UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Juliana Santana de Curcio

PROTEÍNAS DA FRAÇÃO DE MEMBRANAS DO FUNGO PATOGÊNICO *Paracoccidioides* sp.

Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Goiânia – Goiás
2014

sistema de bibliotecas ufg

UFG

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[X] Dissertação** **[ ] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Juliana Santana de Curcio				
E-mail:	julianadecurcio1@gmail.com				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	[X]Sim	[ ] Não			
Vínculo empregatício do autor	Bolsista				
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla:	CAPES		
País:	Brasil	UF:GO		CNPJ:	
Título:	Proteínas da fração de membranas do fungo patogênico *Paracoccidioides* sp.				
Palavras-chave:	*Paracoccidioides* sp., proteoma, proteínas de membrana, domínios transmembrana, metodologia.				
Título em outra língua:	Proteins of the membrane fraction of the pathogenic fungus *Paracoccidioides* sp.				
Palavras-chave em outra língua:	*Paracoccidioides* sp., proteome, membrane protein, transmembrane domains, methodology.				
Área de concentração:	Microbiologia				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	21/02/2014				
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública				
Orientador (a):	Dra. Célia Maria de Almeida Soares				
E-mail:	cmasoares@gmail.com				
Co-orientador (a):*					
E-mail:					

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [ ] SIM [X] NÃO[1]

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Juliana Santana de Curcio

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 07/06/2016

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

de Curcio, Juliana Santana
PROTEÍNAS DA FRAÇÃO DE MEMBRANAS DO FUNGO PATOGÊNICO Paracoccidioides sp. [manuscrito] / Juliana Santana de Curcio. - 2014.
CXVII, 117 f.

Orientador: Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares .
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2014.
Bibliografia.
Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas.

1. Paracoccidioides sp. 2. Proteoma. 3. Proteínas de membranas. 4. domínios transmembranas. 5. Metodologia. I. , Célia Maria de Almeida Soares, orient. II. Título.

CDU 579

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Juliana Santana de Curcio

PROTEÍNAS DA FRAÇÃO DE MEMBRANAS DO FUNGO PATOGÊNICO *Paracoccidioides* sp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientadora: Prof. Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Goiânia – Goiás
2014

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública

da Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Juliana Santana de Curcio

Orientador (a): Profª Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Membros:

1. Dra. Célia Maria de Almeida Soares

2. Dr. Alexandre Melo Bailão

3. Dra. Lilian Cristiane Baeza

Data: 21/02/2014

A Deus
Aos meus pais
À minha família

Se você é...
Se você é um vencedor,
terá alguns falsos amigos
e alguns verdadeiros amigos.
Vença assim mesmo!

Se você é honesto e fraco,
as pessoas podem enganá-lo
Seja honesto e fraco assim mesmo!

O que você levou anos para construir,
alguém pode destruir de uma hora para outra
Construa assim mesmo!

Se você tem paz e é feliz,
as pessoas podem sentir inveja
Seja feliz assim mesmo!

Dê ao mundo o melhor de você,
mais isso pode nunca ser o bastante
Dê o melhor de você assim mesmo!

Veja você que, no final de tudo
Será você... e Deus!

E não você e as pessoas!

Madre Tereza de Calcutá

Agradecimentos

A Deus, pela proteção durante toda a minha vida, pela família maravilhosa que eu tenho e por sempre me abençoar em todas as minhas escolhas.

À professora Dra. Célia Maria de Almeida Soares pela confiança em mim, permitindo que eu participasse do grupo de pesquisa do laboratório de biologia molecular, obrigado pela orientação durante todos os experimentos e redação da dissertação de mestrado. Admiro sua competência e profissionalismo.

Ao professor Dr. Alexandre Melo Bailão pela ajuda e discussão durante os experimentos, pela disponibilidade em sempre ajudar com atenção, por participar da qualificação e defesa de mestrado e pela amizade durante esses anos.

Aos professores Dr. Clayton Luiz Borges e Dra. Juliana Alves Parentes pela atenção e acessibilidade em ajudar durante as dúvidas no decorrer dos experimentos. Agradeço também pela disponibilidade de participar da minha banca de qualificação e defesa de mestrado.

As professoras Dra. Maristela Pereira e Dra. Silva Salem Isaac pela atenção e contribuição científica.

À Mirelle Garcia Silva Bailão, pela amizade carinho e dedicação durante esses anos. Pelo conhecimento transmitido durante o período com sua estagiária, por sempre me ajudar com as minhas dúvidas, você é um exemplo de profissional e ser humano.

À Marielle Garcia Silva por compartilhar comigo o desafio de fazer o proteoma de membrana, por sempre me ajudar com os experimentos, pelas discussões e amizade conferida durante esses anos. Admiro muito você.

À Luciana Casaletti, por sempre me ajudar com atenção, respeito, carinho e dedicação, pela amizade e opinião durante os experimentos do mestrado, e por toda contribuição durante esses anos. Agradeço por tudo isso Lu.

À Élisa Flávia, Patrícia Lima, Lilian Baeza e Mariana Tomazetti pela amizade, carinho, brincadeiras, e pela disponibilidade em sempre me ajudar, obrigado meninas.

À Lívia do Carmo e Felipe Souto pela amizade durante esses anos, pelas conversas e brincadeiras.

Ao Alessandro Vaz e Lucas Nojosa por me ajudar com as minhas funções durante a escrita da qualificação e dissertação do mestrado e pela amizade.

À Edilânia Araújo, Amanda Rodriguez, Danielle Araújo, Lucas Oliveira, Gabriel Tristão, André Luiz, Vanessa Rufino, Luiz Paulo, Paulo Henrique, Igor Nascimento, Fabiana da Mata, Renata, Neto, Sheyla, Leandro, Cristina, Ana Flávia, Hana Hamano, Leandro Prado, Paula Francienete, Laura, Diandra, Laurine. Obrigado pela atenção, carinho e respeito, todos de alguma forma me ajudaram!

Aos meus pais Wagner de Curcio e Terezinha Santana da Silva de Curcio, por me educarem, acreditarem no meu sonho e sempre me apoiarem. Tenho muita sorte por ter vocês como meus pais. Obrigado pelo exemplo de família que vocês sempre me deram.

As minhas irmãs Wanessa Santana de Curcio e Alessandra Santana de Curcio, pelo amor carinho, respeito e preocupação comigo todos estes anos, por acreditarem e apoiarem meu sonho. Amo muitos vocês! Aos meus sobrinhos Maria Eduarda e Rafael pela alegria, diversão e amor. Aos meus cunhados Rodrigo e Erick pela ajuda e conselho durante esses anos.

Ao meu namorado Vitor Magalhães Rezende, por ser meu companheiro, amigo por me apoiar com a minha escolha, pela ajuda durante esses anos, Te amo!

As minhas amigas Patrícia Graziella, Jésica Vieira, Patrícia Avelar, Monique Barbará, Juliana e Fabiany Freitas, Ana Paula Rezende, Aline Kiara, Franchesca. Aos meus amigos Erick, Lucas Barreto e Robson pela amizade e por sempre estarem do meu lado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS xii
RESUMO xiii
ABSTRACT xv

CAPÍTULO 1
1. INTRODUÇÃO 18
1.1 Classificação filogenética 18
1.2 Paracoccidioides spp.: Aspectos gerais 20
1.3 Paracoccidioidomicose (PCM) ..... **Erro! Indicador não definido.**
1.4 Estudos relacionados com estruturas constituintes das membranas de *Paracoccidioides* spp. 23
1.5 Membranas biológicas 24
1.6 Proteínas constituintes das membranas celulares 25
1.7 Proteoma de membranas 29
2. JUSTIFICATIVA 34
3. OBJETIVO 36
3.1 Objetivo geral 36
3.2 Objetivos específicos 36

CAPÍTULO 2
4. MANUSCRITO 38

CAPÍTULO 3
1. DISCUSSÃO 97
2. CONCLUSÃO 106
3. PERSPECTICAS 106
4. REFERÊNCIAS 108

PRODUÇÕES CIENTIFÍCA DURANTE O MESTRADO 117

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO 1

Figura 1- Ciclo biológico hipotético de *Paracoccidioides* spp.. 19

Figura 2- Distribuição geográfica da PCM 20

Figura 3- Estrutura geral de uma proteína ancorada à GPI ligada à membrana plasmática. 29

CAPÍTULO 2

Figura 1-Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) representativa de uma fração enriquecida com membranas de *Paracoccidioides* sp..... 50

Figura 2-Detecção da faixa dinâmica do experimento. 51

Figura 3-Localização subcelular das proteínas contidas na fração de membranas de *Paracoccidioides* sp. 49

Tabela 1-Classificação funcional e associação das proteínas com membranas celulares de *Paracoccidioides* sp. 52

Figura 4 - Comparação entre proteoma de deduzidas proteínas integrais de membrana de *Paracoccidioides* sp.. 93

Tabela suplementar 1-Classificação funcional e associação das proteínas identificadas na fração de membranas..... 93

Figura suplementar 1-Classificação funcional das proteínas de membrana. 91

Figura suplementar 2- Associação das proteínas com membranas celulares 91

Figura suplementar 3- Quantidade de domínio transmembrana entre as proteínas integrais de membrana de *Paracoccidioides* sp..... 92

LISTA DE ABREVIATURAS

TFA: ácido trifluoroacético

HSPs: proteínas de resposta ao choque térmico

M: manose

LC: cromatografia líquida

PCM: paracoccidioidomicose

2-DE: eletroforese bidimensional

DTT: ditiotreitol

GPI: glicosilfosfatidilinositol

I: inositol

PBS: solução de tampão fosfato

MS: espectrometria de massa

EtN: etanolamina

GlcN: glicosamina

Pb (**01,03,18**): Isolados (01,03 e 18) de *Paracoccidioides* spp.

