura virtual.

Para o desenvolvimento deste projeto utilizou-se três estratégias para obtenção da proteína recombinante KRE2. A primeira usando o sistema de expressão heteróloga de *E. coli* e as outras duas, no sistema de *P. pastoris* com algumas modificações entre eles.

Com o sistema de expressão em *E. coli* foi possível a obtenção da proteína KRE2 recombinante de *P. lutzii* com certo grau de pureza e em quantidade suficiente para realizar o ensaio de imunocitocalização da proteína em estudo. Este experimento demonstrou que KRE2 localiza-se tanto na superfície celular quanto na parte interna da célula. A localização de KRE2 na parede celular demonstra ser um alvo molecular de fácil acesso para a busca de novos antifúngicos, o que contribui consideravelmente.

O padrão de degradação da proteína KRE2 recombinante visto no sistema de *E. coli*, também foi observado no sistema de expressão de *P. pastoris*. Porém, mesmo com a degradação, a proteína parcialmente pura obtida neste último sistema foi utilizada para realizar os testes para caracterização de atividade enzimática. Foram realizados testes de cinética enzimática, que demonstraram, em comparação com a literatura, um  $K_m$  aparente de alta afinidade da enzima pelo substrato. Foram realizados ensaios de inibição da atividade enzimática de KRE2 de *P. lutzii* e MNT1 de *C. albicans* para observar a capacidade de inibição da atividade destas enzimas pela molécula 3. Os resultados obtidos nos testes de inibição da atividade de KRE2 recombinante foram mais expressivas em relação a MNT1 de *C. albicans*, o que era esperado já que a molécula 3 foi identificada por varredura virtual utilizando o modelo molecular da enzima KRE2 de *P. lutzii*. A taxa de inibição da atividade enzimática de KRE2 de *P. lutzii* pela molécula 3 foi de 60% e para MNT1 de *C. albicans* 20%, o que foi

considerado um excelente resultado. Foi encontrada uma dificuldade em relação à solubilidade da molécula 3 em solução aquosa, o que pode ter influenciado os resultados obtidos, diminuindo o potencial de inibição. A problemática encontrada é um fator que merece atenção, pois, trabalhar com a molécula em condições ótimas de solubilidade pode representar resultados mais expressivos.

Por fim foram realizados testes para verificar a possibilidade de KRE2 utilizar outros íons como cofator. Neste experimento foi observada uma diferença entre MNT1 e KRE2. MNT1 é capaz de utilizar o  $\text{Co}^{2+}$  como cofator, e em menor porcentagem, pode usar o  $\text{Ca}^{2+}$  (Díaz-Jiménes *et al.*, 2012), no entanto, KRE2 é capaz de utilizar como cofator todos os íons testados e o cobre com menor afinidade apresentou atividade relativa em 60%.

## 8 PERSPECTIVAS

Otimização da purificação da proteína recombinante KRE2 para obter a proteína com maior grau de pureza e assim realizar novos testes de inibição enzimática para KRE2 de *P. lutzii* usando a molécula 3.

Melhoramento da solubilidade da molécula Realização dos testes de atividade antifúngica *in vitro* da molécula 3 contra os fungos de relevância médica *P. lutzii* (isolado Pb01), *P. brasiliensis* (isolados Pb18 e Pb265), *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. neoformans* após melhoramento da solubilização do composto.

Repetição dos testes de inibição enzimática com KRE2 de *P. lutzii* e MNT1 de *C. albicans* usando inibidor.

Cristalização de KRE2 e resolução da estrutura 3D.

Caracterização das propriedades físico-químicas da proteína KRE2 através das técnicas de dicroísmo circular (CD) e espalhamento dinâmico de luz (DLS).

