

**Patricia Akemi Assato**

**“Análise funcional do gene da proteína 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis*.”**

**Araraquara**

**2011**

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus Arararaquara**

**Patricia Akemi Assato**

**“Análise funcional do gene da proteína 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis*.**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de  
Graduação em Farmácia-  
Bioquímica da Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas de  
Araraquara, da Universidade  
Estadual Paulista para obtenção do  
grau de Farmacêutico-Bioquímico.

**Orientadora:** Ana Marisa Fusco Almeida

**Co-orientador:** Cleslei Fernando Zanelli

**Araraquara**

**2011**

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Agradeço a Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida pela orientação neste Trabalho de Conclusão de Curso, por toda ajuda e apoio que permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Fernando e Luiza, por sempre lutarem muito para dar tudo que precisei, por estarem presentes em todos os momentos, inclusive quando eu fazia coisa errada, pois nestas horas vocês sempre procuraram me mostrar o que é certo, por sempre me apoiar nos momentos difíceis, mas principalmente, pelo amor incondicional que sempre recebi. Amo muito vocês!

Às minhas irmãs, Mileine e Fernanda, vocês foram simplesmente as primeiras amigas que eu tive, amo tanto vocês. Sinto muita saudade, ainda mais quando uma decide ficar um tempão no Japão, aí quando volta, a outra resolve ir para o Sul... mas é assim mesmo, crescemos! Obrigada por todo o apoio, conversas, bagunças (até a mãe aparecer) e por todos os momentos juntas em casa, na praia e até no Skype.

Ir estudar em outra cidade, sair do conforto de casa e chegar a uma cidade que não se conhece ninguém, ter que cozinhar, lavar, controlar o dinheiro não é fácil, mas eu tive a sorte de conhecer pessoas fantásticas que se tornaram minha segunda família. Lila, Panta, Cris, Má, Ester, Floris, Pascu, Suiça, Melan, Isa e Marcela obrigada por estarem sempre ao meu lado, por todas nossas bagunças, conversas, desabafos, tereré, tardes, noites, finais de semana que ficamos juntas em festas ou simplesmente fazendo nada. KTK's, agregadas (e claro, vizinhos) vocês fizeram parte da minha graduação e sempre me deram muito força para chegar aqui, obrigada!

Floris, Paulinha, Du, Ju, Raul, Alja conseguimos! Estamos nos formando! Vocês são muito mais que colegas de classe e, em breve, de profissão, foram pessoas muito especiais com quem tive o prazer de conviver por 6 anos.

Giba, com certeza sem você tudo seria mais difícil. Obrigada por estar sempre ao meu lado, por seu apoio e carinho.

À grande família Micologia, Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Marisa e Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria José, Rô, Julhiany, Haroldo, Panta, Liliana, Carol, Suélen, Thaís, Nayla, Fernanda Gullo, Fernada. Sangalli, Janaína, Luciana, Aline, Danielle, Jaque, Tati, Natália, Warley,

Vanessa, por sempre estarem dispostos a me ajudar, ensinar. Ju, você sabe o quanto eu admiro seu jeito chato de ser, rsrs, obrigada por ter tanta paciência, disposição em ensinar e pelas broncas que me fizeram amadurecer. Você é uma inspiração, de verdade, e isso aumenta cada vez que conversamos. Espero um dia poder retribuir. Panta, foi tudo culpa sua! Obrigada!! Amo você e é muito bom ter você por perto quando as coisas estão tão diferentes, né. Lili, já estou com saudades! Pessoas, vocês sabem o quanto gosto e admiro vocês, obrigada pelo apoio, conversar, risadas, enfim, por tudo!

Aos professores Sandro Roberto Valentini e Cleslei Fernando Zanelli, a doutoranda Danuza Rossi e ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular. Obrigada por toda contribuição para o projeto.

À Unesp – Pibic (Cnpq) pela bolsa concedida.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1:** Eletroforese em agarose 1% corada com brometo de etídio. **A:** Extração de RNA do isolado 18 de *P. brasiliensis*. **B:** cDNA sintetizado e purificado.

**Figura 2:** **A.** Produto resultante amplificação da seqüência de cDNA da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* utilizando os primers específicos desenhados. **1:** marcador de massa molecular 1kb (Invitrogen); **2:** produto amplificado de aproximadamente 800pb (inserto). **B** Esquema representativo da seqüência de cDNA da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* (acesso no GenBank número AY462124) e dos iniciadores desenhados especificamente para clonagem sítio dirigida para expressão no vetor pCR2.1-TOPO.

**Figura 3:** PCR para confirmação da presença do inserto nas colônias selecionadas. **1:** marcador molecular 1kb (Invitrogen); **2:** controle positivo (produto de PCR), **3 a 7:** PCR das colônias de **1 a 5**, respectivamente, demonstrando a amplificação do inserto como resultado positivo da clonagem.

**Figura 4:** Restrição dos plasmídeos recombinantes **1 e 6:** marcador molecular 1kb (Invitrogen); **2:** plasmídeo recombinante íntegro; **3:** plasmídeo recombinante clivado com *Sal I*; **4:** vetor de expressão (pET32a) íntegro; **5:** vetor de expressão (pET32a) clivado com *Sal I*.

**Figura 5:** Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-Page) e coloração por ComassiePhast Gel R350. Verificação do teste de indução, **1:** Marcador de massa molecular; **2:** alíquota após 0h, **3:** 1h, **4:** 2h, **5:** 3h, **6:** 4h e **7:** 5h de indução com 0,4mM de IPTG a 37°C, a seta indica a expressão da proteína recombinante com massa molecular acima de 30kDa devido à ligação prévia com a calda de histidina.

**Figura 6:** Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-Page). Coloração por ComassiePhast Gel R350, para verificar purificação da proteína 14-3-3 recombinante através de cromatografia de afinidade com coluna de níquel. **1:** Marcador de massa molecular, **2 a 16:** frações da purificação, a seta indica a proteína recombinante parcialmente purificada.

**Figura 7:** Alinhamento da sequência de aminoácido de BMH1 e BMH2/Pb14-3-3. (\*) indica que o mesmo aminoácido foi identificado nas 3 sequências; (:) indica que o mesmo aminoácido foi identificado nas sequências BM1 e BMH2 e (.) indica que o mesmo aminoácido foi identificado na sequencia Pb14-3-3 e na sequencia BMH1 ou BMH2

**Figura 8:** Confirmação do nocaute dos genes de BMH1 e BMH2. Eletroforese dos produtos de PCR a partir do DNA genômico das linhagens *bmh1::KanMX4* e *bmh2::KanMX4*. As canaletas **1**, **2** e **3** correspondem, respectivamente, à amplificação dos fragmentos ConfirmAbmh1 + VZO897 (extremidade 5' da recombinação – 523 bp), ConfirmDbmh1 + VZO898 extremidade 3' da recombinação – 585 bp) e ConfirmAbmh1 + ConfirmDbmh1 (gene inteiro nocauteado – 2326 bp). As canaletas **4**, **5** e **6** correspondem, respectivamente, à amplificação dos fragmentos ConfirmAbmh2 + VZO897 (extremidade 5' da recombinação – 467 bp), ConfirmDbmh2 + VZO898 (extremidade 3' da recombinação – 590 bp) e ConfirmAbmh2 + ConfirmDbmh2 (gene inteiro nocauteado -2275 bp). A última canaleta corresponde ao padrão de peso molecular de 1Kb (Invitrogen).

**Figura 9:** Construção do fragmento híbrido. **L:** marcador molecular 1kb (Fermentas); **1, 3, 5, e, 7:** controle negativos de cada reação; **2:** 5'UTR *S. cerevisiae*; **4:** região codificante 14-3-3 de *P. brasiliensis*; **6:** 3'UTR *S. cerevisiae*; **8:** BMH1 de *S. cerevisiae*

**Figura 10:** Confirmação da presença dos insertos nas colônias selecionadas **L:** marcador molecular 1kb (Fermentas); **A:** Rastreamento através de restrição utilizando *BamHI* no plasmídeo pSV60, demonstrando positividade no clone 15 (canaleta 18). **B:** Rastreamento através de restrição utilizando *BamHI* no plasmídeo pSV64, demonstrando positividade nos clone 5 e 6 (canaletas 5 e 6). **C:** Rastreamento através de restrição utilizando *BamHI* no plasmídeo pSV59, demonstrando positividade no clone 17 (canaleta 17).

**Figura 11:** Amostras de *S. cerevisiae* quanto à capacidade de infectar células A549, por períodos de incubação de 30 minutos, 1, 2 e 5 horas. O gráfico representa a percentagem de infecção.

**Figura 12:** Cinética de interação das diferentes amostras de *S. cerevisiae* quanto à capacidade de infectar células A549, por períodos de incubação de 30 minutos, 1, 2 e 5 horas.

## Lista de abreviaturas e siglas

<b>%</b>	Porcentagem
<b>°C</b>	grau celsius
<b>µL</b>	microlitro
<b>µg</b>	Micrograma
<b>Δbmh1</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> com nocaute para o gene bmh1
<b>Δbmh2</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> com nocaute para o gene bmh1
<b>ATV</b>	Solução de tripsina-EDTA-versene (Adolfo Lutz)
<b>cDNA</b>	dna complementar
<b>Cels</b>	Células
<b>CN</b>	Controle negativo
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra acético
<b>DEPC</b>	dietil pirocarbonato
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	deóxinucleotídeos trifosfato
<b>D.O.</b>	densidade óptica
<b>DTT</b>	5-fluorootic acid
<b>FOA</b>	Glicoproteína de 43 kDa
<b>Gp43</b>	Ditiotreitol
<b>GPDH</b>	glicerol-3-fosfato desidrogenase
<b>GPI</b>	glicosil fosfatidil inositol
<b>H</b>	Hora
<b>HCl</b>	ácido clorídrico
<b>IPTG</b>	isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside
<b>KCl</b>	cloreto de potássio
<b>kDa</b>	Quiilodalton
<b>LB</b>	luria-bertanni
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloreto de magnésio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>M</b>	Molar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NADH</b>	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	sulfato de amônia
<b>Ng</b>	Nanograma
<b>Nm</b>	Nanometro
<b>Leu</b>	Leucina
<b>ORF</b>	open reading frame
<b>Pb</b>	pares de base
<b>PBS</b>	tampão fosfato salino
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol



<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonilflúor
<b>PCM</b>	Paracoccidioomicose
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>Rpm</b>	rotação por minuto
<b>RT PCR</b>	real time – polymerase chain reaction
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sódio
<b>SDS Page</b>	eletroforese em gel de poliacrilamida com sds
<b>TE</b>	Tris EDTA
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colônia
<b>Ura</b>	Uracila
<b>X</b>	Vezes
<b>YEPD</b>	yeast extract-peptone-dextrose
<b>WT</b>	Saccharomyces cerevisiae wild type

