

MALATO SINTASE DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* É UMA PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE CELULAR E ESTÁ RELACIONADA COM A ADESÃO DO FUNGO À MATRIZ EXTRACELULAR E INTERAÇÃO COM A CÉLULA

BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO

Endereço atual/Current address: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Laboratório de Biologia Molecular, Sala 206, Goiânia, Goiás, Brasil/Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Goiás, Laboratory of Molecular Biology, Room 206, Goiânia, Goiás, Brazil; e-mail: bio.neto@gmail.com

Dissertação de Mestrado/Master Dissertation: Programa de Pós-graduação de Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil/Postgraduate Program in Biology, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

Defendida/Defended: 11. V. 2009

Orientadora/Advisor: Profa. Dra. Maristela Pereira, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil/Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

RESUMO: O fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente causador da paracoccidioidomicose (PCM). Essa é uma micose pulmonar adquirida pela inalação de propágulos que podem se disseminar para vários órgãos e tecidos, conduzindo à forma grave da doença. A adesão às células hospedeiras e a sua invasão são passos essenciais para a internalização e a disseminação de agentes patogênicos. Dentro do hospedeiro, *P. brasiliensis* pode usar o ciclo do glioxalato para sobrevivência intracelular. No presente estudo, evidenciou-se que a malato sintase de *P. brasiliensis* (*PbMLS*) está localizada na superfície celular do fungo e é secretada. *PbMLS* foi expressa em *Escherichia coli*, sendo obtido o anticorpo policlonal contra esta proteína. Utilizando microscopia laser confocal, detectou-se *PbMLS* no citoplasma e na parede das células-mãe, mas principalmente nas células broto leveduriformes de *P. brasiliensis*. Por meio de citometria de fluxo, verificou-se que *PbMLSr* e seu respectivo anticorpo inibiram a interação de *P. brasiliensis* com a cultura de células epiteliais A549 *in vitro*. Os resultados mostraram a presença de *PbMLS* no filtrado de cultura de células leveduriformes (fase parasitária), sua localização superficial em *P. brasiliensis* e sua ligação aos componentes de matriz extracelular nos ensaios de Far-Western e ELISA e nas membranas das células A549. A redução da aderência de *P. brasiliensis* às células A549 por anti-*PbMLSr* sugere que *PbMLS* possa contribuir para ativa interação do fungo e progressão da doença em humanos por intermédio da habilidade de atuar como adesina. Essas observações indicam que *PbMLS* associada à parede celular pode mediar a ligação de células fúngicas ao hospedeiro, assim contribuindo para a adesão do fungo aos tecidos do hospedeiro e para a disseminação da infecção.

PALAVRAS-CHAVE: Adesina, ciclo do glioxalato, malato sintase, *Paracoccidioides brasiliensis*.

PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS MALATE SYNTHASE IS A CELL SURFACE PROTEIN AND IS RELATED TO THE FUNGUS ADHESION TO THE EXTRACELLULAR MATRIX PROTEIN AND CELL INTERACTION

ABSTRACT: *Paracoccidioides brasiliensis*, a pathogenic fungus, is the agent of paracoccidioidomycosis (PCM). This is a pulmonary mycosis acquired through inhalation of fungal airborne propagules that can disseminate to several organs and tissues leading to a severe form of the disease. Adhesion to host cells and their invasion are essential steps for pathogen internalization and dissemination. Inside the host, *P. brasiliensis* may use the glyoxylate cycle for intracellular survival. In the present study, we evidenced

that *P. brasiliensis* malate synthase (*PbMLS*) is located on the fungal cell surface and is secreted. *PbMLS* was overexpressed in *Escherichia coli*, and polyclonal antibody was obtained against this protein. Using confocal laser scanning microscopy, *PbMLS* was detected in the cytoplasm and in the mother-cell wall, but mainly in *P. brasiliensis* yeast-phase budding cells. Applying flow cytometry, we observed that *PbMLSr* and its respective polyclonal antibody inhibited the interaction of *P. brasiliensis* with cultured epithelial cells A549 *in vitro*. The results showed the presence of *PbMLS* in the culture filtrate of yeast cells (parasitic phase), its surface location in *P. brasiliensis* and its binding to ECM in Far-Western blot and ELISA assays and to A549 cell membranes. Reduction in the adherence of *P. brasiliensis* to A549 cells by anti-*PbMLSr* suggests that *PbMLS* could contribute to active fungal interaction and disease progression in humans due to its ability to act as a probable adhesin. These observations indicate that cell wall-associated *PbMLS* could mediate binding of fungal cells to the host, thus contributing to the adhesion of fungus to host tissues and to the dissemination of this infection.

KEY WORDS: Adhesin, glyoxylate cycle, malate synthase, *Paracoccidioides brasiliensis*.