



VIII Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão

Análises *in vivo* e *in vitro* de interações intermoleculares das enzimas Malato sintase e Isocitrato liase de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Karine Martins de OLIVEIRA^{1*}; Maristela PEREIRA¹; Benedito Rodrigues da Silva NETO¹; Célia Maria de Almeida SOARES¹.

¹ Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ICBII, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

*e-mail: karine.m.oliveira@hotmail.com

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, Malato sintase, Isocitrato liase, Interações.

INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo patogênico dimórfico, o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), endêmica na América Latina. O patógeno cresce em forma de levedura a uma temperatura de 35-37°C, ou como micélio a 25°C. É restrito à América Latina, com extensas áreas endêmicas no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina. Após inalação, os micélios ou conídios se convertem em leveduras, sendo fagocitados por macrófagos, onde se multiplicam (BRUMMER *et al.*, 1989). O interior dos macrófagos apresenta glicose limitante, por isso o fungo induz a produção de enzimas que lhe permitam a utilização de outras fontes de carbono presentes nos macrófagos, incluindo os lipídios. Assim, na busca de novas fontes de carbono, fungos e outros microrganismos utilizam etanol, acetato e ácidos graxos. Para utilização destes compostos formados por dois carbonos é requerido um ciclo ausente em mamíferos, o Ciclo do Glioxalato (CG) (SELITRENNIKOFF; NAKATA, 2003). Neste processo participam enzimas comuns ao TCA e também as específicas do CG, a Isocitrato Liase (ICL) e a Malato Sintase (MLS). A enzima ICL catalisa a reação de clivagem do isocitrato a succinato e glioxalato. Em seguida, a enzima MLS condensa o glioxalato com acetil-CoA formando o malato (KORNBERG, 1966), o qual é convertido em oxalacetato, seguindo-se as etapas enzimaticamente idênticas às do TCA resultando na regeneração do isocitrato (LORENZ; FINK, 2002). A ausência do CG em mamíferos e o fato da ICL e MLS serem enzimas chave nesse ciclo as elegem como importantes alvos fungo-específico para o desenho racional de antifúngicos. Devido

ao fato de as interações protéicas serem intrínsecas à virtualmente todos os processos celulares, é possível inferir a função de uma proteína através da identificação das proteínas com as quais ela interage (AUERBACH *et al.*, 2002). Nesse sentido, torna-se importante o estudo de interações de tais enzimas com outras proteínas do fungo para a busca de inibidores.

MATERIAIS E MÉTODOS

→ **Rastreamento de interações protéicas *in vivo* através do sistema de duplo-híbrido:** O estudo das interações da malato sintase com outras proteínas de *P. brasiliensis* foi realizado através do sistema duplo-híbrido em *S. cerevisiae*, linhagens AH109 e Y187 (Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits - Clontech Laboratories, Inc.). Foi utilizado o cDNA codificante para *PbMLS* (ZAMBUZZI-CARVALHO *et al.*, 2009, NETO *et al.*, 2009), já clonado em fase de leitura com o domínio GAL4 de ligação ao DNA (GAL4 DNA-BD) no vetor de expressão pGBKT7, que contém o gene *trp1*. Para o rastreamento das interações, foi utilizada uma biblioteca de cDNA construída a partir de RNAs de células leveduriformes de *P. brasiliensis* (BORGES *et al.*, 2009). O rastreamento das interações foi feito através da geração de diploidia. As linhagens Y187 e AH109, transformadas com os híbridos, foram inoculadas em um mesmo sistema para a geração de leveduras diplóides. Posteriormente, os diplóides foram selecionados em meio sem triptofano, leucina e histidina, no qual foi testada a ativação do gene repórter *his3*. O rastreamento de clones positivos foi concluído com o teste de ativação do gene repórter *mel1*, codificante para a enzima α -galactosidase. Na presença do substrato cromogênico (X- α -Gal) as colônias positivas tornam-se azuis.

→ Rastreamento de interações protéicas *in vitro* por *pull down*:

- **Ensaio de *pull-down* com *PbMLS* e *PbICL* fusionada à cauda de histidina:** O extrato de proteínas totais e secretadas de *P. brasiliensis* além de proteínas de membrana de macrófagos após cultivo em meio contendo INF- γ para mimetização da apresentação de antígenos do fungo, foi descongelado e 1 ml (5 mg/ml) foi incubado com 40 μ l da resina ligada à cauda de histidina (His-tag) por 2 horas a 4°C sob agitação suave em tubo cônico de 15 ml. A resina foi centrifugada a 1500 rpm por 5 min e o sobrenadante colocado em outro tubo contendo 50 μ l da resina ligada à *PbMLS* ou *PbICL*. Essa mistura foi incubada por 3 horas a 4°C, sob

agitação. Após esse período, a resina foi centrifugada a 1500 rpm por 5 min, lavada 4 vezes com tampão de lavagem 20 mM de imidazol pH 8.0 e ressuspensa em tampão de amostra 2X para proteína. Da mesma forma, foi lavada a resina ligada à cauda de histidina, resultante da primeira ligação com o extrato protéico. Ambas as resinas foram fervidas durante 10 min e as proteínas do sobrenadante submetidas à SDS PAGE em gel de poliacrilamida 15%, seguida por coloração com *coomassie* PhastGel™ Blue R (GE Healthcare®) por 16h. Após esse período, o gel é descorado e as proteínas foram removidas para posterior análise por espectrometria de massas. A massa molecular de cada proteína foi calculada através do método de regressão linear. A passagem do extrato protéico pela resina ligada à cauda de histidina foi feita no intuito de eliminar as interações inespecíficas, ou seja, aquelas proteínas que interagem com a cauda de histidina e não com *PbMLS* ou *PbICL*.

- **Digestão trípica e análise de peptídeos por espectrometria de massas:** A digestão das proteínas *in gel* foi feita como descrito (WINTERS *et al.*, 2008). As proteínas resultantes do ensaio de *pull-down* foram removidas do gel cujos pedaços serão fragmentados e lavados com água milli-Q. Os pedaços de gel foram incubados em acetonitrila e secos sob vácuo. Em seguida, foram adicionados solução de ditioneitol (DTT)/ bicarbonato de amônio; a amostra será mantida sob agitação e incubada a 56°C por 1h. O sobrenadante foi removido e adicionados iodocetamida. Os pedaços de géis foram agitados e, em seguida, mantidos por 45 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O sobrenadante será retirado e as amostras lavadas com NH₄HCO. O sobrenadante foi removido, os pedaços de gel desidratados com solução NH₄HCO em 50% de acetonitrila. O sobrenadante foi retirado e os pedaços de gel secos sob vácuo. Posteriormente, foram adicionados solução de tripsina e os pedaços de gel reidratados no gelo. O excesso de tripsina foi retirado; adicionados NH₄HCO e as amostras incubadas por 16h à 37°C e em seguida adicionada solução 50% acetonitrila/ 5% ácido trifluoroacético (TFA) aos pedaços de géis. As amostras foram submetidas a 3 ciclos de sonicação secando sob vácuo e ressuspensa em água milli-Q. Os peptídeos resultantes da digestão foram utilizados para produção de espectros de massas por MALDI-TOF-MS (Espectrômetro de Massas). Os dados obtidos foram utilizados na busca de proteínas no banco de dados de proteínas do NCBI através do software MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>). As proteínas foram identificadas através da impressão digital de massas de peptídeos (*Peptide Mass Fingerprint* - PMF).

RESULTADOS

→ **Deteção *in vivo* de possíveis proteínas ligantes de *pbMLS*:** Os ESTs foram processados utilizando a ferramenta de bioinformática Blast2GO. A classificação funcional foi baseada em homologia de cada EST do BLASTX contra o banco de dados GenBank em uma homologia significativa de corte de $\leq 1e-05$ e esquema de anotação funcional MIPS. As análises indicaram a presença de genes com categoria funcional e funções relacionadas com transporte celular, biossíntese de proteínas, enovelamento, modificação e degradação de proteínas, transdução de sinais e proteínas hipotéticas (**Tabela 01**).