## SUMÁRIO

1.Introdução	13
2.Objetivos	19
3.Metodologia	20
3.1 Microrganismos utilizados	20
3.2 Cultura de células	20
3.3. Obtenção do RNA e clonagem do cDNA codificante da proteína 14-3-3 (30kDa) do isolado18 de <i>P. brasiliensis</i>	21
3.3.1. Obtenção do RNA de <i>P. brasiliensis</i>	21
3.3.2 Obtenção do cDNA codificante da proteína 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i>	21
3.3.3 Ligação do CDNA codificante da proteína 14-3-3 de <i>P. brasiliensis</i> em vetor de clonagem pCR2.1-TOPO	22
3.3.4 Preparo de bactérias quimiocompetentes <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	22
3.3.5 Clonagem em bactérias <i>E. coli</i> quimiocompetentes DH5 $\alpha$	23
3.3.6 Confirmação	23
3.3.7 Restrição dos plasmídeos para clonagem em vetor de expressão	24
3.4. Clonagem e expressão heteróloga da proteína 14.3.3 dos isolados de <i>P. brasiliensis</i> e purificação da molécula recombinante	25
3.5. Construção do homólogo funcional - Obtenção dos transformantes (homólogos funcionais 14-3-3Pb em <i>S. cerevisiae</i> pela complementação de homólogos funcionais em <i>S. cerevisiae</i>	26
3.5.1. Obtenção da ORF completa da adesina de 30kDa (14-3-3) de <i>P. brasiliensis</i>	26
3.5.2. Clonagem por complementação do gene 14-3-3	26
3.5.3. Transformação de <i>S. cerevisiae</i> para obtenção do hospedeiro contendo o homólogo funcional 14-3-3Pb.	27

3.6	Preparo e padronização do inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	27
3.7	Períodos de infecção	28
3.7.1	Coloração das lamínulas	29
4.	Resultados	30
4.1.	Obtenção do RNA e clonagem do cDNA codificante da proteína 14-3-3 (30kDa) do isolado18 de <i>P. brasiliensis</i>	30
4.2.	Construção do homólogo funcional - Obtenção dos transformantes (homólogos funcionais 14-3-3Pb em <i>S. cerevisiae</i> pela complementação de homólogos funcionais em <i>S. cerevisiae</i>	35
4.3.	Ensaio de Infecção	40
5.	Considerações finais	42
6.	Referências Bibliográficas	44

## RESUMO

A paracoccidiodomicose (PCM) é micose profunda causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), endêmica na América Latina, principalmente no Brasil. A capacidade de *P. brasiliensis* de não só provocar doença humana, mas também de causar micose com grande variedade de manifestações clínicas, desde formas localizadas até doença disseminada, evoluindo para letalidade, depende provavelmente da virulência do fungo, da habilidade deste em interagir com as estruturas superficiais do hospedeiro e invadi-las, e da resposta imunológica deste último. O sucesso da colonização dos tecidos do hospedeiro pelo fungo é um evento complexo, geralmente envolvendo um ligante codificado pelo patógeno (adesinas) e um receptor da célula. Uma adesina de 30 kDa de *P. brasiliensis*, ligante de laminina, foi caracterizada através de seqüenciamento de aminoácidos, mostrando que esta é uma proteína 14-3-3 envolvida na adesão deste fungo às células epiteliais. Estas formam uma família de proteínas diméricas, ácidas e estão presentes em múltiplas isoformas em muitos organismos eucariotos. Com o intuito de se estudar sua funcionalidade em *P. brasiliensis*, pretendeu-se clonar, caracterizar e utilizar como hospedeiro do gene desta proteína a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para tanto, as seqüências gênicas da adesina 14-3-3 de isolados de *P. brasiliensis* obtida pela clonagem do cDNA em vetores bacterianos foram utilizadas para obtenção de um homólogo funcional em *S. cerevisiae*. A capacidade do gene da 14-3-3 de *P. brasiliensis* ser um homólogo funcional, aderir e invadir as células epiteliais tratadas deve ser avaliada utilizando o modelo pré-existente de culturas celulares *in vitro* de linhagens humanas. Assim, neste estudo além da clonagem, expressão da 14-3-3 de Pb e obtenção do homólogo funcional do gene desta proteína em *S. cerevisiae*, foi iniciada a padronização dos ensaios para verificação da capacidade infectiva das linhagens selvagem (WT) e das linhagens mutantes  $\Delta$ bmh1 e  $\Delta$ bmh2 através da determinação do índice de adesão, uma vez que esta proteína foi caracterizada anteriormente como uma adesina. Todas as informações contribuíram para o maior conhecimento da patogenicidade deste fungo, vislumbrando assim um possível bloqueio dos alvos iniciais envolvidos na interação parasito-hospedeiro.

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas despertam o interesse de estudo devido à quantidade limitada de drogas antifúngicas e a sua ineficiência no tratamento de micoses sistêmicas, a forma mais grave destas infecções.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose de importância em nosso meio, dado a sua frequência, a gravidade de algumas de suas formas anátomo-clínicas e as taxas de mortalidade (LACAZ, 1994; BENARD & MENDES GIANNINI, 2009). A doença é geograficamente limitada à América Latina, desde o México até a Argentina, com prevalência em países da América do Sul (MENDES-GIANNINI & BENARD, 2005; RESTREPO et al., 2001). Dados estatísticos indicam que cerca de 10 milhões de pessoas que vivem em regiões endêmicas já entraram em contato com o fungo (SAN-BLAS et al., 2002). Entre 1996 e 2006, a PCM apresentou a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas no Brasil. As maiores taxas de mortalidade por ano ocorreram nas regiões Sudeste e Sul, especificamente em São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul (PRADO et al., 2009). Todavia, foram observados dados referentes a outras regiões, como Norte, Nordeste e Centro-Oeste, nas quais os estados mais afetados foram Rondônia, Pará, Bahia, Maranhão, Mato Grosso do Sul e Goiás (COUTINHO et al., 2002).

A PCM tem como principal agente etiológico *P. brasiliensis* que é um fungo dimórfico que cresce na fase miceliana (M), saprobiótica, em temperaturas de 25° a 27° C, sob a forma de colônias cotonosas e esbranquiçadas. Em meios enriquecidos a 37° C desenvolve-se a fase leveduriforme (L) que constitui a forma parasitária do fungo, apresentando-se como células arredondadas, de parede dupla e brotamentos múltiplos característicos, com estruturas fúngicas semelhante às encontradas nos tecidos (LACAZ, 1994; SAN-BLAS et al., 2002).

A infecção humana por *P. brasiliensis* ocorre principalmente pelo sistema respiratório, através da inalação de conídios da forma miceliana do fungo. Os conídios transformam-se em formas leveduriformes nos alvéolos pulmonares sob o estímulo do aumento da temperatura. Experimentos realizados em camundongos comprovam a termo-transição relatada por

McEwen et al. (1987). A doença no homem pode se desenvolver logo após a infecção ou anos depois, pois o fungo tem a capacidade de permanecer quiescente no pulmão por tempo indeterminado (RESTREPO et al., 1981). As manifestações clínicas se iniciam quando a doença se desenvolve, podendo ficar contida nos pulmões ou disseminar-se para outros órgãos ou sistemas através da via hematogênica e/ou linfática, causando lesões secundárias (FRANCO et al., 1986).

As manifestações clínicas da micose podem ser variadas, causando lesões em áreas cutâneas e/ou mucosas, de comprometimento orgânico múltiplo e de evolução prolongada (RESTREPO et al., 2001; FRANCO et al., 1994). Estas estão associadas a fatores relacionados com o parasita, como a virulência e a dimensão do inóculo, e com o estado imunológico e susceptibilidade genética à infecção do hospedeiro.

Os agentes de micoses sistêmicas possuem alguns fatores que permitem o seu crescimento nas condições adversas proporcionadas pelo hospedeiro, que podem contribuir para o desenvolvimento da doença (CASADEVALL & PIROFSKI, 1999). A interação entre os determinantes de virulência do agente e os mecanismos de defesa do hospedeiro resulta num processo complexo cujo conhecimento permite melhor entendimento da patogênese das micoses sistêmicas.

A interação fungo-hospedeiro é complexa e dinâmica (RAPPEYE e GOLDMAN, 2006). Muitos fungos patogênicos como *P. brasiliensis* tem múltiplos fatores que podem causar danos ao hospedeiro e que podem contribuir para o fenótipo de virulência destes organismos. A aderência, a colonização, a disseminação e as características desenvolvidas pelo próprio fungo que o levam a resistir aos ambientes hostis e escapar dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro estão correlacionadas ao desenvolvimento da doença (MENDES-GIANNINI et al., 2005; FILLER E SHEPPARD, 2006).

*P. brasiliensis* tem capacidade de aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (LENZI et al., 2000), sintetizando várias substâncias que participam direta ou indiretamente da relação parasito-hospedeiro. Este fungo pode desenvolver vários fenótipos (crescimento, invasão e metástase) dependendo do isolado fúngico, o hospedeiro e outros

fatores (MENDES-GIANNINI et al., 2000). O fenômeno de aderência é dependente da virulência do isolado (HANNA et al., 2000). Uma faceta importante na interação entre *P. brasiliensis* e seu hospedeiro é a habilidade do fungo aderir aos componentes de matriz extracelular. Este para colonizar e disseminar-se usando uma gama extensa de estratégias, incluindo as adesinas (MENDES-GIANNINI et al., 2006).

Em relação às prováveis moléculas de adesão de *P. brasiliensis*, a proteína gp43 parece ser necessária ao início da captação do fungo por células, atuando como um receptor de aderência no processo de internalização (MENDES-GIANNINI et al., 2004). O tratamento prévio de células leveduriformes de *P. brasiliensis* com laminina, diminui a patogenicidade do fungo, o qual induz uma resposta inflamatória menos intensa, sugerindo um efeito inibitório da molécula sobre a infectividade do fungo e sobre a sua interação com o hospedeiro, por possível ligação a epítomos da molécula gp43 (ANDRE et al., 2004).

Em estudo realizado por Andreotti et al. (2005), uma adesina de 30 kDa ligante de laminina, foi caracterizada através de seqüenciamento de aminoácidos, mostrando que esta é uma proteína 14-3-3 envolvida na adesão de *P. brasiliensis*.

As proteínas 14-3-3 formam uma família de proteínas diméricas, ácidas e estão presentes em múltiplas isoformas em muitos organismos eucariotos. Estas se ligam em mais de 150 diferentes proteínas e atuam na regulação de muitos processos celulares. Sua ligação está relacionada com proteínas envolvidas em processos de apoptose, transdução de sinal, regulação do ciclo celular e transcrição (FU et al., 2000). Interações entre integrinas e proteínas 14-3-3 também foram identificadas, sugerindo uma importante função desta proteína na regulação da adesão celular (HAN et al., 2001). Esta proteína apresenta múltiplas atuações e pouco é conhecido sobre a função das proteínas 14-3-3 em fungos patogênicos. Estudos com leveduras demonstraram que *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* têm dois genes que codificam para proteínas 14-3-3 (BMH1 e BMH2) e estas, como em eucariotos superiores, se ligam a numerosas proteínas envolvidas em uma variedade de processos celulares (VAN HEUSDEN e

STEENSMA, 2006). Em estudo realizado por Bruckmann et al. (2004), foi investigado o papel da proteína 14-3-3 na regulação da transcrição mostrando que esta estimula a transcrição de genes envolvidos no metabolismo de ergosterol (HES1, HMG1, ERG11, ERG1, ERG25 e ERG28) e regulam genes envolvidos na síntese de quitina em *S. cerevisiae*.

*Aspergillus nidulans* também possui uma proteína 14-3-3 (artA) com alta homologia à 14-3-3 de *P. brasiliensis*. Esta proteína está relacionada à formação de septo, pois ao invés de bloquear a septação, o aumento da expressão de artA causa demora na polarização dos conidióforos, sugerindo que estas proteínas tenham um papel importante na morfogênese da hifa (KRAUS et al., 2002).