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadio, A. K. R., Kioshima, E. S., Teixeira, M. M., Martins, N. F., Maigret, B., & Felipe, M. S. S. (2011). Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. *BMC Genomics*, *12*(1), 75. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-12-75>
- Baddley, J. W., & Moser, S. a. (2004). Emerging fungal resistance. *Clinics in Laboratory Medicine*, *24*(3), 721–735. <http://doi.org/10.1016/j.cll.2004.05.003>
- Bagagli, E., Franco, M., Bosco, S. D. M. G., Hebeler-Barbosa, F., Trinca, L. a, & Montenegro, M. R. (2003). High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, *41*(3), 217–223. <http://doi.org/10.1080/13693780310001597368>
- Bagagli, E., Sano, A., Coelho, K. I., Alquati, S., Miyaji, M., De Camargo, Z. P., ... Montenegro, M. R. (1998). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *58*(4), 505–512.
- Bagagli, E., Theodoro, R. C., Bosco, S. M. G., & McEwen, J. G. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis*: Phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia*, *165*(4-5), 197–207. <http://doi.org/10.1007/s11046-007-9050-7>
- Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* *10*(5):411-21.
- Barreiro, E.J., Rodrigues, C.R. (1997) Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. *Química Nova* *20*(1)
- Beautrait, A., Leroux, V., Chavent, M., Ghemti, L., Devignes, M. D., Smail-Tabbone, M., ... Maigret, B. (2008). Multiple-step virtual screening using VSM-G: Overview and validation of fast geometrical matching enrichment. *Journal of Molecular Modeling*, *14*(2), 135–148. <http://doi.org/10.1007/s00894-007-0257-9>
- Bertini, S., Colombo, A. L., Takahashi, H. K., & Straus, A. H. (2007). Expression of antibodies directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of paracoccidioidomycosis treatment. *Clinical and Vaccine Immunology*, *14*(2), 150–156. <http://doi.org/10.1128/CVI.00285-06>
- Bocca, A. L., Amaral, A. C., Teixeira, M. M., Sato, P. K., Sato, P., Shikanai-Yasuda, M. A., & Soares Felipe, M. S. (2013). Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiology*, *8*(9), 1177–91. <http://doi.org/10.2217/fmb.13.68>
- Borges-Walmsley, M. I., Chen, D., Shu, X., & Walmsley, A. R. (2002). The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends in Microbiology*, *10*(2), 80–87. [http://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02292-2](http://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02292-2)

- Brummer, E., Castaneda, E., Restrepo, A., Microbiología, G. De, & Bogota, S. De. (1993). Paracoccidioidomycosis : an Update, *6*(2), 89–117.
- Buitrago, M. J., Bernal-Martínez, L., Castelli, M. V., Rodríguez-Tudela, J. L., & Cuenca-Estrella, M. (2011). Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: A review of cases and diagnosis. *Journal of Travel Medicine*, *18*(1), 26–33. <http://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2010.00477.x>
- Buitrago, M. J., & Cuenca-Estrella, M. (2012). Epidemiología actual y diagnóstico de laboratorio de las micosis endémicas en España. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *30*(7), 407–413. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.014>
- Buurman, E. T., Westwater, C., Hube, B., Brown, a J., Odds, F. C., & Gow, N. a. (1998). Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(13), 7670–7675. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7670>
- Caffrey, C. R., Rohwer, A., Oellien, F., Marhöfer, R. J., Braschi, S., Oliveira, G., ... Selzer, P. M. (2009). A comparative chemogenomics strategy to predict potential drug targets in the metazoan pathogen, *Schistosoma mansoni*. *PLoS ONE*, *4*(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0004413>
- Cantón, E., Pemán, J., Quindós, G., Eraso, E., Miranda-Zapico, I., Álvarez, M., ... Velasco, D. (2011). Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(12), 5590–6. <http://doi.org/10.1128/AAC.00466-11>
- Capella Machado, G., Moris, D. V., Domingos Arantes, T., Silva, L. R. F., Theodoro, R. C., Mendes, R. P., ... Bagagli, E. (2013). Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: Impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *108*(5), 637–643. <http://doi.org/10.1590/0074-0276108052013016>
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(1), 45–66. [http://doi.org/S0168-6445\(99\)00029-7](http://doi.org/S0168-6445(99)00029-7) [pii]
- Cheng, A. C., Coleman, R. G., Smyth, K. T., Cao, Q., Soulard, P., Caffrey, D. R., ... Huang, E. S. (2007). Structure-based maximal affinity model predicts small-molecule druggability. *Nature Biotechnology*, *25*(1), 71–75. <http://doi.org/10.1038/nbt1273>
- Colombo, A. L., Tobón, A., Restrepo, A., Queiroz-Telles, F., & Nucci, M. (2011). Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Medical Mycology*, (November), 1–14. <http://doi.org/10.3109/13693786.2011.577821>

