

ENZIMA DA VIA GLICOLÍTICA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE ATUA COMO UMA ADESINA EM *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS***THE GLYCOLYTIC ENZYME GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE ACTS AS AN ADHESIN IN *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*****MÔNICA SANTIAGO BARBOSA**

Endereço atual/Current address: Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Caixa Postal 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil/Laboratory of Molecular Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Campus II, PO Box 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil; e-mail: santiago@icb.ufg.br

Tese de Doutorado/Doctoral Thesis: Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil/Postgraduate Program in Molecular Biology, University of Brasília, Federal District, Brazil

Defendida/Defended: 17.VIII.2007

Orientadora/Advisor: Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares, 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, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

RESUMO: *Paracoccidioides brasiliensis* é um importante patógeno humano que causa a paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica com ampla distribuição na América Latina. A invasão das células do hospedeiro e a adesão a elas são eventos essenciais envolvidos na infecção e disseminação do patógeno. Além disso, o patógeno utiliza suas moléculas de superfície para se ligar a componentes da matriz extracelular de modo a estabelecer a infecção. Uma adesina antigênica de *P. brasiliensis* foi isolada de gel de eletroforese bidimensional de proteínas totais do fungo e caracterizada. Os peptídeos digeridos por Endoproteínase Lys-C da proteína purificada apresentaram massa molecular de 36 kDa e pI 6.8, os quais foram submetidos a análise de sequência de seus aminoácidos, que revelou forte homologia com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH: EC 1.2.1.12) de diversas fontes. O cDNA completo e o gene que codificam para *PbGAPDH* foram obtidos e ambos contêm um quadro aberto de leitura (*open reading frame* - ORF) que codifica para uma proteína com 338 aminoácidos, a qual apresenta todos os peptídeos caracterizados na *PbGAPDH* nativa. O gene *Pbgapdh* contém cinco exons interrompidos por quatro íntrons. Análises realizadas com a *PbGAPDH* deduzida sugerem sua utilidade em prover relações filogenéticas, bem como evidenciam a correlação entre a filogenia fornecida pelas proteínas deduzidas e as posições dos íntrons nos genes cognatos. A expressão de *Pbgapdh* foi analisada e uma única espécie de mRNA de 2.0 Kb, preferencialmente expressa na fase leveduriforme de *P. brasiliensis*, foi detectada em concordância com os altos níveis de expressão da GAPDH nas células leveduriformes deste patógeno. A proteína recombinante GAPDH foi utilizada para produção de anticorpo policlonal em coelho. Por microscopia imunoeletrônica e análises por *Western blot*, foi detectada a presença da GAPDH na parede celular e no citoplasma na fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. A GAPDH recombinante foi capaz de se ligar a fibronectina, laminina e colágeno do tipo I. Notavelmente, tanto o tratamento de *P. brasiliensis* com anticorpo policlonal anti-GAPDH quanto a incubação de pneumócitos com GAPDH recombinante promoveram a inibição da aderência e a internalização de *P. brasiliensis* a células cultivadas *in vitro*. Essas observações indicam que a GAPDH possivelmente contribui para a adesão do microrganismo aos tecidos do hospedeiro e para a disseminação da infecção.

PALAVRAS-CHAVE: Adesina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, *Paracoccidioides brasiliensis*.

ABSTRACT: *Paracoccidioides brasiliensis* is an important human pathogen that causes paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis with broad distribution in Latin America. The invasion of host cells and the adhesion to them are essential steps involved in the infection and dissemination of this pathogen. Furthermore, the pathogen uses its surface molecules to bind to host extracellular matrix components to establish infection. An antigenic adhesin of *P. brasiliensis* was isolated after two-dimensional gel electrophoresis of total protein of this fungus and characterized. Endoproteinase Lys-C-digest peptides of the purified protein presented a molecular mass of 36 kDa and pI 6.8 and were subjected to sequence analysis of their amino acids, which revealed strong homology to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH: EC 1.2.1.12) of several sources. The complete cDNA and gene encoding *PbGAPDH* were obtained and both contain an open reading frame (ORF) predicted to encode a 338-amino acid protein that presents all the peptides characterized in the native *PbGAPDH*. The *Pbgapdh* gene contains five exons interrupted by four introns. The analyses performed with the deduced *PbGAPDH* suggest its usefulness in providing phylogenetic relatedness, and also evidence the correlation between the phylogeny provided by the deduced proteins and the introns positions in the cognate genes. The expression of *Pbgapdh* was analyzed and a single species of mRNA of 2.0 Kb, preferentially expressed in the yeast parasitic phase of *P. brasiliensis*, was detected in agreement with the high levels of GAPDH expression in the yeast cells of this pathogen. The purified recombinant GAPDH was used to produce polyclonal antibody in rabbit. Using immunoelectron microscopy and Western blot analysis, we detected GAPDH in the cell wall and the cytoplasm in the yeast phase of *P. brasiliensis*. The recombinant GAPDH was able to bind to fibronectin, laminin, and type I collagen. Remarkably, both the treatment of *P. brasiliensis* with anti-GAPDH polyclonal antibody and the incubation of pneumocytes with the recombinant GAPDH promoted the inhibition of the adherence and the internalization of *P. brasiliensis* to the *in vitro* cultured cells. These observations indicate that GAPDH could possibly contribute to the adhesion of the microorganism to the host tissues as well as to the dissemination of the infection.

KEY WORDS: Adhesin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Paracoccidioides brasiliensis*.