

ANÁLISE PROTEÔMICA DE PROTEÍNAS SECRETADAS POR *Paracoccidioides brasiliensis*

Simone Schneider, WEBER; Ana Flávia Alves PARENTE; Juliana Alves PARENTE; Clayton Luiz BORGES ; Alexandre Melo BAILÃO; Célia Maria de Almeida SOARES

Laboratório de Biologia Molecular / ICB II / UFG, Goiânia /GO
e-mail: swbiotecnologia@yahoo.com.br

Palavras-chaves: secretoma, proteínas extracelulares, *Paracoccidioides brasiliensis*

1- Introdução

Paracoccidioides brasiliensis é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), uma das mais frequentes micoses sistêmicas que afeta a população rural da América Latina (Restrepo & Tobón, 2005). *P. brasiliensis* é um fungo termo-dimórfico, aspecto importante como mecanismo de virulência e de patogenicidade. A transição entre as morfologias de micélio e levedura constitui-se em uma etapa essencial para o sucesso no estabelecimento da infecção e interação com o hospedeiro (San-Blas *et al.*, 1987). As interações patógeno-hospedeiro refletem um equilíbrio entre as defesas do hospedeiro e mecanismos de virulência de patógenos. A sobrevivência dos fungos patogênicos em hospedeiros humanos depende do escape do sistema imune humano e da adaptação ao ambiente do hospedeiro. A primeira linha de defesa encontrada pelo fungo após a infecção é a fagocitose de macrófagos pulmonares. A sobrevivência de *P. brasiliensis* em macrófagos e sangue inclui a expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo, térmico e nutricional, bem como de genes associados à manutenção da integridade da parede celular (Mendes-Giannini *et al.*, 2008)

A capacidade de fungos patogênicos para desenvolver respostas multifacetadas para a ampla variedade de estressores presentes no ambiente do hospedeiro é de extrema importância para a virulência e patogênese (Ranganathan & Garg, 2009). Essas respostas incluem uma gama de moléculas que facilitam a adesão, invasão, inativação das defesas do hospedeiro e alteração ou destruição das células do hospedeiro. Muitos deles são fatores extracelulares, secretados ou associadas à parede celular (Nombela *et al.*, 2006; Holbrook *et al.*, 2011). Proteínas extracelulares são conhecidas por desempenhar funções muito importantes, tais como: captação de nutrientes, comunicação célula à célula e detoxificação do ambiente (Bonin-Debs *et al.*, 2004). Mais especificamente, proteínas secretadas por microrganismos patogênicos parecem desempenhar papéis importantes na virulência (Tjalsma *et al.*, 2004).

Em células eucarióticas, a via clássica de secreção envolve o reconhecimento de uma sequência sinal em proteínas a serem secretadas através do Complexo de Golgi (Schatz & Dobberstein, 1996). Em adição à via clássica de secreção, tem sido descrito a existência de vários tipos distintos de rotas de transporte não clássico (Nombela *et al.*, 2006; Nickel, 2005). Várias proteínas, sem a sequência sinal e funcionalmente ativas, tem sido descritas no meio extracelular (Nombela *et al.*, 2006; Cuervo *et al.*, 2009; Nickel, 2009; Chaves *et al.*, 2009). Análises proteômicas do conteúdo de vesículas extracelulares em *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* suportam a hipótese que o transporte através de vesículas é um mecanismo geral para transportar macromoléculas relacionadas à virulência e desempenham um papel importante na interação patógeno-hospedeiro (Rodrigues *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2008). Mais recentemente, foi descrito em *P. brasiliensis* vesículas extracelulares transportando moléculas antigênicas que foram reconhecidas por soro de pacientes com PCM (Vallejo *et al.*, 2011).

2- Material e Métodos

P. brasiliensis Pb01 (ATCC-MYA-826) foi utilizado em todos os experimentos. As formas leveduriformes e de micélio foram cultivadas a 36°C e 22°C, respectivamente. A viabilidade e integridade celular foram avaliadas, em triplicata, usando o corante azul de Trypan. Os extratos protéicos extracelular, citoplasmático e de parede celular foram obtidos conforme descrito previamente (Pitarch *et al.*, 2002; Pitarch *et al.*, 2008; Kapteyn *et al.*, 1996; de Groot *et al.*, 2004). O conteúdo protéico de cada fração foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Os extratos de proteínas extracelulares, em triplicata, foram submetidos à eletroforese bidimensional, incluindo a focalização isoelétrica (primeira dimensão) de 500 µg de proteínas, usando tiras com variação de pH de 3-11, onde as proteínas foram separadas com base em seu ponto isoelétrico (pI). Na segunda dimensão (2D-PAGE), as tiras desnaturadas (10 mM DTT/40 min) e alquiladas (135 mM Iodoacetamida/40 min) foram submetidas a uma corrida eletroforética em condição desnaturante (SDS-PAGE). Os géis corados por Commassie, foram analisados para determinação de pI e massa molecular dos spots pelo software Imagem Master 2D Platinum versão 6.0 (GE Healthcare). Os spots visíveis foram cortados manualmente do gel e digeridos com tripsina usando um protocolo de digestão em gel e submetidos à análise proteômica em espectrômetro de massas (MALDI-Q-TOF). A identificação das