Sítio ω: sítio ômega ou sinal para ligação ao GPI

EtNP: fostato de etanolanina

PATs: palmitoil-transferases

NMT: N-miristoil transferase

FTase: farnesiltransferase

(p/v): peso por volume

MMcM: meio quimicamente definido

BSA: albumina sérica

UPLC-MS^{E}: cromatografia de ultraperformace acoplada à espectrometria de massas

fmol: fentomol

MET: microscopia eletrônica de transmissão

DTM: domínio transmembrana

MPTs: modificações pós traducionais

RESUMO

Paracoccidioides spp. representa um gênero de fungos termodimórficos, agentes etiológicos da paracoccidioidomicose, a micose sistêmica mais comum na América Latina. Durante o processo infeccioso proteínas localizadas em membranas celulares são responsáveis por muitos processos essenciais para a sobrevivência do patógeno, como transporte de nutrientes, adesão, sinalização e produção de energia. Basicamente membranas celulares são constituídas de uma bicamada lipídica com proteínas associadas. As proteínas de membranas associam-se a bicamada lipídica através de domínios transmembrana, por adição de uma modificação pós traducional e por meio de interações eletrostáticas. Portanto, o conhecimento da constituição proteica das membranas de *Paracoccidioides* sp. permite entender alguns dos processos desenvolvidos pelo fungo para sobrevivência dentro do hospedeiro. Desta forma o presente trabalho teve como objetivo à determinação da metodologia para obtenção de proteínas de membranas e a consequente descrição dessas proteínas. Para este fim, duas técnicas de separação e identificação de proteínas foram empregadas. A primeira metodologia baseava-se em eletroforese bidimensional e espectrometria de massas onde o extrato proteico de membranas foi obtido após duas etapas de ultracentrifugação e a segunda metodologia utilizava cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, para esta metodologia três protocolos foram empregados no intuito de obter extratos proteicos de membranas. O primeiro protocolo emprega ultracentrifugação e o segundo e terceiro protocolo empregava ultracentrifugação/sonicação e ultracentrifugação combinado com elevação do pH respectivamente. Após as etapas de padronização do protocolo, o extrato proteico de membranas foi obtido através de ultracentrifugação e solubilização com carbonato de sódio em pH elevado. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada para confirmar a qualidade da amostra enriquecida com a fração de membranas de *Paracoccidioides* sp.. Posteriormente o extrato proteico de membranas proveniente da metodologia padronizada foi submetido à digestão tríptica e analisado por NanoUPLC-MS^{E}. Análises *in silico* das proteínas identificadas foram realizadas a fim de se determinar a localização destas proteínas e possíveis associações com as membranas. Do total de proteínas identificadas cento e trinta e três proteínas foram classificadas como pertencentes a membranas celulares de *Paracoccidioides* sp., oitenta e oito proteínas apresentaram ao menos um domínio transmembrana e treze proteínas, além de domínio transmembrana apresentaram um peptídeo sinal na porção N-terminal da proteína. Diferentes formas de associação com as

membranas de *Paracoccidioides* sp. foram identificadas neste trabalho, incluindo domínio transmembrana, âncora de GPI, prenilação, palmitoilação e miristoilação. A maioria das proteínas integrais de membrana identificadas no proteoma já foram anotadas no genoma deste fungo. Juntos estes resultados demonstram o estabelecimento de um protocolo experimental para a extração de proteínas de membranas de *Paracoccidioides* spp., bem como identificam as proteínas de frações de membranas do fungo.

Palavras chaves: *Paracoccidioides* sp., proteínas de membrana, metodologia.

ABSTRACT

Paracoccidioides spp. represents thermodimorphic fungi that cause paracoccidioidomycosis, the most widespread systemic mycosis in Latin America. During the establishment of the infection, proteins located in cell membranes are responsible for many essential processes for pathogen survival as transport of nutrients, accession, signaling and energy production. Cell membranes are basically composed of a lipid bilayer with proteins associated. The proteins can be associated with the membrane through transmembrane domains, posttranslational added modifications or through electrostatic interactions. Therefore the knowledge of the constitution of the proteins of membranes is important to understand some processes developed by *Paracoccidioides* sp. for its growth and survival within the host. To this end, two techniques of separation and identification of proteins were employed. The first methodology used two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry, where the extract of membranes proteins was obtained after steps of ultracentrifugation and the second methodology used liquid chromatography coupled with mass spectrometry, to this methodology three protocols were employed to obtain the extract of membranes proteins. The first methodology employed ultracentrifugation, and the second e third methodology used ultracentrifugation/sonication and ultracentrifugation with elevation of pH respectively. After these steps, the extract of membranes proteins was obtained through of ultracentrifugation and elevation of pH with sodium carbonate. Transmission Electron Microscopy (TEM) was performed to confirm the quality of the sample, a fraction enriched in cell membranes of *Paracoccidioides* sp.. Posteriorly the proteins obtained by standard methodology were subjected to tryptic digestion and analyzed by NanoUPLC-MS^E.. *In silico* analyzes of the identified proteins were performed to determine the location and possible association of the proteins with the cell membranes. From total of proteins identified, one hundred thirty-threeproteins were identified as belonging the cell membranes of *Paracoccidioides* sp.. Eighty-eight proteins showed at least one transmembrane domain and thirteen identified proteins showed a signal peptide at the N-terminus, beyond the transmembrane domain. Different forms of association of the proteins with membranes of *Paracoccidioides* sp. were detected, including domain transmembrane, GPI anchor, prenylation, myristoylation, palmitoylation. The most of the of integral membrane proteins identified in proteome were annotated in the genome of *Paracoccidioides* sp. Together these results show the

establishment of an experimental protocol for the extraction of membranes proteins of *Paracoccidioides* spp., as well identify proteins from membrane fractions this fungus.

keywords: *Paracoccidioides* sp., membrane proteins, methodology.

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 Classificação filogenética

O gênero *Paracoccidioides* (MATUTE et al., 2006, TEIXEIRA et al., 2009) compreende os agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), durante um longo período de tempo *Paracoccidioides* spp. foi considerado como um fungo imperfeito devido a falta de conhecimento sobre a sua fase sexuada (BAGAGLI et al., 2008). Entretanto, atualmente com os avanços nas técnicas moleculares *Paracoccidioides* spp. está filogeneticamente classificado como pertencente ao filo Ascomicota, ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae (UNTEREINER et al., 2004). Inicialmente o gênero *Paracoccidioides* incluía apenas uma espécie, *Paracoccidioides brasiliensis*, como o agente etiológico da PCM. Entretanto, análises de polimorfismo genético determinaram que o gênero *Paracoccidioides* é composto de pelo menos três espécies filogenéticas. Tais espécies filogenéticas são divididas em SI (espécie filogenética 1) englobando 38 isolados, PSII (espécie filogenética 2) com cinco isolados e PSIII (espécie filogenética 3) abrangendo 21 isolados (MATUTE et al., 2006, CARRERO et al., 2008).

Em 2009 Teixeira e colaboradores empregando o método de reconhecimento de espécies filogenéticas por concordância genealógica detectou uma possível nova espécie dentro do gênero *Paracoccidioides,* tal espécie é altamente divergente das outras três espécies pertencentes à SI, PSII e PSIII, a nova espécie foi denominada como *Pb*01-like ou *Paracoccidioides lutzii.* Outra possível nova espécie filogenética foi recentemente sugerida denominada como PS4, sendo os isolados clínicos recuperados de paciente na Venezuela (BOCCA et al., 2013). Desta forma através de técnicas moleculares foi possível distinguir diferenças em nível molecular entre as espécies pertencentes ao gênero *Paracoccidioides*, (MATUTE et al., 2006, CARRERO et al., 2008, TEIXEIRA et al., 2009), embora pouco se sabe sobre diferenças epidemiológicas e morfológicas entre as espécies filogenéticas. Portanto, em função do exposto, a dissertação de mestrado adota a forma de escrita *Paracoccidioides* spp. para referenciar as espécies filogenéticas que formam o gênero *Paracoccidioides.*

1.2 *Paracoccidioides* spp.: Aspectos gerais

Paracoccidioides spp. foi descrito pela primeira vez por Adolpho Lutz em 1908, que isolou esse micro-organismo de pacientes que apresentavam lesões na mucosa oral. Este fungo apresenta como característica o dimorfismo térmico, ou seja, nos tecidos do hospedeiro a 36ºC, esse micro-organismo cresce como levedura, e em temperatura ambiente entre 20 e 28ºC apresenta-se na forma miceliana (RESTREPO, 1985). A forma de levedura é caracterizada por brotamentos múltiplos originadas da célula mãe, uma célula grande e central, rodeada por células periféricas menores, com aspecto de roda de leme de navio, já os micélios são septados formados por conídios terminais ou intercalares (QUEIROZ-TELLEZ, 1994, RESTREPO, 2003).