Em *P. brasiliensis*, apesar de esta proteína já ter sido encontrada no genoma do fungo, sua função ainda é desconhecida. Neste sentido, a proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* se constitui em um importante foco para investigação funcional. A clonagem e a caracterização desta molécula envolvida na adesão do fungo pode ser um alvo interessante para o entendimento da patogênese e conseqüentemente para o desenvolvimento de estratégias de terapias pelo bloqueio de receptores, além disso, várias adesinas foram identificadas, entretanto estudos que caracterizam a real função destas moléculas que interagem no processo de infecção de *P. brasiliensis* necessitam de abordagem genômica funcional.

Em contraste à *Paracoccidioides brasiliensis*, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo bastante utilizado em pesquisas genéticas por ser de fácil manipulação em laboratório, de rápido crescimento e por permitir que seqüências exógenas de DNA se integrem no seu genoma por meio de recombinação homóloga (BARR, 2003). O genoma inteiramente seqüenciado de *Saccharomyces cerevisiae* (GOFFEAU et al., 1996) permite uma comparação de seqüências de genes da mesma com as de organismos eucariotos superiores em busca de homólogos funcionais (função conservada), que permitam sua utilização em estudos de análise funcional. Assim, a inserção destes genes em *Saccharomyces cerevisiae*, permitiria o estudo da similaridade funcional de sistemas de biossíntese de proteínas



ancoradas na superfície da parede celular que participam da morfogênese ou de potenciais GPIs que podem caracterizar moléculas envolvidas na adesão.

Esta estratégia foi utilizada recentemente por Castro et al. (2009) para a caracterização e análise funcional de  $\beta$ -1,3-glucanosiltransferase 3 de *P. brasiliensis*. O transformante *S. cerevisiae* PbGel3p, denominado gas1 $\Delta$ , apresentou similaridade funcional para uma proteína ancorada de superfície (glucan-elongating/glycophospholipid) relacionada à formação de pseudo-hifas, envolvida na biossíntese e morfogênese.

Em estudo realizado por Torres et al.(2008), *S. cerevisiae* foi utilizado como o hospedeiro para realizar a análise da expressão heteróloga de *P. brasiliensis* kex2 gene. Os dados mostraram que kex2, proteína relacionada ao dimorfismo e estabelecimento da infecção, pode complementar as funções em *S. cerevisiae* kex2 mutante e poderia, portanto, ser considerado o seu homólogo funcional.

Recentemente, análises funcionais de 45 âncoras de GPI de *Candida albicans* foram realizadas em mutantes homólogos de *S. cerevisiae* transformados por plasmídios contendo ORFs das seqüências de GPI mutagenizadas por transposons (PLAINE et al., 2008). Novas estratégias são necessárias para a caracterização funcional dos genes encontrados em *P. brasiliensis*, destacando-se para aqueles diretamente relacionados a importantes alvos para o delineamento de novas abordagens terapêuticas.

*S. cerevisiae* também foi capaz de codificar um análogo funcional da proteína Glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH), que desempenha um papel central no metabolismo de glicerol. O gene que codifica GPDH dependente de NADH e foi isolado de *Candida magnoliae* (LEE et al., 2008).

Assim, dando continuidade aos estudos dos mecanismos de virulência deste fungo, um dos objetivos desta proposta foi estudar a função deste gene que expressa molécula envolvida no processo de adesão de *P. brasiliensis*. Para tanto, utilizou-se *S. cerevisiae* como hospedeiro do gene que codifica a 14-3-3 de isolados de *P. brasiliensis* para conferir sua capacidade de ser um possível homólogo funcional. A capacidade de *S. cerevisiae* portador de 14-3-3Pb aderir e invadir as células epiteliais tratadas ou ser o homólogo funcional deste gene de *P. brasiliensis* foi avaliada, utilizando o modelo pré-existente de

culturas celulares *in vitro* de linhagens humanas através de ensaios para verificação de adesão.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Caracterizar e analisar a função da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* através de clonagem por complementação em *S. cerevisiae* para verificação do seu papel em *P. brasiliensis*, no processo de adesão das linhagens de *P. brasiliensis* e no hospedeiro do gene da 14-3-3, *S. cerevisiae*, às células epiteliais.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Clonagem, expressão, purificação e avaliação da proteína 14-3-3 (30 kDa);
- Construção dos plasmídeos para inserção do gene 14-3-3 e BMH para transformação e obtenção de homólogo funcional em *S. cerevisiae*;
- Avaliação da capacidade infectiva de *S. cerevisiae* contendo o homólogo funcional e de isolados de *P. brasiliensis*;

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Microrganismos utilizados

Foi utilizado o isolado 18 de *P. brasiliensis* na fase leveduriforme, advindo de caso de paracoccidioidomicose e procedente da micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP). O isolado foi mantido em meio de Fava Netto em estufa a 35°C e repicado a cada 3-4 dias. Após 10 repiques, o isolado foi submetido à infecção em monocamada de células epiteliais de tecido pulmonar e reisolado em meio de Fava Netto, para a recuperação da virulência. As culturas foram ampliadas e a partir de 2 tubos de cultivo no mesmo meio, as células leveduriformes foram recolhidas e submetidas à extração do RNA.

As linhagens das leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* com nocaute para os genes BMH1 e BMH2 e os plasmídeos utilizados para a obtenção dos transformantes foram semeados em meio seletivo (SC-Ura/-Leu) e as placas foram incubadas a 25°C até o desenvolvimento das colônias. Enquanto as leveduras de *S. cerevisiae*, *wild type* (WT) e as com nocaute para os genes BMH1 e BMH2 (*bmh1::KanMX4* e *bmh2::KanMX4*)  $\Delta$ *bmh1* e  $\Delta$ *bmh2*, utilizadas no ensaio de adesão foram mantidas em meio YEPD a 37°C até o desenvolvimento das colônias

#### 3.2 Cultura de células

Foi empregada para cultura de células a linhagem contínua A549, células epiteliais respiratórias, pneumócitos tipo I, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio HAM F-12, suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas a temperatura de 36.5°C. Decorridos 3 a 4 dias, as garrafas de células foram submetidas à tripsinização.

#### 3.3 Obtenção do RNA e clonagem do cDNA codificante da proteína 14-3-3 (30kDa) do isolado 18 de *P. brasiliensis*

##### 3.3.1 Obtenção do RNA de *P. brasiliensis*

O RNA foi extraído através do método de Trizol (SOKOLOVISC et al., 1990) por meio de maceração com nitrogênio líquido e pérolas de vidro. A amostra foi

agitada vigorosamente em 3,5mL de trizol e posteriormente foi centrifugada (1620xg) por 10 minutos. A fase aquosa foi separada e nesta foi adicionado 0,2mL de clorofórmio para cada 0,75mL de trizol recuperado. Após repouso de 10 minutos, a amostra foi centrifugada e a fase aquosa foi novamente separada e nesta foi acrescentada isopropanol, solução de citrato de sódio e cloreto de sódio (0,25mL, 0,4M e 0,8M respectivamente), para cada 0,75mL de trizol inicial. Posteriormente a amostra foi agitada gentilmente, seguido de repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Esta foi centrifugada por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com etanol 75% e nova centrifugação foi realizada por 5 minutos. Este foi seco a temperatura ambiente e suspenso em 30  $\mu$ L de água DEPC (Dietilpirocarbonato) 0,01% e armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.2 Obtenção do cDNA codificante da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*

A síntese da primeira fita de cDNA foi obtida por uma reação contendo 1 $\mu$ g de RNA total e 10pmol/ $\mu$ L da seqüência iniciadora (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'). A reação foi aquecida a  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos. Em seguida foi acrescentado 10pmol/ $\mu$ L do oligodT modificado (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT<sub>(30)</sub>N<sub>1</sub>N, onde n=A, C ou T; N<sub>1</sub>=A, G ou C), 2 $\mu$ L de uma mistura de dNTP (10mM), 2 $\mu$ L de RNaseOUT (40U/ $\mu$ L), 0,4 $\mu$ L de DTT (100nM), 1,2 $\mu$ L de cloreto de magnésio (50mM), 2 $\mu$ L da enzima transcriptase reversa (200U/ $\mu$ L) (RT Superscript II) e 4 $\mu$ L de tampão 5X (Tris-HCL 250mM pH 8,3; KCL 375mM; MgCl<sub>2</sub> 15mM). Esta reação foi aquecida durante 1 hora e 30 minutos a  $42^{\circ}\text{C}$ . Após este período, foi adicionado 80 $\mu$ L de TE (tris HCL 10 nM; EDTA 1mM pH8,0) seguido de aquecimento por mais 7 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . Para a síntese da segunda fita de cDNA foi utilizado 3 $\mu$ L da primeira fita, 10pmol/ $\mu$ L da seqüência iniciadora (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'), 10 $\mu$ L de tampão 10X (Tris-SO<sub>4</sub> 600mM pH8,9, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 180mM), 2 $\mu$ L de TaqHi-Fi e água MilliQ estéril tratada com DEPC 0,01% para volume final de 100 $\mu$ L. As condições de amplificação foram as seguintes: 1 ciclo inicial por 1 minuto a  $95^{\circ}\text{C}$ , seguido por 20 ciclos de desnaturação por 15 segundos a  $95^{\circ}\text{C}$ , anelamento por 30 segundos a  $55^{\circ}\text{C}$ , e extensão por 5 minutos a  $68^{\circ}\text{C}$  e um ciclo final de extensão por 7 minutos a  $68^{\circ}\text{C}$ .

O produto da reação foi purificado a partir do Kit Qiagen segundo recomendações do fabricante.

### **3.3.3 Ligação do cDNA codificante da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* em vetor de clonagem pCR2.1-TOPO**

A subclonagem do cDNA codificante com a região completa da proteína 14-3-3 do isolado 18 de *P. brasiliensis* (acesso no GenBank número AY462124) foi realizada através do vetor de clonagem pCR2.1-TOPO. A reação de ligação foi realizada utilizando-se a proporção 1:10 (vetor/inserto). Inicialmente foi realizada a defosforilação do fragmento de cDNA pela adição da 1  $\mu$ L de fosfatase alcalina, 1  $\mu$ L de tampão (pk buffer) e 0,5  $\mu$ L de DTT 100mM, a reação foi incubada 22°C por 40 minutos, e inativada a 75°C durante 10 minutos, seguida de um banho de gelo por dois minutos. Posteriormente foi realizada a reação de ligação ao vetor adicionando-se 1  $\mu$ L deste (50ng) e 1  $\mu$ L de T4 DNA ligase aos componentes acima. Esta foi incubada a 22°C durante 18 horas.

### **3.3.4 Preparo de bactérias quimiocompetentes *E. coli* DH5 $\alpha$**

Para preparar as bactérias quimiocompetentes, foi utilizado o método do cloreto de cálcio segundo Sambrook et al. (1989). Uma alçada de crescimento de uma colônia previamente isolada em meio LB (Luria-Bertani) (1% Extrato de levedura, 1,6% peptona bacteriológica, 0,5% NaCl, 0,2% glicose e 2% ágar) de *E. coli* DH5 $\alpha$  não competente foi inoculada em 100ml de caldo deste mesmo meio e incubada a 37°C sob agitação de 200g, até densidade ótica de 0,4nm a 0,5nm. As células foram centrifugadas a 4000g durante 15 minutos a 4°C e lavadas com 30mL de solução gelada de cloreto de cálcio 100mM. Estas foram ressuspensas em 8 mL da mesma solução, contendo 10% de glicerol, aliquotadas e estocadas a -80°C.