proteínas foi feita por MS/MS usando o software Mascot (<http://www.matrixscience.com.Mascot>).

Posteriormente, as proteínas identificadas foram analisadas por programas de bioinformática para predição de peptídeo sinal usando SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) e de secreção por vias não-clássicas pelo SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP>), bem como classificação em grupos funcionais de acordo com catálogo funcional do MIPS FunCat (<http://fsd.riceblast.snu.ac.kr>). Os dados obtidos do secretoma de *P. brasiliensis* foram comparados com um banco de dados de secretoma *in silico* denominado Fungal Secretome Database (FSD) (<http://fsd.riceblast.snu.ac.kr>). Os extratos extracelulares foram submetidos também a análise por Western blot para confirmar a presença das proteínas enolase, aldolase e aconitase, e ensaios de atividade enzimática de catalase e formamidase. O perfil protéico dos diferentes extratos foi analisado por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE). A via não clássica de secreção foi ainda avaliada pelo cultivo das células leveduriformes na presença de um inibidor da via clássica, monensina, em diferentes tempos de incubação. Os extratos obtidos foram submetidos à eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) para análise do perfil protéico após bloqueio da secreção via Complexo de Golgi.

3- Resultados e Discussão

A validade da amostra para estudos de secretoma depende da obtenção de extratos sem contaminação com proteínas oriundas da lise celular. Portanto, foram realizados experimentos para validar as amostras obtidas, como curva de viabilidade celular, amplificação do gene codificante da enzima formamidase (FMD) em amostras de sobrenadante de cultura e eletroforese unidimensional dos extratos extracelular, citoplasmático e de parede celular para avaliar diferenças no perfil protéico dos diferentes extratos. Os dados obtidos sugerem não haver contaminação dos extratos extracelulares com proteínas citoplasmáticas, validando assim o método de extração utilizado.

A partir dos mapas protéicos, foram identificados 183 spots (85 em micélio e 98 em levedura), o que correspondeu a 130 proteínas diferentes, das quais 38 foram comuns, enquanto 27 se mostraram exclusivas em cada condição. Os spots identificados estavam incluídos em uma variação de massa molecular de 14 a 91 KDa e 3.96 a 10.41 de pI. Todas as 183 proteínas foram classificadas funcionalmente (168 com funções

preditas por homologia e 15 sem funções conhecidas). O grupo funcional com maior representatividade (30%) foi das proteínas envolvidas em Resgate Celular, Defesa e Virulência (RDV), seguido de Metabolismo e Energia. Proteínas identificadas em RDV incluíram chaperonas e proteínas de resposta a estresse oxidativo e térmico como: HSP 70, dissulfito isomerase, superóxido dismutase, glutatona redutase e glutatona S-transferase. Foi encontrado também uma catalase peroxissomal (*PbCatP*), a qual tem pode desempenhar papel na virulência de *P. brasiliensis* (Chagas et al., 2008). A identificação no proteoma extracelular de proteínas envolvidas em resposta ao estresse oxidativo contribui com a hipótese que fungos patogênicos liberam moléculas de defesa que atuam como fatores de virulência.

Com base nas análises *in silico*, aproximadamente 20% das proteínas identificadas no secretoma de ambas as formas de *P. brasiliensis*, apresentaram predição para peptídeo sinal, enquanto que 52% foram preditas de serem secretadas por vias alternativas. Esses dados estão de acordo com o FSD, o qual descreve que 58% das 9.136 proteínas do genoma de *P. brasiliensis*, *Pb01* são presumivelmente secretadas por vias não clássicas e 14% pela via convencional.

A atividade enzimática da Catalase e Formamidase nos extratos extracelulares mostrou que *P. brasiliensis* secreta proteínas funcionais. Dados obtidos por western blot confirmam a presença das proteínas enolase, aldolase e aconitase no secretoma de *P. brasiliensis*.