Sabe-se que *Paracoccidioides* spp. possui ao menos dois nichos ecológicos conhecidos, o primeiro corresponde ao seu estado filamentoso que vive no solo como saprobiótico e o segundo corresponde a sua associação com o homem sob a forma de levedura (BAGAGLI et al., 2006). Durante a fase saprobiótica ou miceliana o fungo encontra-se sobre a influência de fatores ambientais como umidade do solo, mudança na temperatura e competição com outros micro-organismos. Na fase parasitária ou de levedura o patógeno adapta-se a diferentes habitats podendo ocupar variados nichos em órgãos internos do corpo do hospedeiro, dependendo da sua tolerância a mudanças na temperatura, influência hormonal e às respostas do sistema imune do hospedeiro (Figura-1) (BAGAGLI et al., 2008).

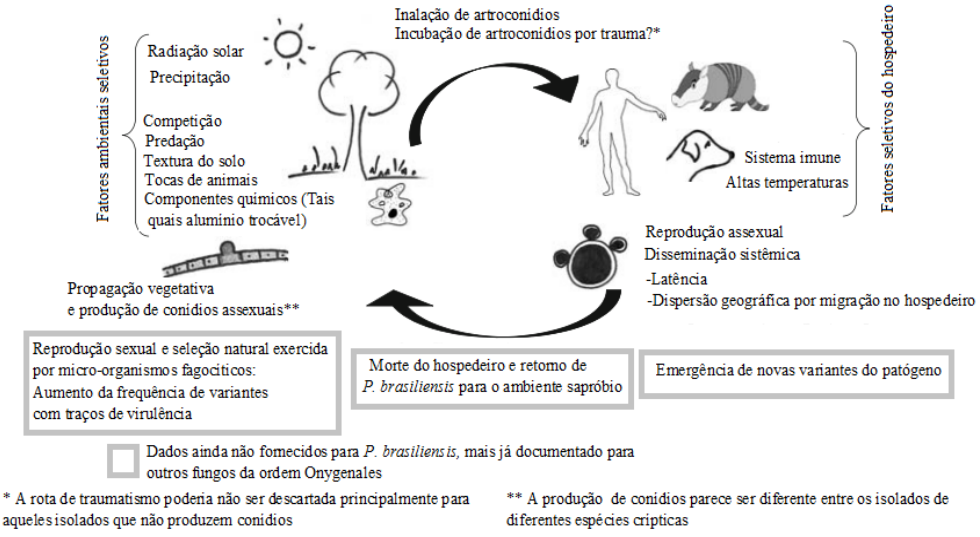


Figura 1- Ciclo biológico hipotético de *Paracoccidioides* spp.. São enfatizadas algumas forças seletivas que podem atuar sobre seu suposto nicho ecológico no hospedeiro e no ambiente saprobiótico (adaptado de BAGAGLI et al., 2008).

Durante muitos anos foi descrito que *Paracoccidioides* spp. tinha como único hospedeiro o ser humano. Entretanto alguns animais como tatus do gênero *Dasypus noveminctus* em áreas endêmicas da doença foram identificados como portadores da infecção, sendo o fungo isolado de diferentes órgãos deste hospedeiro (BAGAGLI et al., 1998). Este fungo também tem sido identificado em outros animais silvestres e domésticos. Análises da presença de *Paracoccidioides* spp. em animais silvestres mortos em estradas, através de Nested-PCR (reação em cadeia de polimerase), identificou o fungo em tatus (*Dasypus septemcinctus*), gambá (*Didelphis albiventris*), guaxinim (*Procyon cancrivorus*) e porco espinho (*Sphiggurus spinosus*) (RICHINI-PEREIRA et al., 2008). Dados epidemiológicos também sugerem que animais como cães possam ser infectados por este patógeno, em 2004 foi relado o primeiro caso de paracoccidioidomicose em cachorro (RICCI et al., 2004).

A rota de infecção no homem por este fungo se dá através das vias respiratórias e em muitos casos a infecção é controlada pelo sistema imune do hospedeiro tornando-se assintomática (MOREJÓN et al., 2009). Em outros casos a doença pode tornar-se ativa causando inicialmente lesões nos pulmões e subsequentemente disseminando-se para outros órgãos e tecidos (WALMSLEY et al., 2002). Um fator de risco para adquirir a infecção por este fungo são as atividades agrícolas relacionados ao manejo do solo. Inúmeros casos diagnosticados de PCM demonstram que na maioria das vezes, profissões relacionadas ao manejo do solo foram exercidas pelos pacientes, anos antes do desenvolvimento dos sintomas da doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

1.3 Paracoccidioidomicose (PCM)

Paracoccidioidomicose (PCM) anteriormente conhecida como blastomicose sul americana é uma micose sistêmica endêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides* (CATAÑO e AGUIRRE, 2013). A transmissão desta micose se dá através da inalação da forma saprobiótica deste fungo os conídios ou propágulos micelianos. Estes, ao atingirem os alvéolos pulmonares, realizam a transição morfológica, transformando-se em levedura, a qual pode disseminar-se pelas vias linfática e/ou hematogênica para outros locais do organismo hospedeiro (MCEWEN et al., 1987). O desenvolvimento desta micose pode ocorrer imediatamente ou anos após a infecção fúngica, manifestando-se sobre duas formas clínicas: forma aguda/juvenil e forma crônica, conforme o tempo de evolução da doença e idade do hospedeiro (FRANCO et al., 1987).

A forma aguda ou juvenil é caracterizada pelo envolvimento do sistema mononuclear fagocítico (FRANCO et al., 1987) com evolução rápida dos sintomas levando a altas taxas de mortalidade, acometendo adolescentes, crianças (BRUMMER et al., 1993) e eventualmente adultos jovens com até 35 anos de idade, afetando homens e mulheres na mesma proporção. Os sintomas incluem febre, perda de peso, anemia leve ou moderada. Adicionalmente, fígado, baço e nódulos linfáticos são frequentemente aumentados, múltiplas lesões são observadas na pele e mucosa, sendo que cerca de 5% dos casos diagnosticados da PCM apresentam-se sobre esta forma (SHIKANAY-YASUDA et al., 2006).

A forma crônica apresenta progressão mais lenta, com gravidade leve ou moderada, entretanto sequelas são observadas em um terço dos casos (BRUMMER et al., 1993, BOCCA et al., 2013). O pulmão é o órgão mais afetado, seguido por lesões na pele, mucosa oral e nasal (MOREJÓN et al., 2009). A PCM crônica é a forma mais comum desta micose, podendo ser unifocal quando apenas um órgão é afetado; geralmente o pulmão (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). A forma multifocal implica no envolvimento de sítios extrapulmonares tais quais, pele e mucosas. Os sintomas incluem dores durante a mastigação, salivação excessiva, perda de peso, tosse, fraqueza e dispneia (WANKE e AIDÊ, 2009). A faixa etária mais acometida por esta micose na forma crônica situa-se entre 30 a 60 anos e em torno de 90% dos casos diagnosticados de paracoccidioidomicose pertencem ao gênero masculino (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A alta prevalência desta micose na forma crônica em indivíduos do gênero masculino relaciona-se ao fato que a manipulação do solo gera aerossóis contaminados com propágulos que podem ser inalados (FRANCO et al., 2000). Outro fator que favorece a infecção em homens é a ausência do hormônio 17 β estradiol presente nas mulheres em período fértil. A presença de uma proteína citoplasmática neste patógeno com capacidade de ligação ao hormônio provavelmente impede a transição morfológica de micélio para levedura, após a interação entre proteína e o hormônio, desta forma conferindo uma resistência natural à infecção por este patógeno em mulheres (RESTREPO et al., 1984).

A PCM é autóctone na América do Sul e a incidência desta micose em zonas endêmicas varia de 3 a 4 novos casos por milhão de habitantes. Dados do Ministério da Saúde apontam para a existência de 3.181 casos de óbito por esta micose entre os anos de 1980-1995, resultando numa taxa de mortalidade de 1,45 casos por milhão de habitantes

(COUTINHO et al., 2002). A paracoccidioidomicose é considerada a oitava causa de morte por doença crônica entre as doenças parasitárias e infecciosas. Muitos países da América Latina como Brasil, Venezuela, Colômbia e Equador relataram a presença de indivíduos portadores da PCM (Figura-2) (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

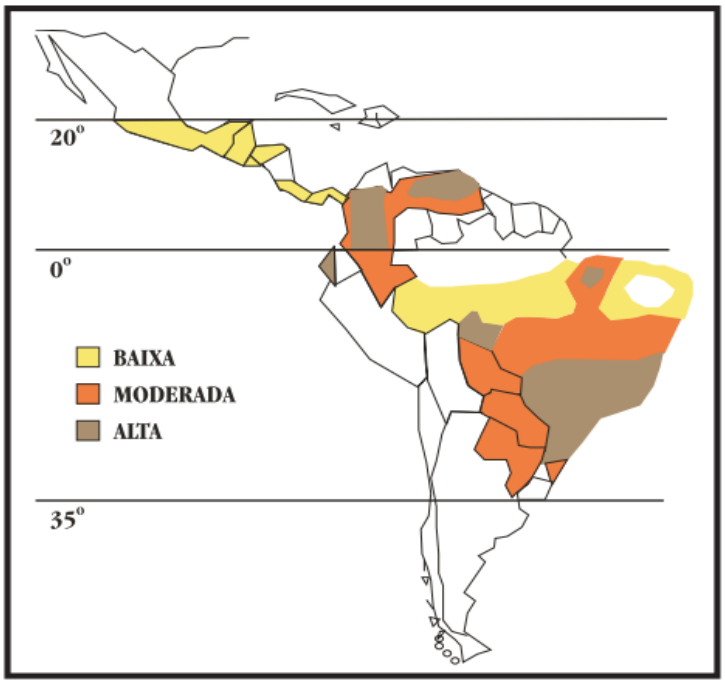


Figura 2- Distribuição geográfica da PCM (Fonte: SHIKANAI-YASUDA et al., 2006)

A PCM representa um importante problema de saúde pública devido ao seu alto potencial incapacidade e a quantidade de mortes prematuras causada por esta micose principalmente em determinados segmentos sociais como trabalhadores rurais (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Casos de PCM têm sido descritos em várias regiões da América do Sul. Cataño e Aguirre (2013) relataram a ocorrência desta micose em um indivíduo com trinta anos de idade, trabalhador de uma mina de ouro, na região rural da Colômbia. Casos de PCM também foram descritos em áreas não endêmicas da doença, como na Holanda no continente Europeu, embora o perfil epidemiológico do paciente sugira que a infecção tenha ocorrido décadas antes na América do Sul (VAN et al., 2006).