### **3.3.5 Clonagem em bactérias *E. coli* quimiocompetentes DH5 $\alpha$**

O plasmídeo contendo a seqüência gênica da proteína 14-3-3 (plasmídeo recombinante) foi então inserido em bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes para a transformação das mesmas. Para tanto, o produto total (12  $\mu$ L) da reação de ligação citada acima, foi adicionado em 100  $\mu$ L da linhagem de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetente, seguido de incubação em banho de gelo durante 30 minutos. Posteriormente foi realizado choque térmico em temperatura de 42°C por 2

minutos. Foram adicionados 400 $\mu$ L de meio LB (1% Extrato de levedura, 1,6% peptona bacteriológica, 0,5% NaCl e 0,2% glicose) seguida de incubação a 37°C durante 1h. Após o período de incubação, o plaqueamento das linhagens foi realizado em meio LB (Luria-Bertanni) suplementado com kanamicina 50 $\mu$ g/mL (1% Extrato de levedura, 1,6% peptona bacteriológica, 0,5% NaCl, 0,2% glicose, 2% de ágar e 1 $\mu$ g/mL de kanamicina). Foram adicionados sobre a placa 40 $\mu$ L de X-Gal (20mg/mL) e 20 $\mu$ L de meio LB sem kanamicina. Através de alça de Drigalski foi realizada a semeadura onde estas foram incubadas durante 16 a 18 horas a 37°C em estufa e após crescimento estas foram submetidas à incubação por 6 horas a 4°C.

### 3.3.6 Confirmação

Foi realizada a seleção dos clones positivos (cinco colônias) e foram então avaliadas por PCR para verificar a eficiência desses processos e a presença do inserto. Após esta avaliação os clones foram inoculados individualmente em tubo de ensaio contendo 3 mL de meio LB com kanamicina 1 $\mu$ g/mL (100mg/mL). As culturas foram incubadas a 37°C durante 12 horas até turvação do meio.

### 3.3.7 Restrição dos plasmídeos para clonagem em vetor de expressão

Após a verificação desta PCR, confirmando as colônias que possuíam o plasmídeo recombinante, foi realizada uma miniprep dos cultivos para a extração desses plasmídeos. Para tanto, foi utilizado o kit *FlexiPrep* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante e o DNA obtido, foi quantificado em agarose 0,8%. Com esses dados iniciamos as digestões enzimáticas para colocar o inserto no vetor de expressão (pET32a) e assim iniciar o processo de expressão heteróloga da mesma.

A primeira restrição foi realizada com a enzima *Sal I* (Fermentas) em tampão O, de acordo com as instruções do fabricante, por 3 horas a 37°C. O vetor de expressão (pET32a) também foi clivado com a mesma enzima para prepará-lo para receber o inserto. Após a incubação, realizou-se eletroforese em agarose 0,8% para verificar a eficiência da clivagem. A segunda restrição foi realizada com

a enzima *Xho I* (Promega) em tampão D, de acordo com as instruções do fabricante, por 2 horas a 37°C. O vetor de expressão (pET32a), mais uma vez clivado com a mesma enzima para prepará-lo para receber o inserto. Após a incubação, realizou-se eletroforese em agarose 0,8%, aplicando todo o material obtido na clivagem do inserto e este foi purificado através do gel, utilizando o kit *GFX purifications DNA bands* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação este inserto foi ligado ao vetor de expressão (pET 32a), utilizando a enzima Ligase (Fermentas) por 18h a 16°C.

Assim foi obtido mais um plasmídeo recombinante que foi colocado em bactérias competentes através dos mesmos procedimentos citados acima, que por sua vez, foram capazes de expressar a proteína 14-3-3 recombinante, iniciando então a próxima etapa que consiste na expressão heteróloga da mesma.

### **3.4 Clonagem e expressão heteróloga da proteína 14.3.3 dos isolados de *P. brasiliensis* e purificação da molécula recombinante**

Após a clonagem em vetor de expressão pET32a, os plasmídeos contendo a seqüência da proteína 14-3-3 foram inseridos através de choque térmico em bactérias quimiocompetentes BL21DE3 para a expressão heteróloga da proteína recombinante. Para tanto, essas bactérias foram crescidas em meio LB suplementado com ampicilina 100µg/mL e glicose 2mM e incubadas a 37°C. Após 16h de crescimento, essas bactérias foram novamente semeadas em meio LB suplementado com ampicilina 100µg/mL e incubadas a 37°C sob agitação de 200rpm até atingir  $DO_{600nm}$  de 0,6. Neste ponto, adicionou-se IPTG 0,4mM e incubou-se por diferentes períodos de tempo (0 a 5h) para a determinação das condições ótimas para a indução da proteína recombinante. A cada hora, uma alíquota foi recolhida e avaliada por SDS-Page (LAEMMLI, 1970; STUDIER, 1973).

Para a obtenção da proteína recombinante foi realizada a sonicação. Realizou-se então macro indução, utilizando 0,4mM de IPTG, por 5h a 37°C. Após este período, as células foram centrifugadas, lisadas (50mM fosfato de sódio, 20mM de imidazol, 200mM de cloreto de sódio, 1mM DTT, 1xPLAC, 1mM PMSF)



sonicadas e novamente centrifugadas. O sobrenadante deste processo de lise foi utilizado para a purificação através de cromatografia de afinidade.

Para o processo de purificação utilizou-se coluna de níquel NiNTA-5mL no AKTA FPLC (GE Healthcare) com os seguintes tampões: lavagem (50mM fosfato de sódio, 20mM Imidazol, 300mM cloreto de sódio), eluição (50mM fosfato de sódio, 250mM Imidazol, 300mM cloreto de sódio) e as frações foram recolhidas e analisadas por SDS-Page e o gel foi corado por Coomassie azul brilhante (NEUHOFF et al., 1988).

### **3.5 Construção do homólogo funcional - Obtenção dos transformantes (homólogos funcionais 14-3-3Pb em *S. cerevisiae* pela complementação de homólogos funcionais em *S. cerevisiae*)**

#### **3.5.1 Obtenção da ORF completa da adesina de 30kDa (14-3-3) de *P. brasiliensis***

As ORFs completas foram obtidas através da amplificação com primers desenhados a partir da análise das sequências nucleotídicas da adesina 14-3-3 de interesse depositadas no GeneBank AY462124, esquematizadas a seguir:

Para amplificação da extremidade 3'UTR do gene BMH1 de *S. cerevisiae*:

P1: 5'-CGGGATCCGTGGCAAATAGCTCC-3'

P2: 5'-GCATCTTCGTAACCCATTTTTATCTTTAGTTTATCTTTAAC-3'

Para amplificação da extremidade 5'UTR do gene BMH1 de *S. cerevisiae*:

P3: 5'-TAAACTAAAGATAAAAATGGGTTACGAAGATGCTGTATATC-3'

P4: 5'-GATTTATCAGAATACCTACTCAGCGGCCTTAGGAGC-3'

Para amplificação da região codificante da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis*: P5:

5'-AAGGCCGCTGAG TAGGTATTCTGATAAATCTAAAGAG-3'

P6: 5'-CGGGATCCGATGCGACATTTACCC-3'.

A amplificação dos fragmentos foi realizada através de PCR utilizando uma enzima de alta fidelidade. Após a amplificação, realizou-se a purificação utilizando kit Fermentas seguindo as especificações do fabricante e posterior análise em gel de agarose 0,8%. A partir dos fragmentos purificados realizou-se *overlap*, para a obtenção do fragmento híbrido. Para tanto utilizou-se 50ng de cada fragmento. Na primeira etapa uniu-se 5'UTR de *S. cerevisiae* + 14-3-3 e *P. brasiliensis* e na segunda etapa uniu-se 3'UTR com o fragmento obtido na primeira *overlap*. Esses fragmentos obtidos foram novamente purificados utilizando o kit Fermentas, avaliados em agarose 0,8% e utilizados para a transformação em leveduras.

#### **3.5.2 Clonagem por complementação do gene 14-3-3**

A estratégia para a montagem do plasmídeo para a inserção da 14-3-3 foi baseada em Roberts et al.(1997) e a clonagem foi realizada em nos vetores listados abaixo:

pSV59 – pRS305 (Addgene) 5504pb – vetor da série pBLUESCRIPT baseado integração (ATCC 77138-77141) diferentes no gene marcador selecionável levedura. As principais características deste plasmídeo são: LEU2 - f1 ori (NaeI) - promotor T7 - / lacZ 'MCS - promotor T3 - pMB1 ori - bla.

pSV60 – pRS306 (Addgene) 4373pb – vetor da série pBLUESCRIPT baseado integração (ATCC 77138-77141) diferentes no gene marcador selecionável levedura. As principais características deste plasmídeo são: URA3 - f1 ori (NaeI) - promotor T7 - / lacZ 'MCS - promotor T3 - pMB1 ori - bla.

pSV64 – pRS425 (Addgene) 6849pb - A ordem das principais características deste plasmídeo é: ori (f1) - lacZ - T7 promoter - MCS (KpnI-SacI) - promotor T3 - laci - ori (pMB1) - AMPR - ori (2 micron) - LEU2. Contém o REP3 e seqüências FRT necessárias para a propagação de alto número de cópias em levedura. Em *S. cerevisiae*, o número de cópias é de cerca de 20 por células haplóides.

### **3.5.3 Transformação de *S. cerevisiae* para obtenção do hospedeiro contendo o homólogo funcional 14-3-3Pb.**

As cepas de *S. cerevisiae* preparadas previamente, contendo as transformações *bmh1:HIS3* *bmh2:HIS3* foram adquiridas comercialmente e cultivadas em meio YEPD (Extrato de levedura, peptona e dextrose) para uma concentração final de  $10^7$  UFC/ml. As cepas foram preparadas para aquisição do plasmídeo contendo a 14-3-3 utilizando o método do acetato de lítio através da adição de solução de acetato de lítio, ácido acético e PEG. A seleção dos transformantes contendo o gene homólogo 14-3-3 foi realizada em meio adequado de acordo com seus marcadores contidos nos plasmídeos construídos e com o meio contendo 5-FOA (5-fluorootic acid) para identificação das cepas *S. cerevisiae* 14-3-3Pb

### **3.6Preparo e padronização do inóculo de *S. cerevisiae***

As amostras de *Saccharomyces cerevisiae* WT,  $\Delta$ *bmh1* e  $\Delta$ *bmh2* foram cultivadas em meio YEPD *overnight* a 25°C sob agitação de 200 rpm. Após o crescimento, as leveduras foram centrifugadas, retirou-se o meio de cultura, lavou-se com PBS duas vezes e foi homogeneizado em PBS. Foi adicionada a um volume de 10 ml de PBS estéril, quantidade suficiente do fungo correspondente a cada amostra

para obtenção de suspensão turva e homogênea, correspondente a  $10^6$  cels/mL através de leitura em espectrofotômetro ( $D.O.600nm = 0.2$ ).

### **3.7 Ensaio de Infecção**

Os ensaios de infecção foram realizados em duplicata em placas de 24 poços contendo no interior uma lamínula redonda. Para os testes, foi padronizada uma suspensão celular de  $10^6$  cels/mL. Assim, após a tripsinização e homogeneização da suspensão celular, 0.2mL desta foi retirada da garrafa, e diluída em 1.8mL de meio de cultivo (meio HAM-F12) e foi feita a contagem das células em hemocítmetro, para que, através de diluições adequadas, fosse ajustada a concentração desejada. Ao término desta etapa, 0,5mL dessa suspensão de células foi dispensado em cada orifício da placa e estas incubadas a  $36.5^{\circ}C$  por 24 horas, para que a monocamada celular se formasse sobre a lamínula, sendo, a partir daí, utilizada para os ensaios de infecção.