4- Conclusões

A função de proteínas secretadas por *P. brasiliensis* incluem moléculas potencialmente relevantes para a sua virulência, escape do sistema imune do hospedeiro, captação de nutrientes e detoxificação do meio. Ou seja, moléculas importantes para a adaptação ao ambiente do hospedeiro e estabelecimento da infecção. Entre essas moléculas identificadas incluem-se enzimas antioxidantes, proteínas de choque térmico, proteínas relacionadas a captação de nutrientes, sinalização celular e adesinas.

Muitas proteínas identificadas no secretoma de *P. brasiliensis* também têm sido descritas no proteoma extracelular de diferentes organismos por diferentes metodologias, o que contribui com os nossos achados (Kakizono et al., 2006; Bellafiore et al., 2008; Chaves et al., 2009; Cuervo et al., 2009; Cobos et al., 2010; Holbrook et al., 2011).

Proteínas com funções definidas no citoplasma e que são também encontradas no ambiente extracelular são presumidamente referidas como proteínas "moonlighting", sugerindo que elas possam possuir outras funções além das já descritas intracelularmente. Portanto, a identificação de proteínas secretada por *P. brasiliensis* é um passo importante no caminho do entendimento sobre a patogênese desse fungo.

Suporte Financeiro: CNPq, FAPEG e FINEP

5- Referências Bibliográficas

- (1) Restrepo A, Tobón A. (2005). *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, p. 3062-3068.
- (2) San-Blas, G., San-Blas, F., Rodriguez, L. E. & Castro, C. J. (1987). A model of dimorphism in pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*. *Acta Cient Venez* 38(2), p. 202-211.
- (3) Mendes-Giannini, M. J. S.; Monteiro da Silva, J. L.; Silva, J.F.; Donofrio, F. C.; Miranda, E. T.; Andreotti, P. F.; Soares, C. P. (2008). Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia*, v. 165, n. 4-5, p. 237-248.
- (4) Silva et al., 2008
- (5) Ranganathan, S.; Garg, G. (2009). Secretome: clues into pathogen infection and clinical applications. *Genome Med.* 1(11), p.113.
- (6) Nombela, C.; Gil, C.; Chaggin, W.L. (2006). Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol.* 14(1), p. 15-21.
- (7) Holbrook, E.D.; Edwards, J.A.; Youseff, B.H., Rapley, C.A. (2011). Definition of the extracellular proteome of pathogenic-phase *Histoplasma capsulatum*. *Journal of proteome research*, 10(4), p. 1929-1943.
- (8) Tjalsma, H.; Antelmann, H.; Jongbloed, et al. (2004). Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the "Secrets" of the Secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 68(2), p. 207-233.
- (9) Cuervo, P.; Jesus, J.B.; Saboia-Vahia, L.; Mendonça-Liam, L.; Domont, G.B.; Cupolillo, E. (2009). Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *Journal of Proteomics.* 73, p. 79-92.
- (10) Chaves, D.F.S.; Souza, E.M.; Monteiro, R.A.; Pedrosa, F.O. (2009). A two-dimensional electrophoretic profile of the proteins secreted by *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *Journal of proteomics.* 73, p. 50-56.
- (11) Pitarch, A., Sanchez, M., Nombela, C., Gil, C. (2002). Sequential Fractionation and two-dimensional gel analysis Unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Molecular & Cellular Proteomics.* 1, p. 967-982.
- (12) Pitarch, A., Nombela, C., Gil, C. (2008). Cell Wall Fractionation for Yeast and Fungal Proteomics. *Methods in Molecular Biology.* 425, p 217-239.
- (13) Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Vink, E., De La Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J.E., Shimoi, H., Lipke, P.N., and Klis, F.M. (1996). Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β -1,3- β -1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology.* 6, p. 337-345.
- (14) de Groot, P.W.J., Boer, A.D., Cunningham, J.e.f.f., Dekker, H.L., Jong, L., Hellingwerf, K.J., Koster, C., Klis, F.M. (2004). Proteomic Analysis of *Candida albicans* Cell Walls Reveals Covalently Bound Carbohydrate-Active Enzymes and Adhesins. *Eukaryotic Cell.* 3, p. 955–965.

- (15)** Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 7, p. 248-254.
- (16)** Bellafiore, S.; Shen Z.; Rosso, M.N.; Abad, P.; Shih, P.; Briggs, S.P. (2008). Direct Identification of the *Meloidogyne incognita* Secretome Reveals Proteins with Host Cell Reprogramming Potential *Plos Pathogens*. 4(10).
- (17)** Cobos, R.; Barreiro, C.; Mateos, R.M.; Coque, J.J.R. (2010). Cytoplasmic- and extracellular-proteome analysis of *Diplodia seriata*: a phytopathogenic fungus involved in grapevine decline *Proteome Science*.8(46).