O tratamento da PCM abrange várias estratégias dependo da manifestação da doença. Itraconazol constitui a escolha terapêutica para as formas leves e moderadas da micose. Em pacientes apresentando a forma grave da doença, necessitando de internação hospitalar, a anfotericina B é o medicamento indicado. Além disso, anfotericina ou sulfametoxazol, em

associação com trimetoprim é o tratamento de escolha para gestantes. Adicionalmente, em pacientes com problemas renais, a droga indicada é o itraconozol e para crianças a medicação seria feita a partir de uma associação entre sulfametoxazol e trimetoprim (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). A terapia medicamentosa desta micose geralmente é prolongada, com muitos pacientes recebendo a medicação entre um a dois anos e na ausência da terapia a doença geralmente é fatal (WALMSLEY et al., 2002). Outros fatores como estado nutricional do paciente, hábito de beber, ou outras morbidades podem influenciar no tratamento e cura da doença (MARQUES, 2013).

1.4 Estudos relacionados com estruturas constituintes das membranas de *Paracoccidioides* spp.

Membranas biológicas desempenha funções essenciais para a sobrevivência das células (TAN et al., 2008), transportadores localizados nestas estruturas são responsáveis pela translocação de micronutriente e íons. Análises do genoma de *Paracoccidioides* spp. demonstraram que este fungo possui genes homólogos aqueles que codificam proteínas de membrana responsáveis pela captação de metais como ferro, cobre e zinco. Entre as proteínas identificadas incluem metaloredutases (Frep) e ferroxidases (Fetp) envolvidas na assimilação de ferro redutiva, transportador de cobre de alta afinidade (Ctr3p), transportadores de zinco da família ZIP incluindo Zrt1p e Zrt2p, além de transportadores de sideróforos Sit1, mirB e mirC (SILVA et al., 2011).

Vesículas são compartimentos compostos de uma bicamada lipídica, originadas de membranas pré-existentes. Vesículas extracelulares são secretadas por muitos fungos patogênicos. Nesse sentido, estudos da composição lipídica de vesículas extracelulares de dois isolados do fungo *Paracoccidioides* spp. (*Pb*3) e (*Pb*18) detectaram a presença de uma constituição lipídica diferente entre os dois isolados, sugerindo que essa variação na composição lipídica de vesículas extracelulares poderia modular diferentes respostas no hospedeiro (VALLEJO et al., 2012).

Estudos realizados por meio de análise das sequências expressas (do inglês Expressed Sequence Tags, EST) avaliando o perfil transcricional de *Paracoccidioides* sp. (*Pb*01) durante as etapas iniciais da transição de micélio para levedura revelaram aumento da expressão de genes envolvidos no remodelamento e biossíntese da parede celular e membrana plasmática. Trinta e quatro genes apresentaram expressão aumentada em resposta à mudança na

temperatura, incluindo genes que codificam transportador de açúcar (stl1), enzima ácido graxo desaturase (desA) e enzimas da via de biossíntese do ergosterol. A presença destas duas últimas classes de enzimas evidencia que durante a transição de micélio para levedura o remodelamento da membrana é ativado (BASTOS et al., 2007).

1.5 Membranas biológicas

Membranas biológicas formam uma barreira entre o ambiente externo e o interior celular. Em eucariotos as membranas biológicas, além de atuarem como barreiras celulares são responsáveis pela compartimentalização intracelular de organelas. Membranas de organelas intracelulares incluem as que constituem a membrana interna e externa da mitocôndria, vesículas secretórias, lisossomos, aparato de Golgi, retículo endoplasmático, além da membrana que reveste o envelope nuclear. Desta forma, membranas biológicas podem ter funções distintas dentro do organismo dependendo da sua localização celular (TAN et al., 2008).

O modelo básico de estrutura das membranas celulares apresenta-se na forma de mosaico fluido, consistindo de uma bicamada lipídica com proteínas embebidas (SINGER e NICOLSON, 1972). Interações hidrofóbicas mantêm a cadeia de ácidos graxos não polares dos fosfolipídios, juntamente com os resíduos de aminoácidos apolares das proteínas no interior da bicamada, distante do contato da água. Interações hidrofílicas entre os grupos polares dos fosfolipídios e das proteínas aumentam o contato com a parte aquosa na superfície da bicamada (SINGER e NICOLSON, 1972). O mosaico de membrana é fluido porque a maioria das interações entre os seus componentes são não covalentes, permitindo que proteínas e lipídios movimentem-se lateralmente no plano da membrana (NELSON e COX 2011).

Durante muitos anos o modelo de mosaico fluido foi amplamente empregado para descrever a conformação das membranas celulares. No entanto, tal estrutura adquire uma forma mais complexa do que uma bicamada lipídica homogênea. No interior da bicamada existem regiões especificas em função, estrutura e composição denominadas microdomínios os quais englobam plataformas lipídicas; estas regiões muitas vezes são resistentes ao tratamento com detergentes e são insolúveis na presença de Triton (MALINSKY et al., 2013). Microdomínios de membrana, como plataformas lipídicas, são altamente dinâmicos e heterogêneos (FUJITA e KINOSHITA, 2012b), enriquecidos em colesterol e esfingolipídios

(SIMONS e IKONEN, 1997). Atuam como uma plataforma para associação de moléculas sinalizadoras (FUJITA e KINOSHITA, 2012b), desempenham papel específico durante resposta ao estresse e são enriquecidos em proteínas ancorados a glicosilfosfatidilinositol (MARMAGNE et al., 2007).

Fosfolipídios e proteínas são distribuídos de forma assimétrica entre a face externa e interna da bicamada. A assimetria das membranas celulares favorece distribuições diferentes entres as enzimas localizadas em ambas as regiões da bicamada, assim como fosfolipídios, oligossacarídeos e proteínas. Desta forma, mantendo diferenças na composição entre a face externa e interna da bicamada, as células favorecem a exposição apropriada de receptores, moléculas de adesão, sistema de sinalização, contidos em diferentes locais da bicamada lipídica. Diferentes tipos de interação ocorrem com proteínas integrais de membrana, glicoproteínas, lipídios de membrana, sistema de membranas associadas ao citoesqueleto. Estas interações não aleatórias são importantes para controlar mobilidade, distribuição e estado agregado dos componentes de membrana (NICOLSON, 2013).

Membranas celulares são estruturas altamente dinâmicas e mudanças nas interações entre os componentes de membrana são especialmente importantes para determinar suas propriedades funcionais (NICOLSON, 2013). A estrutura das membranas biológicas é principalmente determinada por sua constituição lipídica, embora muitas funções das membranas celulares sejam executadas por diferentes proteínas. Conjuntos de proteínas embebecidas dentro de cada membrana celular permitem que tais estruturas realizem funções distintas dentro da célula. Além disso, dependendo da necessidade celular a quantidade e o tipo de proteína pode variar entre as membranas de diferentes células e organelas. Estima-se que 50% da massa da maioria das membranas celulares seja composta por proteínas; a proporção de moléculas de proteínas para lipídios em uma bicamada lipídica encontra-se na faixa de 50/1, ou seja, para cada cinquenta moléculas lipídicas existe uma molécula proteica (TAN et al., 2008).

1.6 Proteínas constituintes das membranas celulares

As funções da bicamada lipídica são muitas vezes influenciadas pela sua constituição proteica. Proteínas de membrana podem ser classificadas em três categorias: Proteínas integrais de membrana, proteínas periféricas e proteínas ancoradas a membrana por ancoras de glicosilfosfatidilinositol (YADETA et al., 2013). Proteínas integrais de membrana

desempenham variadas funções na célula, incluindo o controle do balanço osmótico, reconhecimento da resposta imune, adesão celular (GILMORE e WASHBURN, 2010). Adicionalmente, as proteínas integrais transportam íons e outras moléculas para dentro e fora das organelas ou da célula seletivamente. Assim, na membrana interna da mitocôndria, um complexo proteico forma a cadeia respiratória que é responsável em grande parte pela produção de energia na célula. As proteínas integrais atuam como receptores captando os sinais do ambiente extracelular e transmitindo para o interior da célula, o que permite que o comportamento celular seja alterado em resposta a estímulos externos (TAN et al., 2008) além de serem alvos para muitos fármacos no tratamento de infecções (GILMORE e WASHBURN, 2010). Proteínas integrais de membrana associam-se à bicamada lipídica através de domínios transmembrana hidrofóbicos (GREAVES e CHAMBERLAIN, 2007). A inserção de uma proteína integral na membrana plasmática frequentemente envolve uma via de secreção (MARMAGNE et al., 2007). Muitas proteínas integrais de membrana contêm um peptídeo sinal na porção N-terminal da proteína para secreção e direcionamento à membrana através do retículo endoplasmático e aparato de Golgi (YADETA et al., 2013).