Após a formação da monocamada celular, o sobrenadante da cultura foi desprezado e as células foram lavadas três vezes com 1mL cada de PBS 0.05M, pH7.2 estéril. Em seguida, cada poço (exceto controle de células normais - CN) foi inoculado com 300ul da suspensão padronizada de cada amostra em PBS acrescida de 300ul de meio de cultivo (meio HAM-F12 desprovido de soro fetal bovino).

As células epiteliais foram avaliadas nos períodos de infecção de 30min, 1h, 2h, 5h e 24h e foram feitos controles de células normais. Decorrido os diferentes períodos de infecção, o meio com a suspensão foi descartado e as células foram lavadas três vezes com 500ul de PBS 0.05M pH 7.2, eliminando-se, desta forma, leveduras não aderentes às culturas celulares e as células infectadas foram fixadas com paraformaldeído a 4% (500ul por orifício) por um período de 1 hora à temperatura ambiente.

#### **3.7.1 Coloração das lamínulas**

Após o tempo de fixação das células, o paraformaldeído a 4% foi descartado e as lamínulas foram lavadas três vezes com 500ul de PBS 0.05M, pH 7.2, e secas à temperatura ambiente. A seguir, as células epiteliais foram coradas pelo May Grünwald-Giemsa.

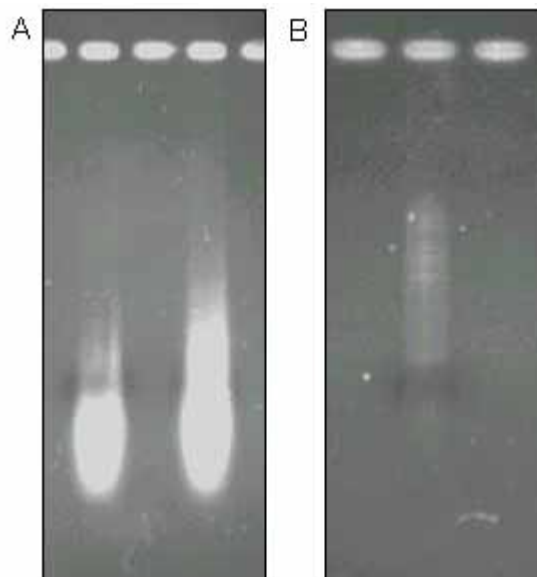
Após a coloração foram contadas 5000 células epiteliais e a quantidade de *S. cerevisiae* presentes nas células, para calcular a porcentagem de infecção e analisar os dados obtidos, utilizando o software Origin

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Obtenção do RNA e clonagem do cDNA codificante da proteína 14-3-3 (30kDa) do isolado 18 de *P. brasiliensis*

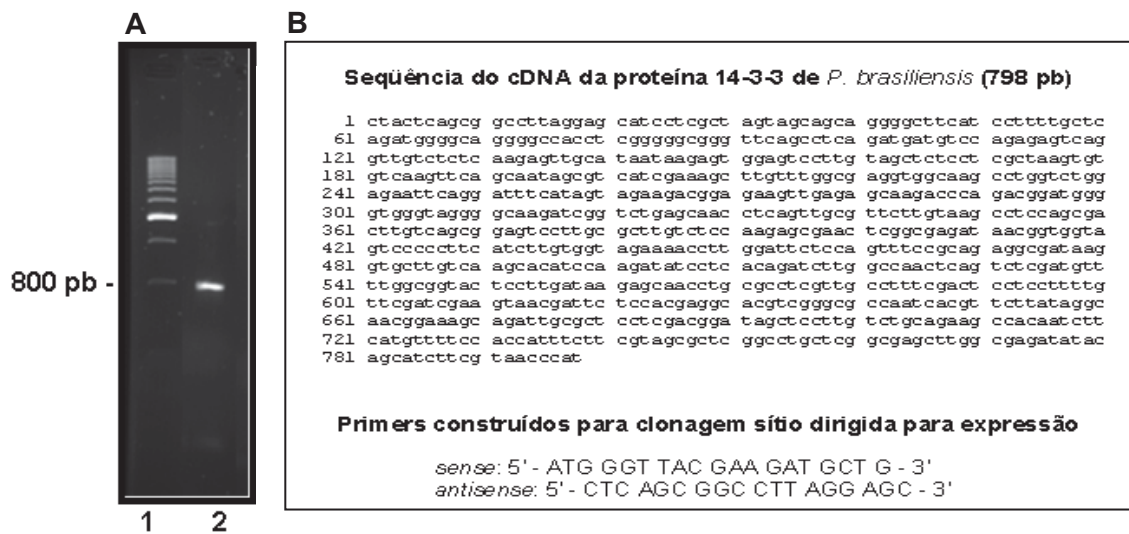
O RNA do isolado 18 de *P. brasiliensis* foi obtido e a sua concentração e pureza foram determinadas a partir de leitura espectrofotométrica em 260nm e 280nm. Obteve-se a presença de 4,0µg de RNA e a pureza na proporção de 1,8.(figura 1-A)

A figura 1-B mostra o cDNA em gel de agarose 1% obtido por RT-PCR após a purificação



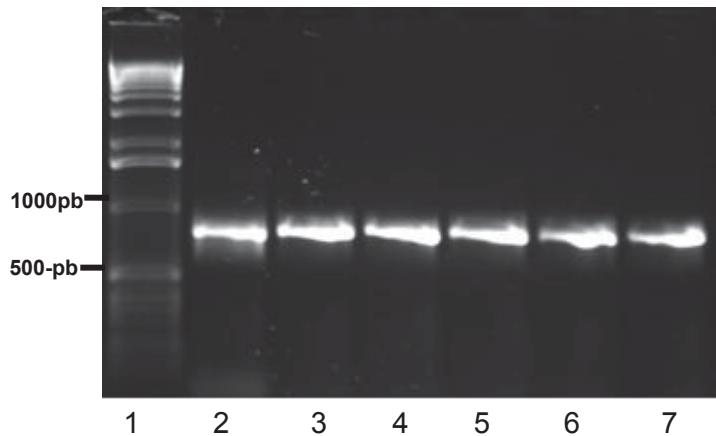
**Figura 1:** Eletroforese em agarose 1% corada com brometo de etídio. **A:** Extração de RNA do isolado 18 de *P. brasiliensis*. **B:** cDNA sintetizado e purificado.

O cDNA obtido foi então utilizado para a síntese do inserto referente a região completa da proteína 14-3-3 (acesso no GenBank número AY462124) (ASSIS et al., 2003). O inserto foi amplificado por PCR utilizando iniciadores sense e antisense desenhados especificamente para esta seqüência. A figura 2 mostra o inserto obtido e a seqüência nucleotídica completa da proteína.



**Figura 2-A.** Produto resultante amplificação da seqüência de cDNA da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* utilizando os primers específicos desenhados. **1:** marcador de massa molecular 1kb (Invitrogen); **2:** produto amplificado de aproximadamente 800pb (inserto). **2-B** Esquema representativo da seqüência de cDNA da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* (acesso no GenBank número AY462124) e dos iniciadores desenhados especificamente para clonagem sítio dirigida para expressão no vetor pCR2.1-TOPO.

Em seguida, foi realizada a ligação deste inserto no vetor de clonagem pCR2.1-TOPO e após a ligação, o plasmídeo contendo a seqüência gênica da proteína 14-3-3 (plasmídeo recombinante) foi então transformado em bactérias *E. coli* DH15 $\alpha$  quimiocompetentes. A figura 3 mostra os insertos amplificados por PCR, contidos nos plasmídeos das 5 colônias de bactérias selecionadas para confirmação da transformação.



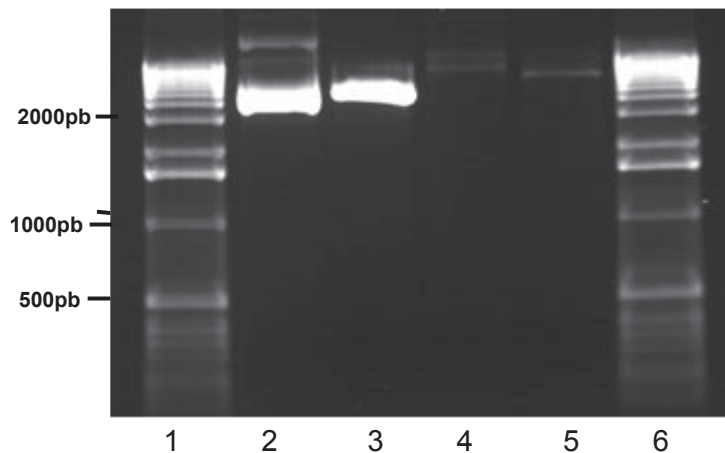
**Figura 3:** PCR para confirmação da presença do inserto nas colônias selecionadas. **1:** marcador molecular 1kb (Invitrogen); **2:** controle positivo (produto de PCR), **3 a 7:** PCR das colônias de **1 a 5**, respectivamente, demonstrando a amplificação do inserto como resultado positivo da clonagem.

Após a verificação desta PCR, confirmando as colônias que possuíam o plasmídeo recombinante, foi realizada uma miniprep para a extração desses plasmídeos. O DNA obtido foi quantificado em agarose 0,8% por eletroforese e a quantidade obtida foi de 1  $\mu$ g de DNA por colônia de partida. Com este material iniciamos as digestões enzimáticas para colocar o inserto no vetor de expressão (pET32a) e assim iniciar o processo de expressão heteróloga da mesma.

A figura 4 mostra o plasmídeo recombinante clivado e não clivado após eletroforese em agarose 0,8%, para o controle da eficiência da abertura do vetor. A primeira restrição foi realizada com a enzima *Sal I* por 3 horas a 37°C. O vetor de expressão (pET32a) também foi clivado com a mesma enzima para prepará-lo para receber o inserto.

A segunda restrição foi realizada com a enzima *Xho I*, por 2 horas a 37°C. O vetor de expressão (pET32a), foi mais uma vez clivado com a esta enzima para prepará-lo para receber o inserto. Após a incubação, realizou-se eletroforese em agarose 0,8%, aplicando todo o material obtido na clivagem do inserto e este foi purificado através da excisão do gel. Após a purificação este inserto foi ligado ao vetor de expressão (pET 32a), utilizando a enzima Ligase (Fermentas) por 18h a 16°C.

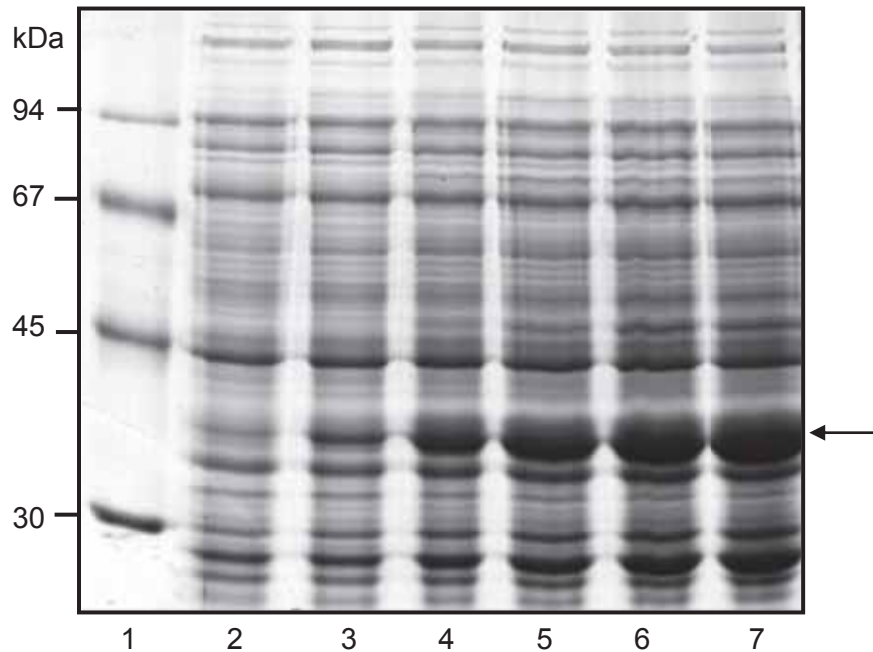




**Figura 4:** Restrição do plasmídeo recombinante. **1 e 6:** marcador molecular 1kb (Invitrogen); **2:** plasmídeo recombinante íntegro; **3:** plasmídeo recombinante clivado com *Sal I*; **4:** vetor de expressão (pET32a) íntegro; **5:** vetor de expressão (pET32a) clivado com *Sal I*.