- Cooper H. M, Paterson Y (2008) Production of Polyclonal Antisera. *Current Protocols in Immunology* A.3I.1-A.3I.10
- Corredor, G. G., Castaño, J. H., Peralta, L. a, Díez, S., Arango, M., McEwen, J., & Restrepo, a. (1999). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasyus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología : Organo de La Asociacion Espanola de Especialistas En Micologia*, 16(4), 216–220. <http://doi.org/199916216> [pii]
- Coutinho, Z. F., Silva, D. Da, Lazera, M., Petri, V., Oliveira, R. M. De, Sabroza, P. C., & Wanke, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cadernos de Saude Publica / Ministerio Da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica*, 18(5), 1441–1454. <http://doi.org/10.1590/S0102-311X2002000500037>
- Da Matta, D. A., de Almeida, L. P., Machado, A. M., Azevedo, A. C., Kusano, E. J. U., Travassos, N. F., ... Colombo, A. L. (2007). Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57(4), 399–404. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.10.011>
- Da Silva, M. B., Marques, A. F., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Travassos, L. R., & Tabora, C. P. (2006). Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: Effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes and Infection*, 8(1), 197–205. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.06.018>
- Da Silva, M. B., Thomaz, L., Marques, A. F., Svidzinski, A. E., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., ... Tabora, C. P. (2009). Resistance of melanized yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* to antimicrobial oxidants and inhibition of phagocytosis using carbohydrates and monoclonal antibody to CD18. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(4), 644–648. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762009000400019>
- Desjardins, C. a., Champion, M. D., Holder, J. W., Muszewska, A., Goldberg, J., Bailão, A. M., ... Cuomo, C. a. (2011). Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS Genetics*, 7(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002345>
- Díaz-Jiménez, D. F., Mora-Montes, H. M., Hernández-Cervantes, A., Luna-Arias, J. P., Gow, N. a R., & Flores-Carreón, A. (2012). Biochemical characterization of recombinant *Candida albicans* mannosyltransferases Mnt1, Mnt2 and Mnt5 reveals new functions in O- and N-mannan biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419(1), 77–82. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.131>
- Diekema, D. J., Messer, S. A., Boyken, L. B., Hollis, R. J., Kroeger, J., Tendolkar, S., & Pfaller, M. A. (2009). In Vitro Activity of Seven Systemically Active antifungal

- agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(10), 3170–3177. doi:10.1128/JCM.00942-09
- dos Santos WA, da Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. [Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case control study in the state of Espírito Santo, Brazil]. *Cad. Saude Publica* 19, 245–253 (2003).
- Farias MR, Werner J, Muro MD, Marques SA, Marques MEA, Franco MF, Ribeiro MG, Custódio CC, Condas LAZ, Bosco SMG, Bagagli E 2005. Canine paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 47: 64
- Felipe, M. S. S., Andrade, R. V, Arraes, F. B. M., Nicola, A. M., Maranhão, A. Q., Torres, F. a G., ... Brígido, M. M. (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 24706–24714. <http://doi.org/10.1074/jbc.M500625200>
- Franco, M., Bagagli, E., Scapolio, S., & da Silva Lacaz, C. (2000). A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 38(3), 185–191. <http://doi.org/10.1080/714030941>
- Ghosh, S., Nie, A., An, J., & Huang, Z. (2006). Structure-based virtual screening of chemical libraries for drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(3), 194–202. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.04.002>
- Gómez, B. L., Nosanchuk, J. D., Di, S., Youngchim, S., Aisen, P., Cano, L. E., ... Hamilton, A. J. (2001). Detection of Melanin-Like Pigments in the Dimorphic Fungal Pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* In Vitro and during Infection. *Detection of Melanin-Like Pigments in the Dimorphic Fungal Pathogen Paracoccidioides brasiliensis In Vitro and during Infection*, 69(9), 5760–5767. <http://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5760>
- Gudlaugsson, O., Gillespie, S., Lee, K., Vande Berg, J., Hu, J., Messer, S., ... Diekema, D. (2003). Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 37(9), 1172–1177. <http://doi.org/10.1086/378745>
- Häusler, a, Ballou, L., Ballou, C. E., & Robbins, P. W. (1992). Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an alpha-1,2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(15), 6846–6850. <http://doi.org/10.1073/pnas.89.15.6846>
- Hernández-Cervantes, A., Mora-Montes, H. M., Álvarez-Vargas, A., Díaz Jiménez, D. F., Robledo-Ortiz, C. I., & Flores-Carreón, A. (2012). Isolation of *Sporothrix schenckii* MNT1 and the biochemical and functional characterization of the encoded  $\alpha$ 1,2-mannosyltransferase activity. *Microbiology (United Kingdom)*, 158(9), 2419–2427. <http://doi.org/10.1099/mic.0.060392-0>