Produto gênico	Função clássica ^b	Organismo/ número de acesso ^a	Valor e
Chaperona 3 de transporte vacuolar	Transporte e enovelamento de proteínas	<i>P. brasiliensis</i> 01/ PAAG_07987	1.0e-62
Calnexina	Chaperona (enovelamento de proteínas)	<i>P. brasiliensis</i> 01/ PAAG_07037	1.0e-95
Ubiquitina	Modificação e degradação de proteínas	<i>P. brasiliensis</i> 01/ PAAG_07080	1.0e-34
Subunidade regulatória do Proteassoma	Direcionamento de proteínas e regulação do processo de catabolismo protéico	<i>P. brasiliensis</i> 01/ PAAG_05962	1.0E-53
RNA helicase dependente de ATP (drs1)	Síntese de proteínas e biogênese	<i>P. brasiliensis</i> 01/ PAAG_05480	1.0e-26
Proteína nuclear ligada a GTP (gsp1 ran)	Transporte núcleo-citoplasma e transdução de sinal	<i>P. brasiliensis</i> 01/ PAAG_04651	1.0e-42
Arrestina	Regulação da atividade de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)	<i>P. brasiliensis</i> 01/ PAAG_03520	1.0e-18
Membro da família Ipase (p1d-1)	Manutenção dos telômeros	<i>P. brasiliensis</i> 01/ PAAG_04310	1.0e-48
Sulfito oxidase	Processo de oxidação e redução	<i>P. brasiliensis</i> 01/ PAAG_07811	1.0e-9
Serina treonina quinase	Síntese de proteínas e biogênese	<i>P. brasiliensis</i> 01/ PAAG_06510	1.0e-25
Fator de iniciação da tradução 2 α -quinase	Biossíntese de proteínas (tradução)	<i>P. brasiliensis</i> 01/ PAAG_06597	1.0e-52
Proteína 3 relacionada a autofagia	Transporte celular, facilitação do transporte e rotas de transporte	<i>P. brasiliensis</i> 01/ PAAG_00493	1.0e-5
Proteína predita	Desconhecida	<i>P. brasiliensis</i> 01/ PAAG_01156	1.0e-15
Proteína predita	Desconhecida	<i>P. brasiliensis</i> 01/ PAAG_06451	1.0e-8
Proteína hipotética	Predita	---	---
Proteína hipotética conservada	Predita	----	----

Tabela 1 - Produtos gênicos identificados pela técnica de duplo-híbrido que interagem com *PbMLS*.

^a: os números de acessos contendo os códigos PAAG referem-se ao Banco do Genoma estrutural de *P. brasiliensis* (<http://www.broadinstitute.org/>)

^b: função definida com base nas informações contidas no banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/>).

*: não foi encontrada identidade nos bancos de dados utilizados.

→ **Exclusão de clones falso-positivos baseado na ativação transcricional do gene repórter *mel1***: Alguns dos clones de cDNA seqüenciados foram plaqueados em meio auxotrófico altamente seletivo contendo X- α -Gal para observar a ativação transcricional do gene repórter *mel1* de *S. cerevisiae*, um gene GAL4-regulado, codificante para enzima α -galactosidase. Todos os 24 clones selecionados apresentaram ativação do gene repórter *mel1* apresentando-se azuis (**Figura 01**).

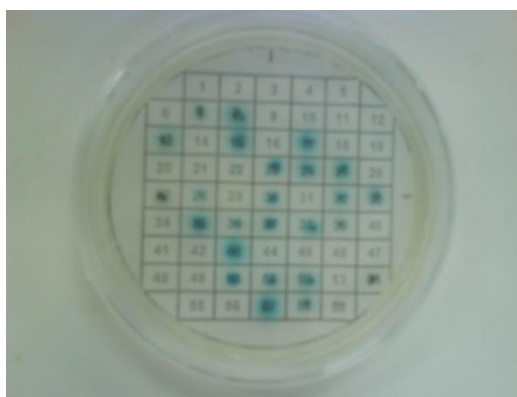


Figura 01 - Colônias positivas selecionadas em meio com X- α -Gal, um substrato cormogênico. Esse ensaio monitora a ativação do gene repórter *mel1*, que codifica para enzima secretada α -galactosidase. Essa enzima hidrolisa X- α -Gal, levando à formação do produto final azulado, cujas colônias se tornam azuis abrigando interações positivas.

→ **Deteção de interações protéicas *in vitro* entre *PbMLS* e proteínas totais do fungo *P. brasiliensis* através do ensaio de *pull down***: Foi realizado um ensaio de *pull down* com *PbMLS* fusionada a cauda de histidina (His-tag) para posterior identificação por MS. Para isso, a proteína recombinante *PbMLS* foi expressa fusionada à cauda de histidina e purificada por uma resina de afinidade. Da mesma forma foi purificada a cauda de histidina não fusionada para ser usada como controle. A massa predita para a proteína híbrida é de 73 kDa (60 kDa correspondente a MLS e 13 kDa correspondente a cauda de histidina) (**Figura 02**).