Assim foi obtido mais um plasmídeo recombinante que foi colocado em bactérias competentes que por sua vez, foram capazes de expressar a proteína 14-3-3 recombinante, iniciando então a próxima etapa que consiste na expressão heteróloga da mesma.

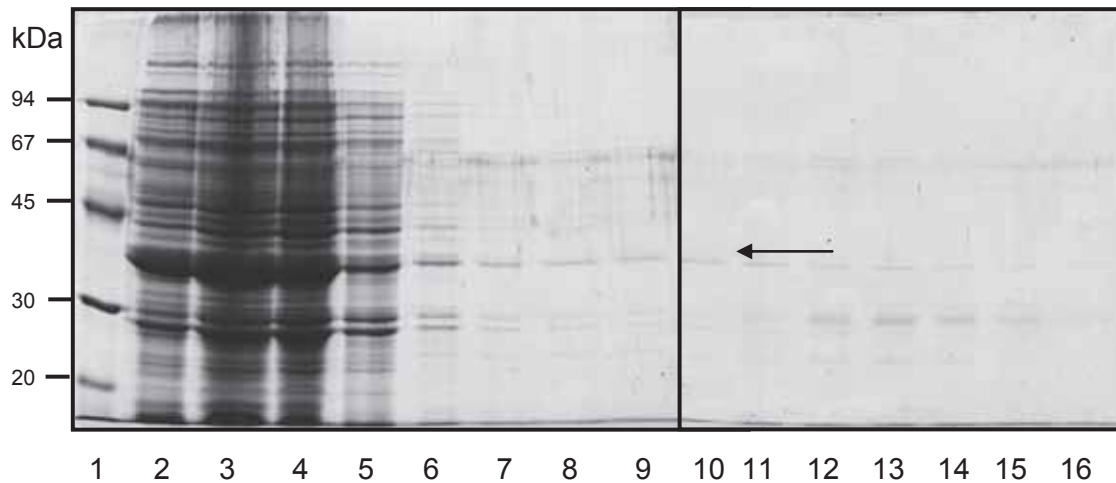
Após a clonagem em vetor de expressão pET32a, os plasmídeos contendo a sequência da proteína 14-3-3 foram inseridos em bactérias quimiocompetentes BL21DE3 para a expressão heteróloga da proteína recombinante. Posteriormente, a fim de se determinar uma cinética de condições de indução na produção da proteína, foi realizado o crescimento dessas bactérias em meio LB suplementado com ampicilina e estas foram incubadas a 37°C sob agitação de 200rpm até atingir  $DO_{600nm}$  de 0,6. Neste ponto, adicionou-se IPTG e incubou-se por diferentes períodos de tempo para a determinação das condições ótimas para a obtenção da proteína recombinante.



**Figura 5:** Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-Page) e coloração por ComassiePhast Gel R350. Verificação do teste de indução, 1: Marcador de massa molecular; 2: alíquota após 0h, 3:1h, 4:2h, 5:3h, 6:4h e 7:5h de indução com 0,4mM de IPTG a 37°C, a seta indica a expressão da proteína recombinante com massa molecular acima de 30kDa devido à presença da cauda de histidina para posterior purificação.

Após a confirmação da obtenção da proteína recombinante e comprovação de sua solubilidade após sonicação, realizou-se a macro indução, utilizando 0,4mM de IPTG, por 5h a 37°C. Após este período, as células foram centrifugadas, lisadas, sonicadas e novamente centrifugadas. O sobrenadante deste processo de lise foi utilizado para a purificação através de cromatografia de afinidade.

O processo de purificação foi realizado em coluna de níquel NiNTA-5mL no AKTA FPLC e as frações foram recolhidas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-Page) (Figura 6).

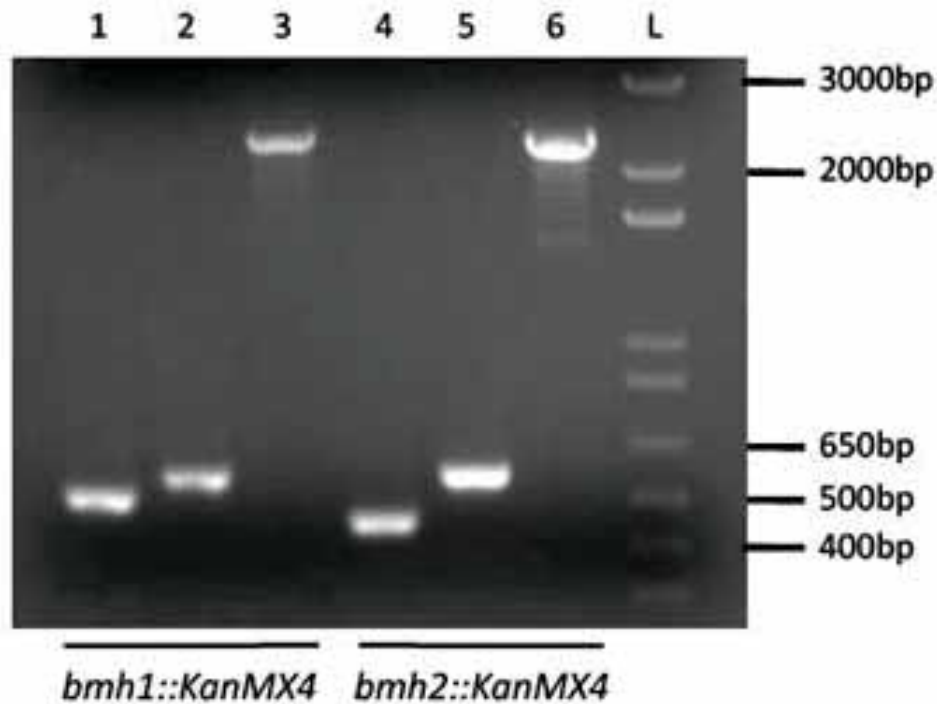


**Figura 6:** Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-Page). Coloração por ComassiePhast Gel R350, para verificar purificação da proteína 14-3-3 recombinante através de cromatografia de afinidade com coluna de níquel. **1:** Marcador de massa molecular, **2 a 16:** frações da purificação, a seta indica a proteína recombinante parcialmente purificada.

#### **4.2 Construção do homólogo funcional - Obtenção dos transformantes (homólogos funcionais 14-3-3Pb em *S. cerevisiae* pela complementação de homólogos funcionais em *S. cerevisiae*)**

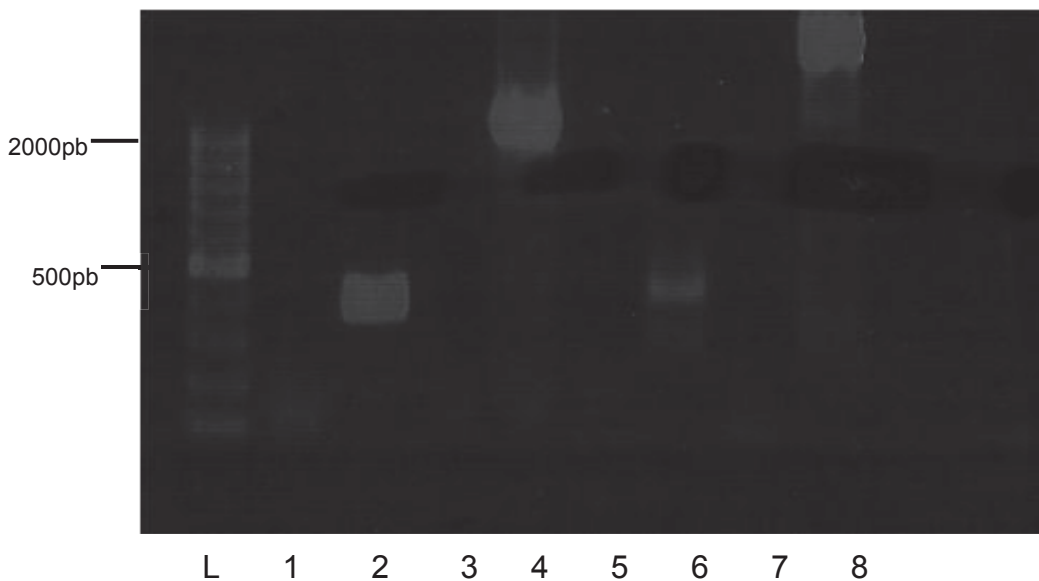
De acordo com estudos realizados por Van Heusden et al. (2006) *S. cerevisiae* possui duas isoformas da proteína 14-3-3, Bmh1 e Bmh2, que possuem entre as duas 92% de identidade. O alinhamento realizado entre as sequências de aminoácidos da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* e da isoforma Bmh1 de *S. cerevisiae*, demonstrou uma identidade de 76%. A análise realizada para a isoforma Bmh2 revelou uma identidade ainda maior, de 80%. (Figura 7)





**Figura 8:** Confirmação do nocaute dos genes de BMH1 e BMH2. Eletroforese dos produtos de PCR a partir do DNA genômico das linhagens *bmh1::KanMX4* e *bmh2::KanMX4*. As canaletas **1, 2 e 3** correspondem, respectivamente, à amplificação dos fragmentos ConfirmAbmh1 + VZO897 (extremidade 5' da recombinação – 523 bp), ConfirmDbmh1 + VZO898 extremidade 3' da recombinação – 585 bp) e ConfirmAbmh1 + ConfirmDbmh1 (gene inteiro nocauteado – 2326 bp). As canaletas **4, 5 e 6** correspondem, respectivamente, à amplificação dos fragmentos ConfirmAbmh2 + VZO897 (extremidade 5' da recombinação – 467 bp), ConfirmDbmh2 + VZO898 (extremidade 3' da recombinação – 590 bp) e ConfirmAbmh2 + ConfirmDbmh2 (gene inteiro nocauteado -2275 bp). **L** corresponde ao padrão de peso molecular de 1Kb (Invitrogen).

Na etapa seguinte, foi realizada a amplificação dos fragmentos 5'UTR e 3'UTR a partir do DNA genômico de *S. cerevisiae* bem como a amplificação da região codificante da proteína 14-3-3 a partir de cDNA de *P. brasiliensis*. Com os fragmentos obtidos e purificados, realizou-se 2 overlaps seqüenciais para a obtenção do fragmento híbrido (Figura 9).