- Herscovics, A. and Orlean, P. (1993). Glycoprotein biosynthesis in yeast. *Faseb Journal* 7, 540-550.
- Higgins, D. R. Overview of protein expression in *Pichia pastoris*. *Current protocols in protein science*, 5.7.1-5.7.18, 1995.
- Hillisch, a, Hillisch, a, Pineda, L. F., Pineda, L. F., Hilgenfeld, R., & Hilgenfeld, R. (2004). Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug Discov Today*, 9(15), 659–669. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15279849](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15279849)
- Hu, W., Sillaots, S., Lemieux, S., Davison, J., Kauffman, S., Breton, A., ... Roemer, T. (2007). Essential gene identification and drug target prioritization in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*, 3(3). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030024>
- Kairys, V., Fernandes, M. X., & Gilson, M. K. (2006). Screening drug-like compounds by docking to homology models: A systematic study. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 46(1), 365–379. <http://doi.org/10.1021/ci050238c>
- Kanetsuna, F., Carbonell, L. M., Azuma, I., & Yamamura, Y. (1972). Biochemical Studies on the Thermal Dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*1. *Journal of Bacteriology*, 110(1), 208–218.
- Kett, D. H., Azoulay, E., Echeverria, P. M., & Vincent, J.-L. (2011). Candida bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Critical Care Medicine*, 39(4), 665–670. <http://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318206c1ca>
- Kim, A., Nicolau, D. P., & Kuti, J. L. (2011). Hospital costs and outcomes among intravenous antifungal therapies for patients with invasive aspergillosis in the United States. *Mycoses*, 54(5), 301–312. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01903.x>
- Kumar, S., Chaudhary, K., Foster, J. M., Novelli, J. F., Zhang, Y., Wang, S., ... Carlow, C. K. S. (2007). Mining predicted essential genes of *Brugia malayi* for nematode drug targets. *PLoS ONE*, 2(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0001189>
- Kuroyanagi, J. I., Kanai, K., Sugimoto, Y., Horiuchi, T., Achiwa, I., Takeshita, H., & Kawakami, K. (2010). 1,3-Benzoxazole-4-carbonitrile as a novel antifungal scaffold of  $\beta$ -1,6-glucan synthesis inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18(21), 7593–7606. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.08.044>
- Lacaz, C. S, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. (2002) Tratado de Micologia Médica-Lacaz. Editora Sarvier, São Paulo
- Levitz, S. M., & Specht, C. a. (2006). The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. *FEMS Yeast Research*, 6(4), 513–524. <http://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00071.x>

- Lobsanov, Y. D., Romero, P. a., Sleno, B., Yu, B., Yip, P., Herscovics, A., & Howell, P. L. (2004). Structure of Kre2p/Mnt1p: A yeast  $\alpha$ -1,2-mannosyltransferase involved in mannoprotein biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17921–17931. <http://doi.org/10.1074/jbc.M312720200>
- Lussier, M., Sdicu, A.M., Ketela, T., Bussey, H. (1995) Localization and targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* Kre2p/Mnt1p  $\alpha$  1,2-mannosyltransferase to a medial-Golgi compartment. *J Cell Biol.* 131(4):913-27
- Lussier, M., Sdicu, A. M., & Bussey, H. (1999). The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1426(2), 323–334. [http://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00133-0](http://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00133-0)
- Martínez-duncker, I., Díaz-jimenez, D. F., & Mora-montes, H. M. (2014). Comparative Analysis of Protein Glycosylation Pathways in Humans and the Fungal Pathogen *Candida albicans*, 2014(Figure 1).
- Matute, D. R., McEwen, J. G., Puccia, R., Montes, B. a., San-Blas, G., Bagagli, E., ... Taylor, J. W. (2006). Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(1), 65–73. <http://doi.org/10.1093/molbev/msj008>
- Mikulska, M., Bassetti, M., Ratto, S., & Viscoli, C. (2011). Invasive candidiasis in non-hematological patients. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 3(1). <http://doi.org/10.4084/MJHID.2011.007>
- Moreau, S., Varache-Lembège, M., Larrouture, S., Fall, D., Neveu, A., Deffieux, G., Vercauteren, J., Nuhrich, A. (2002) (2-Arylhydrazonomethyl)-substituted xanthenes as antimycotics: synthesis and fungistatic activity against *Candida* species. *Eur J Med Chem.* 37(3):237-53.
- Naiff, R. D., Ferreira, L. C., Barrett, T. V., Naiff, M. F., & Arias, J. R. (1986). Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Par??. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 28(1), 19–27. <http://doi.org/10.1590/S0036-46651986000100005>
- Nakajima, T., & Ballou, C. E. (1975). Yeast manno-protein biosynthesis: solubilization and selective assay of four mannosyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(10), 3912–3916. <http://doi.org/10.1073/pnas.72.10.3912>
- Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J., & Gow, N. a R. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(1), 67–78. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1815>
- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 1. <http://doi.org/10.1093/jac/dkg301>