A natureza hidrofóbica dos fosfolipídios da porção interna da bicamada mantém a estrutura das proteínas integrais de membrana. Ligações peptídicas são altamente polares, desta forma proteínas integrais de membrana adotam estruturas secundárias impedindo interações entre as ligações peptídicas e a porção apolar dos fosfolipídios. Isto resulta em duas características estruturais entre as proteínas integrais de membrana: Hélice α e conformação β (SPEERS e WU, 2007). Conformação β é uma estrutura comum na membrana externa de bactérias gram-negativas (JAGANNADHAM e SARANYA, 2011), cloroplastos e mitocôndrias e permite o efluxo/influxo passivo de pequenas moléculas (SPEERS e WU, 2007). Proteínas integrais de membrana em conformação hélice α são constituídas por um ou mais domínios hidrofóbicos (KANAPIN et al., 2013). Proteínas em conformação hélice α são formadas pela união consecutiva de muitos aminoácidos; tipicamente em torno de 15 a 25 aminoácidos não polares são necessários para atravessar a bicamada lipídica. Estes aminoácidos exibem valores de hidrofobicidade positivo e desta foram contribuem para as características hidrofóbicas compartilhadas entre as proteínas integrais de membrana (SANTONI et al., 2000). As proteínas integrais de membrana podem ser classificadas em três categorias. As proteínas do tipo I apresentam apenas um domínio transmembrana cuja porção N-terminal é orientada para o espaço extracelular; proteínas do tipo II apresentam um domínio

transmembrana e a porção N-terminal da proteína é voltada para o interior celular e tipo III constituem as proteínas multipasso, formadas por múltiplos domínios transmembrana cujas porções N- e C-terminais são orientadas para o espaço luminal ou extracelular (ALBERTS, 1994).

Ao contrário das proteínas integrais de membrana, proteínas periféricas não atravessam a bicamada lipídica. Tais moléculas associam-se à superfície da membrana diretamente através de interações com os lipídios, ou indiretamente através de interações com as alças hidrofílicas das proteínas integrais de membrana (TAN et al., 2008). As proteínas periféricas dissociam-se da membrana muitas vezes através de tratamentos leves, como aumento da concentração iônica (SINGER e NICOLSON, 1972) ou alteração no pH (SPEERS e WU, 2007). Proteínas periféricas englobam aquelas que sofrem modificações pós traducionais pela adição de um ácido graxo. Estas proteínas localizam-se na face citosólica da membrana e frequentemente estão envolvidas em processos de sinalização da membrana com o interior celular (YADETA et al., 2013). Tais modificações ocorrem pela adição dos grupos miristoil, farnesil ou geranil e palmitato aumentando a hidrofobicidade e afinidade destas proteínas a membranas celulares (GREAVES e CHAMBERLAIN, 2007).

A modificação pós traducional pela adição de um ácido palmítico permite o controle espacial e temporal da função proteica (ZHANG et al., 2013). O processo consiste da adição reversível do palmitato, um ácido graxo saturado de 16 carbonos, por meio de uma ligação tioéster ao resíduo de cisteína da proteína (GREAVES e CHAMBERLAIN, 2007). Esta reação é catalisada por um complexo enzimático formado pelas palmitoil-transferases (PATs) ligadas à membrana (ZHANG et al., 2013).

A miristoilação de proteínas consiste na ligação covalente de um ácido graxo saturado de 14 carbonos, o ácido mirístico, de forma irreversível à glicina N-terminal da proteína. Proteínas destinadas a miristoilação apresentam uma sequência N-terminal formada pelos aminoácidos metionina e glicina. A metionina inicialmente é removida por uma amino-peptidase, seguida pela adição do ácido mirístico na glicina N-terminal por meio de uma ligação amina catalisada pela enzima N-miristoil transferase (NMT) (RESH, 1999). Proteínas que são substrato para ação da enzima N-miristoil transferase são envolvidas em vias de sinalização intracelular, oncogênese e estrutura viral. Exemplos de proteínas miristoiladas

incluem as proteínas de ligação ao GTP como fator de ribosilação do ADP, tirosina quinase (Abl), e proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (STROH et al., 2004).

Prenilação é outra forma de modificação lipídica pós-traducional envolvida em processos de direcionamento à membrana e interações entre proteínas. Nesta reação um isoprenóide, farnesil de 15 carbonos ou geranil de 20 carbonos, é ligado covalentemente através de uma ligação tioéster ao resíduo de cisteína próximo a porção C-terminal da proteína (CASEY e SEABRA, 1996). Preniltransferases são responsáveis pela transferência do isoprenóide à molécula proteica. Farnesiltransferase (FTase) e geranil-transferase do tipo I, transferem o grupo farnesil e geranil, respectivamente, à proteínas com motivo CaaX, sendo que (C) é uma cisteína, (aa) aminoácido alifático e (X) um aminoácido variado que determina qual enzima atuará sobre a proteína. Rab geranilgeranil transferase ou geranil-transferase do tipo II transfere o grupo geranil a proteínas com motivo (CxC), o qual significa cisteína, aminoácido variado e cisteína ou motivo (CC) cisteína/cisteína (MOORES et al., 1991).

Outra forma de modificação pós-traducional engloba a ligação de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol em um motivo existente na região C-terminal da proteína (FERGUSON et al., 1988). Estas proteínas localizam-se na porção externa da membrana plasmática (RICHARD e PLAINE 2007). A estrutura central da âncora de GPI consiste de um grupo lipídico, responsável por ligar a proteína na membrana plasmática, um grupo inositol (I), um grupo glicosamina (GlcN), três resíduos de manose (M) e um grupo fosfoetanolamina (EtNP) responsável por ligar a âncora de GPI à porção C terminal da proteína por meio de uma ligação amina (TIEDE et al., 1999) (Figura-3).

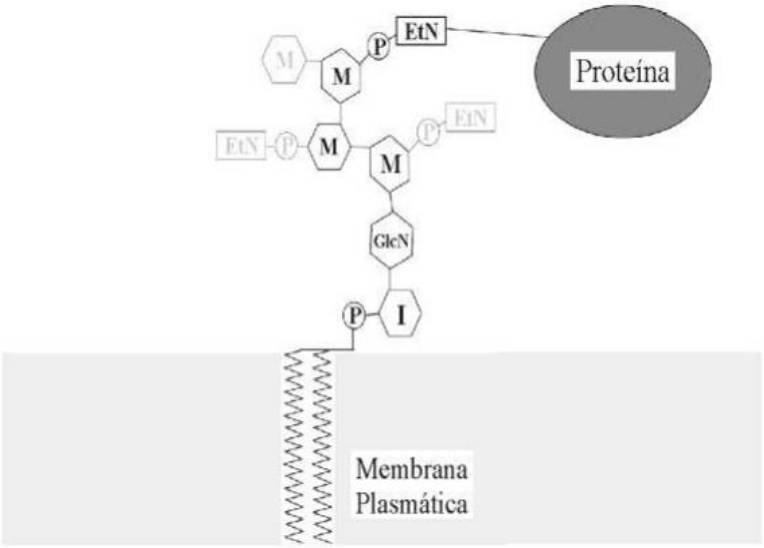


Figura 3- Estrutura geral de uma proteína ancorada à GPI ligada à membrana plasmática. Componentes da âncora de GPI: Inositol (I) Manose (M), Fosfato (P), Glicosamina (GlcN) e Etanolamina (EtN). (Adaptado de Richard e Plaine, 2007).

Proteínas ancoradas à GPI contêm um peptídeo sinal na porção N-terminal, que direciona a proteína ao retículo endoplasmático e um segundo sinal para a ligação à âncora GPI na porção C-terminal da proteína. Durante a ligação da âncora de GPI à proteína, o sítio ω composto de dois aminoácidos (ω+1, ω+2) na posição C-terminal da proteína é clivado e a porção da âncora de GPI torna-se covalentemente ligada à proteína. Esta reação ocorre no lúmen do retículo endoplasmático (HAMADA et al., 1998). Proteínas ancoradas ao resíduo de GPI são transportadas do retículo endoplasmático para o aparato de Golgi (MUÑIZ et al., 2001) e posteriormente transportadas para a superfície da membrana plasmática ou parede celular (HAMADA et al., 1998). Em muitos casos a porção lipídica da âncora de GPI sofre remodelamento durante o direcionamento à membrana. Tal mecanismo permite que esta classe de proteínas associe-se a microdomínios da membrana plasmática (FUJITA e KINOSHITA, 2012b). A interação da porção lipídica de proteínas ancoradas ao GPI com a porção ceramida dos esfingolipídios e com o colesterol constituem a base da associação das proteínas ancoradas ao GPI com as plataformas lipídicas de membrana (FUJITA e KINOSHITA, 2010a).

1.7 Proteoma de membranas

Análises de genomas eucarióticos revelaram que em torno de 30% dos quadros de leitura aberto (ORFs) codificam para proteínas integrais de membrana (WALLIN e HEIJNE, 1998). Entretanto, proteínas de membrana são sub-representadas em análises proteômicas

principalmente devido à heterogeneidade da amostra, hidrofobicidade e abundância relativamente baixa (TAN et al., 2008).