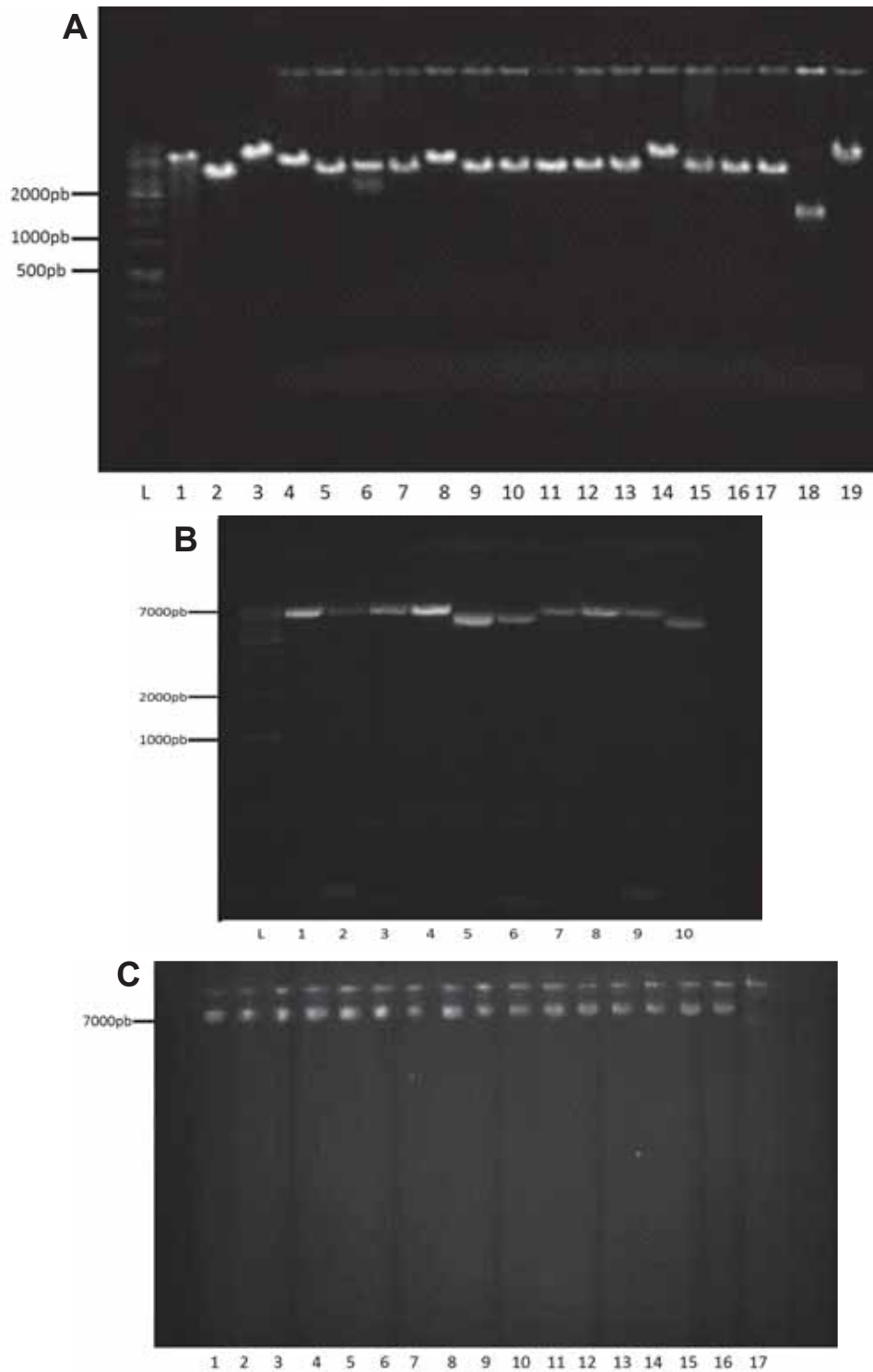


**Figura 9:** Construção do fragmento híbrido. **L:** marcador molecular 1kb (Fermentas); **1, 3, 5, e, 7:** controle negativos de cada reação; **2:** 5'UTR *S. cerevisiae*; **4:** região codificante 14-3-3 de *P. brasiliensis*; **6:** 3'UTR *S. cerevisiae*; **8:** BMH1 de *S. cerevisiae*.

Com o fragmento montado (híbrido: 5'UTR+Pb14-3-3+3'UTR) e BMH amplificado a partir do DNA genômico de *S. cerevisiae*, foram realizadas ligações com os plasmídeos selecionados, onde o híbrido foi ligado aos plasmídeos pSV59 – centromérico e pSV64 – 2  $\mu$ m e BMH foi ligado ao plasmídeo pSV60.

Estes plasmídeos recombinantes foram colocados em bactérias DH10B ultracompetentes através de choque térmico. Após o desenvolvimento das colônias, estas foram selecionadas e crescidas em meio LB suplementado com 50ug/mL de ampicilina overnight a 37°C com agitação de 200rpm.

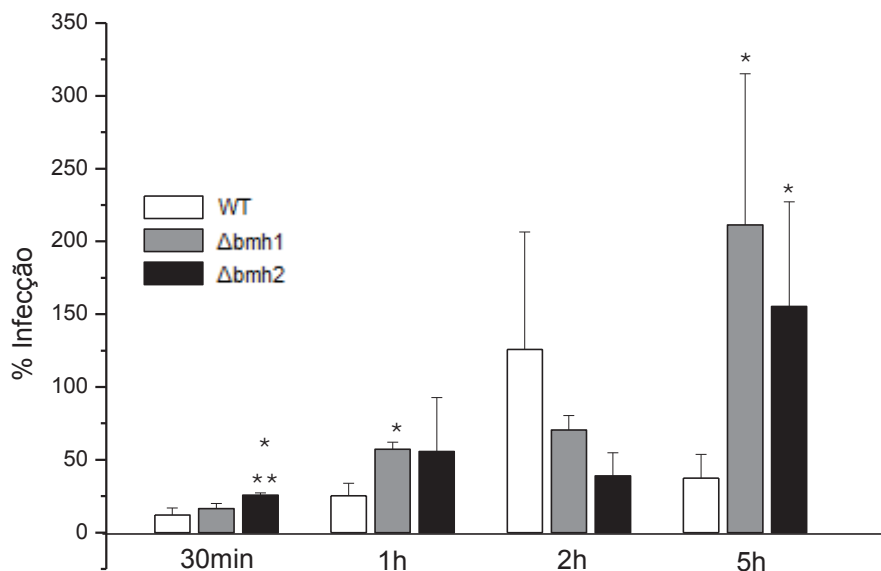
No dia seguinte, foi realizada a extração plasmidial das mesmas, através do método da lise alcalina e foi verificada a presença dos insertos através da remoção dos mesmos pelo uso da enzima *BamHI*. Esse diagnóstico por restrição foi realizado por 3h a 37°C e ao término do período de incubação as amostras foram inativadas e analisadas em agarose 0,8%, como apresentado na figura 10.



**Figura 10:** Confirmação da presença dos insertos nas colônias selecionadas **L:** marcador molecular 1kb (Fermentas); **A:** Rastreamento através de restrição utilizando *BamHI* no plasmídeo pSV60, demonstrando positividade no clone 15 (canaleta 18). **B:** Rastreamento através de restrição utilizando *BamHI* no plasmídeo pSV64, demonstrando positividade nos clone 5 e 6 (canaletas 5 e 6). **C:** Rastreamento através de restrição utilizando *BamHI* no plasmídeo pSV59, demonstrando positividade no clone 17 (canaleta 17).

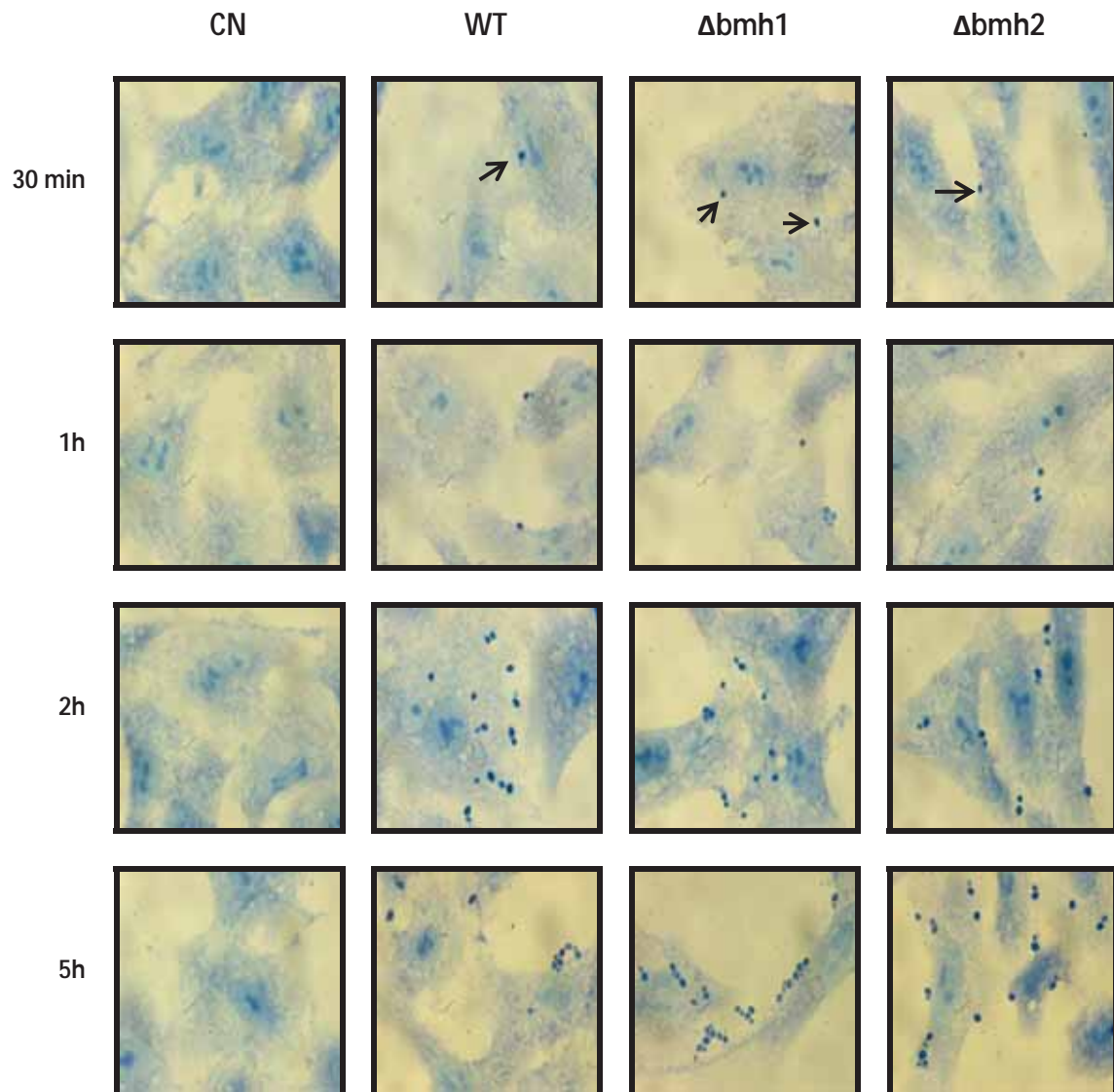
### 4.3 Ensaio de Infecção

O ensaio de infecção foi realizado com as linhagens de *S. cerevisiae wild type*,  $\Delta bmh1$  e  $\Delta bmh2$  e os períodos de infecção analisados foram de 30 minutos, 1, 2, 5 e 24 horas. Foram realizadas contagens do número total de fungos em 5000 células, determinando-se a percentagem total de infecção. Foi possível verificar aumento na percentagem de infecção do tipo selvagem (wt) com 2 horas de infecção em relação aos outros dois mutantes,  $\Delta bmh1$  e  $\Delta bmh2$ , enquanto o aumento da taxa de infecção dos mutantes em relação ao selvagem foi observado com 5 horas, como mostrado nas figuras 11 e 12. Os dados de 24 horas não foram apresentados devido à demasiada destruição celular na presença da levedura *S. cerevisiae*.