- Orlean, P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, *192*(3), 775–818. <http://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>
- Pfaller, M. a., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, *20*(1), 133–163. <http://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>
- Puccia, R., Vallejo, M. C., Matsuo, A. L., & Longo, L. V. G. (2011). The *Paracoccidioides* cell wall: Past and present layers toward understanding interaction with the host. *Frontiers in Microbiology*, *2*(DEC), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00257>
- Queiroz-Telles F, Escuissato DL. (2011). Pulmonary *Paracoccidioidomycosis*. *Semi Respir Crit Care Med*; 32-764-774.
- Ricci, G., Mota, F. T., Wakamatsu, a, Serafim, R. C., Borra, R. C., & Franco, M. (2004). Canine paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, *42*(4), 379–383. <http://doi.org/10.1080/1369378032000141417>
- Rispail, N., Soanes, D. M., Ant, C., Czajkowski, R., Grünler, A., Huguet, R., ... Di Pietro, A. (2009). Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calmodulin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, *46*(4), 287–298. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.01.002>
- Roemer, T., Jiang, B., Davison, J., Ketela, T., Veillette, K., Breton, A., ... Bussey, H. (2003). Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Molecular Microbiology*, *50*(1), 167–181. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03697.x>
- Romanos, M. A.; Scorer, C. A.; Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, *8*, 423-488.
- Romanos, M. (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, *6*(5), 527–533.
- Romero, P. a, Lussier, M., Sdicu, a M., Bussey, H., & Herscovics, a. (1997). Ktr1p is an alpha-1,2-mannosyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. Comparison of the enzymic properties of soluble recombinant Ktr1p and Kre2p/Mnt1p produced in *Pichia pastoris*. *The Biochemical Journal*, *321* (Pt 2), 289–295.
- Sable, C. a, Strohmaier, K. M., & Chodakewitz, J. a. (2008). Advances in antifungal therapy. *Annual Review of Medicine*, *59*, 361–379. <http://doi.org/10.1146/annurev.med.59.062906.071602>
- Saidani, N., Grando, D., Valadié, H., Bastien, O., & Maréchal, E. (2009). Potential and limits of in silico target discovery-Case study of the search for new antimalarial chemotherapeutic targets. *Infection, Genetics and Evolution*, *9*(3), 359–367. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.01.001>

- Salgado-Salazar, C., Jones, L. R., Restrepo, Á., & McEwen, J. G. (2010). The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: Phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. *Cladistics*, *26*(6), 613–624. <http://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00307.x>
- Sambrook, J; Fritsch EF; Maniatis T. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- San-Blas, G., Niño-Vega, G., & Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, *40*(3), 225–242. <http://doi.org/10.1080/714031110>
- Shankar, J., Restrepo, A., Clemons, K. V., & Stevens, D. a. (2011). Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(2), 296–313. <http://doi.org/10.1128/CMR.00062-10>
- Shikanai-yasuda, M. A., Queiroz, F. De, Filho, T., Mendes, R. P., Colombo, A. L., Moretti, M. L., & Consultores, D. (2006). Consenso em paracoccidioidomycose Guideliness in paracoccidioidomycosis. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *39*(3), 297–310.
- Shoichet, B. K. (2004). Virtual screening of chemical libraries. *Nature*, *432*(7019), 862–865. <http://doi.org/10.1038/nature03197>
- Stahura, F. L., & Bajorath, J. (2004). Virtual screening methods that complement HTS. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, *7*(4), 259–269. <http://doi.org/10.2174/1386207043328706>
- Takahashi, H. K., Toledo, M. S., Suzuki, E., Tagliari, L., & Straus, A. H. (2009). Current relevance of fungal and trypanosomatid glycolipids and sphingolipids: Studies defining structures conspicuously absent in mammals. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, *81*(3), 477–488. <http://doi.org/10.1590/S0001-37652009000300012>
- Teixeira, M. D. M., Theodoro, R. C., Derengowski, L. D. S., Nicola, A. M., Bagagli, E., & Felipe, M. S. (2013). Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidioides*. *Eukaryotic Cell*, *12*(3), 380–389. <http://doi.org/10.1128/EC.05052-11>
- Teixeira, M. M., Theodoro, R. C., de Carvalho, M. J. a, Fernandes, L., Paes, H. C., Hahn, R. C., ... Felipe, M. S. S. (2009). Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *52*(2), 273–283. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.04.005>
- Teixeira, M. M., Theodoro, R. C., Nino-Vega, G., Bagagli, E., & Felipe, M. S. S. (2014). *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. *PLoS Pathogens*, *10*(10), e1004397. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004397>