A natureza heterogênea desta classe de proteínas é atribuída a alguns fatores como: variação na proporção de domínios transmembrana e alças hidrofílicas entre as diferentes proteínas integrais de membrana; a quantidade e tipo de proteína de membrana alteram conforme o estágio de desenvolvimento e tipo celulares; a composição e concentração proteica são diferentes entre cavéolas e plataformas lipídicas presentes na bicamada e diferentes proteínas de membrana possuem uma variação muito grande em relação ao grau de modificação pós- traducional como glicosilação e fosforilação (RUCEVIC et al., 2011). Em adição, proteínas integrais de membrana são fracamente solubilizadas em tampões aquosos o que dificulta sua extração da bicamada lipídica e consequentemente influencia nas etapas posteriores de separação em análises proteômicas (SANTONI et al., 2000). Além disso, diferenças na abundância das proteínas dentro da célula variam grandemente, dificultando a identificação de proteínas menos abundantes, característica esta compartilhada por proteínas de membranas (GILMORE e WASHBURN, 2010). Outro fator que dificulta o estudo de proteínas de membrana é constituído pela inibição da atividade de enzimas trípticas sobre os segmentos transmembrana de proteínas integrais (HOPFF et al., 2013). Desta forma, estabelecer um protocolo capaz de abranger todas essas características constitui um desafio proteômico (RUCEVIC et al., 2011).

Inúmeras técnicas têm sido descritas na literatura a fim de obter o proteoma de membrana, entre elas tratamento com detergentes, solventes orgânicos, ácidos orgânicos, e aumento do pH (WU et al., 2003). O uso de detergentes e solventes orgânicos favorecem a solubilização de proteínas contidas na membrana. Entretanto, resulta na perda de informação sobre a topologia nativa e muitas vezes o uso de detergentes como SDS influencia nas etapas posteriores de separação das proteínas (WASHBURN et al., 2001). Outro método utilizado para o estudo de proteínas de membrana emprega carbonato de sódio (Na_2CO_3) em pH elevado. Esta técnica permite a liberação do conteúdo contido em frações celulares de membrana, por tornarem estruturas fechadas com vesículas em estruturas abertas, liberando proteínas que não associam-se fortemente a membrana (FUJIKI et al., 1982).

Análise do perfil proteômico de *Bordetella pertussis* durante a privação de ferro, empregando carbonato de sódio pH 11, permitiu a identificação de proteínas de membrana

relacionadas ao metabolismo de ferro como receptor de sideróforo férrico BrfB , proteína de ligação ao ferro AfuA, e uma destas proteínas de membrana externa identificada foi altamente imunogênica em soros de pacientes infectados com *Bordetella pertusis* (VIDAKOVICS et al., 2006). Análise proteômica da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* durante o estresse salino, empregando lise celular com pérolas de vidro, centrifugação diferencial, precipitação com ácido e remoção de contaminantes contidos na fração de membrana plasmática utilizando o método de carbonato de sódio em pH elevado, permitiu a identificação de proteínas integrais de membrana e proteínas ancoradas a lipídios. Entre as proteínas identificadas incluem-se ATPase H+ (Pma1p), Rho GTPase (Bem 2p), t-SNARE (Sso2p), Gas1p, o uso destas metodologias permitiu compreender como as proteínas de membranas plasmática presentes nas células de *S. cerevisiae* respondem ao estresse salino (SZOPINSKA et al., 2011).

Molley e colaboradores (2000), estudando a constituição proteica da membrana externa (OMPs) da bactéria *Escherichia coli* identificaram proteínas integrais de membrana externa incluindo porinas, receptor de ferro ferricromo, receptor de vitamina B12, além de cinco lipoproteínas associadas à membrana externa. Posteriormente, estudos com privação de ferro realizados com a mesma bactéria permitiu a identificação de receptores de ferro não identificados no proteoma inicial quando as células foram submetidos ao crescimento em meio contendo ferro, demostrando desta forma a eficiência do método empregando elevação do pH com carbonato de sódio para identificar proteínas localizadas na membrana externa de bactérias gram negativas. (MOLLEY et al., 2000). O perfil proteômico da membrana de três espécies de bactérias patogênicas do gênero *Borrelia* foram avaliados a fim de se caracterizar as proteínas expressas na membrana externa. Para tal, foram empregadas três metodologias de extração, que consistiam em: (i) extração utilizando detergente; (ii) digestão parcial com tripsina das proteínas expressas na superfície e (iii) biotinilação das proteínas e separação em coluna de estreptavidina. As análises revelaram uma pequena sobreposição das proteínas identificadas entre as espécies utilizando as três abordagens, demonstrando que abordagens proteômicas de membrana englobando várias estratégias podem fornecer melhor informação sobre as proteínas constituintes da membrana externa (GESSLBAUER et al., 2011).

Inúmeras estratégias proteômicas têm sido descritas na literatura com intuito de caracterizar proteínas de membranas assim como entender as funções executadas dentro da

célula em muitos micro-organismos. Alguns estudos relacionados com a membrana de *Paracoccidioides* spp. já foram realizados; entretanto a descrição das proteínas pertencentes às membranas de *Paracoccidioides* spp. permanece não caracterizada. Devido à importância desta classe de proteínas, análises proteômicas descritivas devem ser realizadas no intuito de se compreender a constituição proteica das membranas de *Paracoccidioides s*pp. e os processos celulares realizados por tais proteínas. Para tanto, faz-se necessário a padronização de um protocolo para extração de proteínas de membranas.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Proteínas constituintes de diferentes membranas celulares realizam inúmeros processos essenciais para a sobrevivência da célula, como transporte de micronutrientes e íons, sinalização celular, adesão, respostas ao estresse, captação de estímulos ambientais, formação de vesículas e produção de energia.

Dados proteômicos de membranas de micro-organismos patogênicos e não patogênicos revelam a importância desta classe de proteínas para o crescimento e desenvolvimento celular, assim como para as respostas adaptativas de micro-organismos patogênicos a ambientes que mimetizam o encontrado no hospedeiro, sendo esta classe de proteínas fundamentais durante o processo de interação patógeno-hospedeiro. Entretanto, tais moléculas apresentam características estruturais que dificultam sua análise e consequente definição da localização subcelular e função dentro da célula.

No fungo patogênico *Paracoccidioides* spp. estudos do perfil transcricional durante a transição de micélio para levedura revelaram alterações na expressão de genes envolvidos com o remodelamento da membrana. Ainda, sistemas de captação de micronutrientes localizados na membrana plasmática foram descritos, por meio de análises *in silico*. Entretanto, até o momento nenhum estudo demonstrando a composição proteica das membranas de *Paracoccidioides* spp. foi realizado. Sendo assim, a definição de uma metodologia para extração desta classe de proteínas poderá fornecer informações sobre tais estruturas essenciais à sobrevivência celular, assim como favorecer o estudo das proteínas de membranas neste fungo patogênico humano.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Proteínas de membranas são envolvidas em muitos processos celulares fundamentais para sobrevivência. Entretanto, tais proteínas apresentam peculiaridades que dificultam seu estudo. Portanto o presente trabalho teve como objetivo geral otimizar um protocolo para a obtenção de proteínas de membranas do fungo patogênico *Paracoccidioides* sp..

3.2 Objetivos específicos

●Otimização de protocolo para obtenção de proteínas de membranas;

●Realização de microscopia eletrônica de transmissão, com o intuito de verificar a capacidade do protocolo padronizado para obter uma fração enriquecida com membranas celulares;

●Obtenção de extrato proteico de membranas após a otimização da metodologia;

●Digestão e identificação das proteínas de membranas;

●Análises *in silico* das proteínas identificadas (busca de domínios);

● Classificação funcional das proteínas identificadas;

● Determinação da localização subcelular;

● Comparação dos genes de *Paracoccidioides* sp. que codificam proteínas integrais de membranas com os dados obtidos no proteoma de membranas deste fungo.

Capítulo 2

4. MANUSCRITO

Analysis of the proteins contained in the membrane fractions of the pathogenic fungus *Paracoccidioides* sp.

de CURCIO, J.S.[1]; SILVA, M.G.[1]; BAILÃO, M.G.S.[1,]; CASALETTI L.[1]; BÁO, S. N.[2]; BAILÃO, A.M.[1]; SOARES, C.M.A[1]

[1] Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil. [2]Laboratório de Microscopia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil. e-mail: cmasoares@gmail.com

Abstract

The genus *Paracoccidioides* comprises the etiologic agents of paracoccidioidomycosis, the most widespread systemic mycosis in Latin America. Proteomic studies in various pathogenic microorganism has shown the importance of the membrane proteins during the process of host-pathogen interaction, adaptive responses. However, these proteins exhibit structural peculiarities that impair proteomic studies. The present study utilized a methodology that combined ultracentrifugation and high pH to obtain membrane proteins. Proteomic analysis using nano-UPLCMS^{E} allowed the identification of 133 proteins that were classified as belonging the cell membranes of *Paracoccidioides* sp.. The forms of association of those with the cell membranes were mainly through transmembrane domain (65, 41%) following by prenylation (8, 27%) and myristoylation (2, 25%). The most integral membrane proteins identified in this study already been noted in the genome of *Paracoccidioides* sp., although some proteins identified have not been described in the genome this this pathogen. The main cellular processes performed by proteins of membrane of *Paracoccidioides* sp., were cell transport and energy. The data found in the literature corroborate with the information obtained in the proteome of membranes about the localization and cell functions this class of proteins in *Paracoccidioides* sp. Therefore, the methodology used allowed the identification of proteins associated with cell membranes of *Paracoccidioides* sp., in addition of identify the forms of association with these structures and understand roles played by these proteins, favoring the study this class of proteins in this important human pathogen.