**Figura 11:** Amostras de *S. cerevisiae* quanto à capacidade de infectar células A549, por períodos de incubação de 30 minutos, 1, 2 e 5 horas. O gráfico representa a percentagem de infecção.





**Figura 12:** Imagens da cinética de interação das diferentes amostras de *S. cerevisiae* quanto à capacidade de infectar células A549, por períodos de incubação de 30 minutos, 1, 2 e 5 horas.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui duas isoformas de proteínas da família 14-3-3, Bmh1 e Bmh2, codificadas pelos genes *BMH1* e *BMH2*, respectivamente. Essas isoformas possuem 92% de identidade entre elas e cerca de 60% de identidade com a isoforma  $\epsilon$  de mamífero (VAN HEUSDEN et al., 1995). O alinhamento realizado entre as sequências de aminoácidos da proteína 14-3-3 de *Paracoccidioides brasiliensis* (GenBank AY462124) e da isoforma Bmh1 de *Saccharomyces cerevisiae* revelou uma identidade de 76%. A mesma análise realizada para a isoforma Bmh2 revelou um nível de identidade ainda maior: 80%. Além disso, foi possível observar que região N-terminal da proteína 14-3-3 de *P. brasiliensis* é extremamente conservada em relação a ambas as isoformas Bmh1 e Bmh2. Entretanto a extremidade C-terminal apresenta uma grande variação. Os dados obtidos através do alinhamento das sequências de aminoácidos estão de acordo com dados da literatura que mostram que a região N-terminal de diferentes isoformas de proteínas da família 14-3-3 é bastante conservada enquanto a porção C-terminal constitui uma região variável (OBŠILOVÁ et al., 2008).

A deleção de *BMH1* ou *BMH2* individualmente em *S. cerevisiae* leva a uma redução da taxa de crescimento enquanto a deleção de ambos os genes simultaneamente é letal para a maioria das linhagens utilizadas em laboratório (VAN HEUSDEN et al., 1995). Foi observado que quatro isoformas de proteínas da família 14-3-3 de *Arabidopsis*, uma isoforma de humano e uma de *Dictyostelium* são capazes de complementar o fenótipo de letalidade causado pela deleção de *BMH1* e *BMH2* (VAN HEUSDEN et al., 1996).

Esses dados mostram que as isoformas da família 14-3-3 de diferentes organismos possuem funções conservadas ao longo da evolução. Assim, espera-se que a proteína recombinante de *P. brasiliensis*, quando expressa em *S. cerevisiae*, seja capaz de complementar o fenótipo de letalidade provocado pela deleção dos genes *BMH1* e *BMH2*. Esse passo está em andamento uma vez que uma série de problemas foi encontrada durante a clonagem. Até o momento, os plasmídeos foram construídos (pSV60+BMH de *S. cerevisiae*; pSV59 + híbrido oriundo das overlaps, pSV60 + híbrido oriundo das overlaps) e estão sendo inseridos nas leveduras para observação do fenótipo.

Além disso, ensaios de infecção foram realizados e foi possível observar aumento na porcentagem de infecção do tipo selvagem (wt) com 2 horas de infecção em relação aos mutantes, enquanto o aumento da taxa de infecção dos mutantes em relação ao selvagem foi observado com 5 horas. É possível e sugerir, uma participação da proteína 14-3-3 (presente no tipo selvagem) no processo infectivo a partir de 2 horas, fato que já foi observado na interação de *P. brasiliensis* com células epiteliais (Monteiro da Silva et al., 2007).

Assim, foi possível clonar, expressar em vetor bacteriano e purificar através de cromatografia de afinidade seguida por eletroeluição a proteína 14-3-3 recombinante de *P. brasiliensis*. Clonar a região codificante desta proteína em fusão com as regiões 5'UTR e 3'UTR de *S. cerevisiae* para a obtenção dos plasmídeos para a transformação das leveduras e assim verificar o fenótipo das mesmas para a confirmação da complementariedade funcional deste gene. Ainda, realizamos experimentos de infecção e verificamos diferentes perfis de infecção entre o tipo selvagem e os mutantes,  $\Delta$ bmh1 e  $\Delta$ bmh2, constatando aumento da taxa de infecção do tipo selvagem em 2 horas, enquanto com os mutantes, esse aumento foi observado a partir de 5 horas. Todas as informações contribuíram para o maior conhecimento da patogenicidade deste fungo, vislumbrando assim um possível bloqueio dos alvos iniciais envolvidos na interação parasito-hospedeiro.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRE, D. C., LOPES, J. D., FRANCO, M. F., VAZ, C. A., CALICH, V. L. Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. **Microbes Infect.**, v. 6. p. 549-558, 2004.
- ANDREOTTI PF, MONTEIRO DA SILVA JL, BILAO AM, SOARES CM, BENARD G., SOARES CP, MENDES-GIANNINI MJS. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.** v.5, p.875-81, 2005
- BARR, MAUREEN M. Super models. **Physiol Genomics.** v.13, p.15-24, 2003.
- BENARD, G., M. FRANCO. Paracoccidioidomycosis, *In* W. G. Merz and R. J. Hay (ed.), **Topley Wilson's medical mycology**, 10<sup>th</sup> ed., p. 541–555, 2005.
- BRUCKMANN A, STEENSMA H Y, TEIXEIRA DE MATTOS, M J, VAN HEUSDEN, G P H. Regulation of transcription by *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins. **Biochem J.**; 382: 867-875, 2004
- CASADEVAL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3703-3713, 1999.
- CASTRO, N. S., CASTRO, K. P., ORLANDI, I., FEITOSA, L. S., SILVA, L. K. R., VAINSTEIN, M. H., BAO, S. N., VAI, M., SOARES, C. M. A. Characterization and functional analysis of the  $\beta$ -1,3-glucanosyltransferase 3 of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Yeast Res.**, v. 9, p. 103-113, 2009.
- COUTINHO, Z. F., SILVA, D., LAZERA, M., PETRI, V., OLIVEIRA, R. M., SABROZA, P. C., WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad. Saúde Pública**, v. 18, p. 1441-1454, 2002.
- FILLER SG, SHEPPARD DC. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. **PLoS Pathog**; v.2 p.129,2006
- FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 5-18, 1986.

FRANCO M, LACAZ CS, RESTREPO-MORENO A, DEL NEGRO G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: **CRC Press**, 1994.

FU, H., SUBRAMANIAN, R. R., MASTERS, S. C. 14-3-3 proteins: structure, function and regulation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 40, p. 617-647, 2000.

GOFFEAU A, BARRELL BG, BUSSEY H, DAVIS RW, DUJON B, FELDMANN H, GALIBERT F, HOHEISEL JD, JACQ C, JOHNSTON M, LOUIS EJ, MEWES HW, MURAKAMI Y, PHILIPPSSEN P, TETTELIN H, OLIVER SG. Life with 6000 genes. **Science.**, v.25, p.546-567, 1996

HAN, D. C., RODRIGUEZ, L. G., GUAN, J. L. Identification of a novel interaction between integrin beta 1 and 14-3-3beta. **Oncogene**, v. 3, p. 346-357, 2001

HANNA, S. A.; MONTEIRO da SILVA, J. L.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 877-884, 2000.

KRAUS, P. R., HOFMANN, A. F., HARRIS, S. D. Characterization of the *Aspergillus nidulans* 14-3-3 homologue, ArtA. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 23, p. 61-66, 2002

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

LEE, D. H., KIM, M. D., RYU, Y. W., SEO, J. H. Cloning and Characterization of CmGPD1, the *Candida magnoliae* homologue of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p. 1324-1333, 2008.

LENZI, H. L.; CALICH, V. L. G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; XIDIEH, C. F.; MIYAJI, M.; MOTA, E. M.; MACHADO, M. P.; RESTREPO, A. Two patterns of extracellular matrix expression in experimental paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 115-119, 2000

McEWEN, J. G., BEDOYA, V., PATINO, M. M., SALAZAR, M. E., RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 165-175, 1987.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; TAYLOR, M. L.; BOUCHARA, J. B et al. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med. Mycol.**, v.38, p. 113-123, 2000.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; HANNA, S. A.; MONTEIRO DA SILVA, J. L.; ANDREOTTI, P. F.; BENARD, G.; LENZI, H. L.; SOARES, C. P. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes Infect.**, v. 6, p. 882-891, 2004.

MENDES-GIANNINI, M.J.; SOARES, C.P.; DA SILVA, J.L.; ANDREOTTI, P.F. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. FEMS Immunol. **Med. Microbiol.**, v. 45, p. 383-394, 2005.

MENDES-GIANNINI, M.J., ANDREOTTI, P.F., VINCENZI, L.R., DA SILVA, J.L., LENZI, H.L., BENARD, G., ZANCOPE-OLIVEIRA, R., DE MATOS GUEDES, H.L., SOARES, C.P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect.**, v.6, p.1550-9, 2006.

MONTEIRO DA SILVA JL, ANDREOTTI PF, BENARD G, SOARES CP, MIRANDA ET, MENDES-GIANNINI MJ. Epithelial cells treated with genistein inhibit adhesion and endocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antonie Van Leeuwenhoek**.v. 92, p. 129-35. 2007

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v.9, p.255-262, 1988.

OBSILOVA V, SILHAN J, BOURA E, TEISINGER J, OBSIL T. 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. **Physiol Res.**,v.57, p.11-21, 2008.

PLAINE, A., WALKER, L., COSTA, G., MORA-MONTES, H. M., MCKINNON, A., GOW, N. A. R., GAILLARDIN, C., MUNRO, C., RICHARD, M. L. Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: Roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, p. 1404-1414, 2008.

PRADO, M.; DA SILVA, M.B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: review from 1996-2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 104, p. 513-521, 2009

RAPPLEYE CA, GOLDMAN WE. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu Rev Microbiol** 2006; 60: 281-303.

RESTREPO, A., DE BEDOUT, C., CANO, L. E., ARANGO, M. D., BEDOYA, V. Recovery of *Paracoccidioides brasiliensis* from a partially calcified lymph node lesion by microaerophilic incubation of liquid media. **Sabouraudia**, v. 19, p. 295-300, 1981

RESTREPO, A., McEWEN, J. G., CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v. 39, p. 233-241, 2001.

ROBERTS RL, MÖSCH HU, FINK GR. 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. **Cell.** v.89, p.1055-65. 1997

SAMBROOK, J.; AND RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring. **Harbor Laboratory Press**, 2001.

SAN-BLAS, G., NINO-VEJA, G., ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 225-242, 2002.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.**, v. 79, p. 237-248, 1973.

TORRES F. A., VILAÇA, R., PEPE DE MORAES, L. M., REIS, V. C., FELIPE, M. S. Expression of a kexin-like gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Med Mycol**, Jun;46(4):385-8, 2008.

VAN HEUSDEN, G. P., STEENSMA, H. Y. Yeast 14-3-3 proteins. **Yeast**, v. 3, p. 159-171, 2006