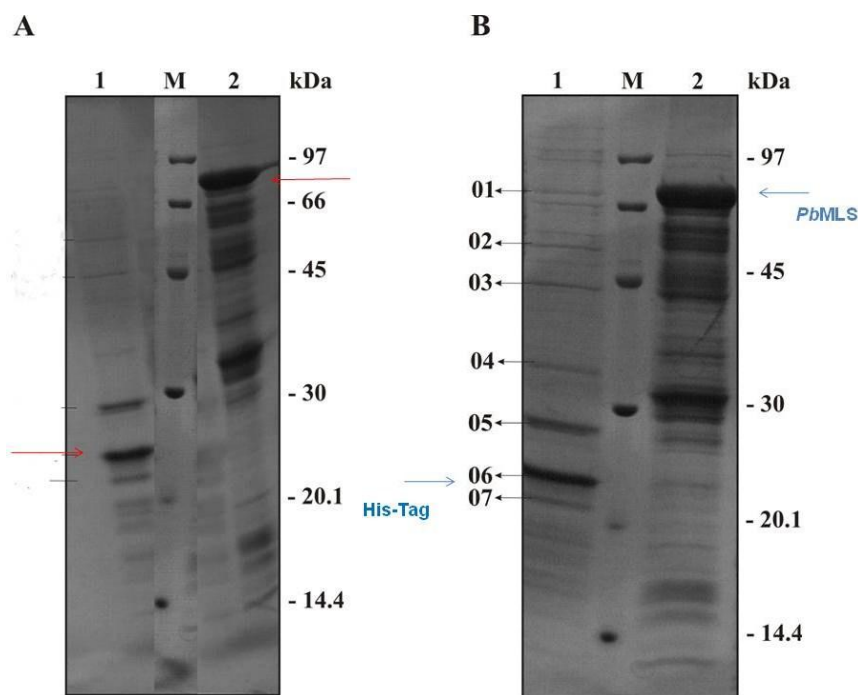


Figura 02 – Determinação de interações *in vitro* entre *PbMLS* e proteínas do extrato total de células leveduriformes de *P. brasiliensis*. (A) Purificação das proteínas *PbMLS* recombinante (coluna 1) e cauda de histidina (coluna 2) por resina de afinidade. (B) Após purificação das proteínas, a cauda de histidina foi incubada com extrato total de *P. brasiliensis* para retirada das proteínas ligantes inespecíficas (coluna 1 - controle). O sobrenadante desse *pull down* controle foi incubado com a proteína de fusão *PbMLS*-His-tag purificada. O complexo protéico resultante desta interação foi resolvido por SDS-PAGE (coluna 2). As proteínas exclusivas do *pull down* teste serão identificadas por Espectrometria de massas. M: marcador de massa molecular.

CONCLUSÃO

As análises de interações entre a enzima recombinante malato sintase de *P. brasiliensis* (*PbMLS*) e outras proteínas do fungo indicaram que essa enzima interage com inúmeras outras de diversas categorias funcionais como transportes celulares, biossíntese de proteínas, enovelamento, modificação e degradação de proteínas, transdução de sinais. Isso sugere que a enzima malato sintase pode estar relacionada a diversas funções na célula fúngica, além da função primária de metabolismo associado ao ciclo do glioxalato, além disso, possivelmente essa enzima se encontra em diversas localizações na célula.

BIBLIOGRAFIA

AUERBACH, D., THAMINY, S., HOTTIGER, M. O. e SAGLJAR, I. The post-genomic era of interactive proteomics: facts and perspectives. **Proteomics** 2(6): 611-23, 2002.

BORGES C. L., PARENTE, J. A., BARBOSA, M. S., SANTANA, J. M., BAO, S. N., SOUSA, M. V. e SOARES, A. M. Detection of a homotetrameric structure and protein-protein interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* formamidase lead to new functional insights. **FEMS Yeast Res** in press, 2009.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTTREPO, A.; STEVENS, D.A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication of by activated macrophages. **Infect. Immun** 57: 2289 - 2294, 1989.

KORNBERG, H.L. The role and control of the Glyoxylate Cycle in *Escherichia coli*. **Biochemistry Journal**. 99: 1 - 11, 1966.

LORENZ, M. C.; FINK, G.R. Life and Death in a Macrophage: Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. **Eukaryotic cell**,1: 657-662, 2002.

NETO, B.R.S.; SILVA, J.F.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; LENZI, H.L.; SOARES, C.M.A.; PEREIRA, M. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesion. **BMC microbiology** 9: 272, 2009.

SELITRENNIKOFF, C.P.; NAKATA, M. New cell wall for antifungal drugs. **Current Opinion In Investigational Drugs**,4: 200-205, 2003.

WINTERS, M. S., SPELLMAN, D. S., CHAN, Q., GOMEZ, F. J., HERNANDES, M., CATRON, B., SMULIAN, A. G., NEUBERT, T. A. e DEEPE, G. S., Jr. *Histoplasma capsulatum* proteome response to decreased iron availability. **Proteome Sci** 6: 36, 2008.

ZAMBUZZI-CARVALHO, P.F.; CRUZ, A.H.S.; SANTOS-SILVA, L.K.; GOES, A.M.; SOARES, C.M.A.; PEREIRA, M. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. **Medical Mycology**, 2009.