Introduction

The genus *Paracoccidioides* comprises the etiologic agents of paracoccidioidomycosis (PCM), the most widespread systemic mycosis in Latin America. As thermodimorphic fungi, *Paracoccidioides* spp. grows as mycelia in the environment and in the yeast phase at 36º C and in host tissues [1]. The route of infection by this fungus occurs through respiratory pathways [2], in which the inhalation of conidia or mycelial propagules allow these structures to reach the host lung epithelium performing the dimorphic transition and differentiating into the yeast cell[3]. This mycosis represent a public health problem important due its inability potential

and the quantity premature deaths particularly in certain segments of society with rural workers [4].

An important aspect for development of the disease is the transition of the conidia or mycelial propagules for in the yeast phase. Transcriptional studies of *Paracoccidioides* sp. during the morphological transition from mycelium to yeast cells, revealed the increased expression of the genes associated with remodeling of the membrane [5]. Additionally, *in silico* analysis revealed that this fungus has genes that encode membrane transporters related to micronutrient homeostasis[6].

Proteomic analyzes of membranes of pathogenic microorganisms can provide information about the mechanisms used by pathogens in their interaction with the host. Analysis of the proteomic profile of the outer membrane of the *Bordetella pertussis* during iron deprivation identified proteins related with the iron metabolism, as well as a highly immunogenic protein[7]. In the outer membrane proteome study of *Escherichia coli*, were identified integral membrane proteins including ferrichrome-iron receptor, vitamin B12 receptor, porins, besides of five outer membrane associated lipoproteins [8].

Around 30% of the open reading frames (ORFs) in eukaryote genomes encode for integral membrane proteins [9]. However, analysis of membrane proteins are underrepresented in proteomic analyzes, owing to the heterogeneous nature of those molecules[10]. Insolubility in aqueous buffers, hindering the extraction steps of the lipid bilayer[11], low relative abundance within cells[12] and inhibition of the tryptic activity in the segments of the integral membrane proteins[13], make those molecules underrepresented in proteomic analysis.

Therefore, to establish a methodology able of encompass all these characteristics is a proteomic challenge[14]. Although membrane proteins perform cellular processes essential to survival of the cell, the knowledge about this class of the proteins is still limited, in *Paracoccidioides* spp. Some studies concerning to cell membranes had been already performed, although the description of membrane proteins remains to be performed. In this way, to establish a methodology to the extraction of membrane proteins will allow a better understanding of function and localization of these proteins in cells, favoring their study.

Materials and Methods

Fungal isolates and culture conditions

Paracoccidioides sp. *Pb* 01 (ATCC MYA-826) was used in all experiments. The yeast phase was maintained *in vitro* by sub culturing at 36ºC in Fava Netto's solid medium[15], every 5 days. Fava Netto's solid medium components were as follows; 1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.3% (w/v) proteose peptone, 0.5% (w/v) beef extract, 0.5% (w/v) NaCl, 4% (w/v) glucose, 1.2% (w/v) agar, pH 7.2.

Obtainment of the cells in phase of yeast

After five days of growth in the medium above, the yeast cells were inoculated in Fava Netto' liquid medium for 72 h at 36ºC. Posteriorly, the cells were washed in phosphate buffered saline (PBS 1X) and centrifuged at 1.200 x *g* for 10 min. at 4ºC. The supernatant was discarded and the cells were then resuspended in PBS 1X. The cells were counted in a Neubauer' chamber, and 5.0. 10^6 cel/mL were inoculated in McVeigh/Morton' liquid medium (MMcM) [16] containing: 4% (w/v) glucose, 0.15% (w/v) KH_2PO_4, 0.05% (w/v) $MgSO_4.7H_20$, 0, 015% (w/v) $CaCl_2.2H_20$, 0,2% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$, 0,2% (w/v) L-Asparagine, 0,02 (w/v) L-Cystine, 1% of vitamin supplement, of 0.1% of trace element supplement, pH 7.0, for 24 h.

Preparation of membranes proteins of *Paracoccidioides* sp.

The yeast cells cultured in McVeigh/Morton' medium (MMcM) were centrifuged at 1200 x *g*, frozen in liquid nitrogen, and disrupted by maceration with a pestle until a fine powder be obtained[17]. The sample was transferred to a new tube, resuspended in 50 mM Tris-HCL pH 7.5 and agitated in vortex with glass beads during 20 min at 4ºC. The material was transferred to a new tube and centrifuged 8,000 x *g* for 10 min at 4ºC. The supernatant was diluted in 10 mL of sodium carbonate (Na_2CO_3) pH 11, and slowly stirred on ice, for 1 h. The carbonate-treated sample was submitted to ultracentrifugation in a Beckman Coulter Optima L-90K centrifuge at 115, 000 x *g* for 1 h, at 4ºC. The supernatant was discarded and the pellet (membranes fraction) was resuspended in 8 mL of 50 mM Tris/HCL pH 7.5 using a glass homogenizer in ice to solubilize the membranes fraction. The sample was submitted the other steps of ultracentrifugation at 115,000 x *g* for 1 h at 4ºC. After this step, the pellet

(membranes fraction) was resuspended in 50 mM of ammonium bicarbonate $(NH_4)_2CO_3$ pH 8.0 and stored at -80ºC [8], subsequently the sample was quantified using the Bradford reagent.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The transmission electron microscopy was performed to confirm the quality of the sample obtained. The procedure employed for transmission electron microscopy of the membranes fraction was based in methodology described by BARBOSA and colleague (2006)[18] with some modifications. The sample was fixed in 2% (v/v) paraformaldehyde, 2% (w/v) glutaraldehyde, in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, for 2 h in room temperature. After washing in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2, the sample was post fixed in 1.6% (w/v) (1:1) solution of osmium tetroxide and potassium ferrocyanide for 1 h. Another washing in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2 and in distilled water, was performed and the sample was maintained for 12 h in the solution of 0.5 % aqueous uranyl acetate at 4ºC. The sample was washed in distilled water, and dehydrated in an ascending series of acetone (v/v) (30, 50, 70, 90, and 100 %). The inclusion of the material occurred in a mixture of (3:1) acetone/ Spurr resin (Eletron Microscopy Sciences, Co) for 6 h., (2:1) acetone/Spurr resin overnight, (1:1) acetone/Spurr resin for 6 h., (2:1) Spurr resin/acetone overnight and finally in pure resin for 6 h.. The sample of the membranes fraction was analyzed in the Transmission Electron Microscope (TEM) type JEM 1011 (Electron Microscopy Sciences, Co.) in the Electron Microscopy Laboratory CEL/IB/ University of Brasilia, DF.

Reduction, alkylation and digestion of proteins to analyses of NanoUPLC-MS^E

After quantification of the protein extract, using the Bradford reagent (Sigma-Aldrich), 400 µg of proteins was prepared to analysis of NanoUPLC-MS^E, as previously described by MURAD and colleague (2011) [19]. A total of 400 µg/µl of the protein extract was transferred to tubes of microfuge and added of 10 µl of 50 mM of ammonium bicarbonate $(NH_4)_2CO_3$ (Sigma-Aldrich) pH 8.5. Next, 300 µl of a solution containing 0.2% (v/v) of RapiGest (Waters) was added the sample, which was stirred in vortex and incubated in dry bath for 15 min, at 80ºC. After this step of incubation, the sample was centrifuged, and reduced by adding of 2.5 µl of 100 mM dithiothreitol (DTT) for 30 min, at 60ºC. Posteriorly, the sample was alkylated by adding of 2.5 µl of 300 mM iodoacetamide (GE, Healthcare) and incubating in the dark, for 30 min, at room temperature. The enzymatic digestion was performed by

adding of 160 µl of solution of trypsin (Promega) in 50 mM of ammonium bicarbonate (Sigma-Aldrich), followed incubation for 16 h at 37ºC. After completion of the digestion, the break down of the surfactant (RapiGest Waters) was performed by adding of 120 µl of 5% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich), followed by agitation and incubation at 37ºC for 90 min. After, the sample was centrifuged at 20,817 x *g* for 30 min at 6ºC. The supernatant was transferred to new tubes and dried in a speed vacuum. The sample was submitted to purification and concentration using a pipette tip with a bed of chromatographic media (ZipTips® C18 Pipette Tips, Milipore, Bedford, MA, USA), and dried in a speed vacuum.

NanoUPLC-MS^E analysis

Before of the analysis by NanoUPLC-MS^E, the sample was resuspended in 36 µl of ammonium formate (Sigma-Aldrich) and 4 µl of the internal standard rabbit phosphorylase B (Waters) was added to peptides, the final concentration of internal standard remained in 100 fml. The sample was transferred for Waters Total Recovery vial (Waters-Micromass, Manchester, UK). The tryptic peptides were analyzed using the nanoACQUITY$^{TM\ 2D}$ system (Waters-Micromass, Manchester, UK) coupled to a Synapt HDMS^{TM} mass spectrometer (Waters-Micromass, Manchester, UK) (Waters). The sample was fractionated ten times in a reverse phase column, with a gradient of acetonitrile (Waters). The lock mass calibrant standard, glufibrinopeptide was used as reference spray of the NanoLockSpray source. The mass spectrometer was operated in V-mode. All analyses were performed with nanoelectrospray ionization in the positive ion mode nanoESI($^+$) with a NanoLockSpray source. The data were collected at a constant collision energy setting of 4 V during low-energy MS^E mode, whereas a step from 15 to 30 V of collision energy was used during the high-energy MS^E mode and the sample was analyzed in triplicate.