- Theodoro, R. C., Teixeira, M. D. M., Felipe, M. S. S., Paduan, K. D. S., Ribolla, P. M., San-Blas, G., & Bagagli, E. (2012). Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. *PLoS ONE*, 7(5). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0037694>
- Thomson, L. M., Bates, S., Yamazaki, S., Arisawa, M., Aoki, Y., & Gow, N. a R. (2000). Functional characterization of the *Candida albicans* MNT1 mannosyltransferase expressed heterologously in *Pichia pastoris*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(25), 18933–18938. <http://doi.org/10.1074/jbc.M909699199>
- Toledo, M. S., Suzuki, E., Levery, S. B., Straus, a H., & Takahashi, H. K. (2001). Characterization of monoclonal antibody MEST-2 specific to glucosylceramide of fungi and plants. *Glycobiology*, 11(2), 105–112. <http://doi.org/10.1093/glycob/11.2.105>
- Toledo, M. S., Tagliari, L., Suzuki, E., Silva, C. M., Straus, A. H., & Takahashi, H. K. (2010). Effect of anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies in pathogenic fungal growth and differentiation. Characterization of monoclonal antibody MEST-3 directed to Man $\alpha$ 1-->3Man $\alpha$ 1-->2IPC. *BMC Microbiology*, 10, 47. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-10-47>
- Tortorano, A. M., Kibbler, C., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., & Grillot, R. (2006). *Candidaemia* in Europe: epidemiology and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(5), 359–366. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.002>
- Trejo-Chávez, a., Ramírez-Romero, R., Ancer-Rodríguez, J., Nevárez-Garza, a. M., & Rodríguez-Tovar, L. E. (2011). Disseminated *Paracoccidioidomycosis* in a Southern Two-Toed Sloth (*Choloepus didactylus*). *Journal of Comparative Pathology*, 144(2-3), 231–234. <http://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.08.012>
- Untereiner, W. a, Scott, J. a, Naveau, F. a, Sigler, L., Bachewich, J., & Angus, A. (2004). The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycologia*, 96(4), 812–821. <http://doi.org/10.2307/3762114>
- Wagener, J., Echtenacher, B., Rohde, M., Kotz, A., Krappmann, S., Heesemann, J., & Ebel, F. (2008). The putative  $\alpha$ -1,2-mannosyltransferase AfMnt1 of the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* is required for cell wall stability and full virulence. *Eukaryotic Cell*, 7(10), 1661–1673. <http://doi.org/10.1128/EC.00221-08>
- Wanke, B., Aidê MA, (2009) Chapter 6 – *Paracoccidioidomycosis*. *J Bras Pneumol* 35:1245-1249
- Werner, T., Morris, M. B., Dastmalchi, S., & Church, W. B. (2012). Structural modelling and dynamics of proteins for insights into drug interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(4), 323–343. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.011>

- White, T. a., & Kell, D. B. (2004). Comparative genomic assessment of novel broad-spectrum targets for antibacterial drugs. *Comparative and Functional Genomics*, 5(4), 304–327. <http://doi.org/10.1002/cfg.411>
- Wills, E.A., Redinbo, M.R., Perfect, J.R. and Del Poeta, M. (2000). New potential targets for antifungal development. *Emerg. Therap. Targets* 4: 1-32.