Data processing and protein identification

The MS data that were obtained from Nano-UPLC-MS^E were processed and searched using the ProteinLynx (PLGs) version 2.4 (Waters Corporation, Manchester, UK). All searches were conducted using a database of *Paracoccidioides* spp. at (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).
The ion detection and clustering were processed using the PLGs. The data obtained after analyzes by NanoUPLC-MS^E and processing, was evaluated concentration of proteins

obtained in the experiment. The programs FBAT, Maspivot e Spot Fire was used to construction of the graphic dynamic range. The data relative the triplicate of the subdivision was organized in the program FBAT, next concatenated in the Maspivot, and the Spot Fire program was used for construction of the graphic.

***In silico* analyzes**

The data obtained after the analysis by NanoUPLC-MS^{E} were submitted the *in silico* search in database in order of determine the subcellular location and association with cell membranes. To determine the subcellular location of the proteins contained in membranes fraction of *Paracoccidioides* sp., we used the WolFPSORT (http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html) and Gene Ontology GO (hhtt:/pedant.gsf.de/) database. The protein association with membranes evaluated the presence of transmembrane domain and post translational modification. The TMHMM program in version 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) was used to predict transmembrane regions. The big-PI Fungal Predictor program (http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html) was used to predict glycosylphosphatidylinositol anchors. The Myristoylator program (http://web.expasy.org/myristoylator/) and the TermiNator program (http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator3/index.html) were employed in search for myristoylated proteins, and palmitoylated proteins. The prediction for prenylated proteins employed the PrePS-Prenylation Prediction Suite program (http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/index.html). The search for signal peptide used the SignalP program in version 4.1 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). The functional classification of the proteins contained in membranes fraction used the Funcat2 database (http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_brasi_Pb01). The analysis between genome and proteome of *Paracoccidioides* sp. were performed by comparison of the list of the genes that encode integral membrane proteins described by DESJARDINS and colleague [20], with the data obtained in this study. The list of genes was kindly provided by Christina Cuomo (Broad Institute).

Results

Transmission Electron Microscopy (TEM) of the membranes fraction of *Paracoccidioides* sp.

Transmission Electron Microscopy (TEM) was performed to demonstrate the presence of an enriched fraction with cell membranes of *Paracoccidioides* sp. and consequently demonstrate the ability of the protocol using sodium carbonate in pH 11 to obtain membranes rich fractions in this fungus. The fragments of membrane in electron micrograph confirm the enrichment of the extract using this protocol (Figure-1).

Proteome of membrane fraction

The graphic of dynamic range represent the concentration of proteins identified in fraction membrane in its detection range. The most proteins showed a range of similar concentration (Figure-2).

Subcellular localization of proteins contained in the membranes fraction of *Paracoccidioides* sp.

The identified proteins were evaluated regarding to the possible subcellular localization using the WolF PSORT software. This software predicts only proteins of plasma membrane. Therefore, the TMHMM, TermiNator, Myristoylator, PrePS-Prenilation Prediction Suite and Gene Ontology (GO) programs were used for identify proteins belonging the other classes of cell membranes of *Paracoccidioides* sp. The data obtained through of the analyzes by NanoUPLC MS^E, relative to membranes proteins, resulted in the identification of five hundred and eighty proteins (Supplementary Table-1). The *in silico* analyzes revealed that the main subcellular localization of the proteins contained in the membranes fraction was the cytoplasmic region (32, 75%) followed by localization in cell membranes (22, 93%) and nuclear region (22, 24%) (Figure-3). The largest number of cytoplasmic proteins contained in membranes protein extract reflects some characteristic of the membrane proteins as high hydrophobicity and low relative abundance, compared with other proteins, so hindering their study.

***In silico* analyses of the membrane proteins of *Paracoccidioides* sp.: Functional classification and association with cell membranes**

The proteins obtained in membrane fraction of *Paracoccidioides* sp. were submitted to *in silico* analysis in order to determine the possible association with the membranes, presence of signal peptide, functional classification and description of the proteins as belonging the cell membranes of *Paracoccidioides* sp. From the total of proteins identified in number five

hundred and eighty, one hundred thirty-three (22, 93 %) were classified as cell membrane proteins. The functional classification of those proteins identified as predicted of the membranes, revealed that (33, 08%) were involved in transport events and (7, 51%) were related with cell signaling. The search for transmembrane domain revealed that eighty-eight proteins contained at least one transmembrane domain and within this category, thirteen proteins presented signal peptide. The search for post translational modification, revealed sixteen proteins targets for prenylation, myristoylation, palmitoylation and GPI anchor (Table-1).

Graphical representation of the functional classification of the membranes proteins, association with membranes of *Paracoccidioides* sp. and amount of transmembrane domain among integral membrane proteins

The membranes proteins of *Paracoccidioides* sp. were classified in twelve functional classes. The main biological process performed by membranes proteins was cell transporte 33, 08% (forty-four proteins) followed by protein fate (folding, modification, destination), 12, 03 % (sixteen proteins) and energy 12.03% (sixteen proteins), (Supplementary figure-1). The proteins classified as protein of cell membranes were evaluated regarding the forms of association with the cell membranes of *Paracoccidioides* sp. From the total of identified membranes proteins, 65% were classified as integral membrane proteins, 1% was integral membrane and GPI-anchored proteins. Additionally, 8% were prenylated proteins, 2% represented myristoylated proteins, 1% represented myristoylated and palmitoylated proteins and for 23% of the proteins described as belonging the cell membranes of *Paracoccidioides* sp. using the databases described above, it has not been possible to determine the form of association with cell membranes (Supplementary figure-2).

Regarding to transmembrane domains, eighty-eight integral membrane proteins were identified in protein extract of membranes of *Paracoccidioides* sp.. Concerning to this subject, forty- one integral membrane proteins of *Paracoccidioides* sp. showed only a transmembrane domain, followed by two transmembrane domains thirteen proteins, and only one integral membrane proteins showed sixteen transmembrane domains (Supplementary figure-3).

Comparative analysis of the integral membranes proteins identified in the proteome of *Paracoccidioides* sp. with the data described in the genome for this class of proteins.

Previous studies performed by DESJARDINS and colleagues (2011) [20] revealed that *Paracoccidioides* sp. (*Pb* 01) possesses around 9,132 genes and these 1,121 encode for integral membranes proteins; in other words 12.25% of the genome. Analyses of the proteins contained in the membranes fraction of *Paracoccidioides* sp., identified eighty-eight integral membranes proteins, which represented 15.17 % of the data of the proteome. The comparison among the data described in the genome with those obtained in the membranes proteome revealed that from the total of identified integral membranes proteins, 79, 54% (seventy) were described in genome and proteome of *Paracoccidioides* sp. A total of 20, 45% (eighteen) of the integral membranes proteins identified were not annotated in the genome of this fungus (Figure-4).

Discussion

Initially several strategies were employed in order to obtain proteomic data regarding to the constitution of the cell membranes of *Paracoccidioides* sp. The first strategy was based in two-dimensional electrophoresis. However, the data obtained by this technique not accounted the proteomic profile of the cell membranes of *Paracoccidioides* sp. due to the low number of membranes proteins identified. Membrane proteins often are underrepresented in 2-D gel due the low abundance in the cell, thereby preventing their presentation in standard gels, besides of the fact that, integral membrane proteins are poorly soluble in the aqueous media used during the isoelectric focusing[11]. Therefore, gel-free separation approaches, were used this study to obtain data about the proteome of the cell membranes of *Paracoccidioides* sp.

Proteomic approaches based in liquid chromatography coupled to tandem MS (LC-MS/MS) have been described as the tool of choice for identification in large-scale and quantification of proteins. This technique is widely employed for the study of membrane proteins[21]. Three methods of extraction of membrane proteins based in liquid chromatography coupled the mass spectrometry were used in this study. The first methodology employed two-steps of ultracentrifugation as described by FONTAINE and colleague [22], the second methodology used ultracentrifugation and sonication MBEUNKUI e GOSHE, 2011[23] and the

third methodology employed ultracentrifugation and solubilization with sodium carbonate pH 11 VIDAKOVICS et al., 2006 [7]. The data of the membranes proteins extracts obtained using the three methods described above were analyzed by NanoUPLC-MS^E (data not shown). After obtaining the data relative to extracts of membranes, *in silico* analysis in database were performed to determine the method of choice for obtaining membrane proteins of *Paracoccidioides* sp.. The *in silico* analysis were performed by evaluating the localization of proteins obtained in protocols. So, the protocol more efficient was able to obtain the greatest amount of proteins located on cell membranes. After, this stage the method used this study was based in ultracentrifugation and solubilization with sodium carbonate pH 11 [7].

When cells are lysed in an aqueous environment, the cell-limiting membrane and membrane of organelles can fragment and form vesicles that can be separated from the cytosol by partitioning or sedimentation. However, in vesicles formed after the cell lysis cytoplasmic proteins may be entrapped. In this way, to get a true membrane protein extract, steps employing solutions as sodium carbonate are used to remove proteins which do not show a strong association with the membranes [11]. The use of sodium carbonate pH 11 has been described in the literature as a tool to obtain membrane proteins. Analysis of proteoma of membranes of pathogenic and non-pathogenic microorganisms as *Escherichia coli* [8], *Bordetella pertussis* [7] and *Saccharomyces cerevisiae* [24] employing sodium carbonate pH 11 allowed the identification of several membranes proteins.

In the proteoma of the membranes fraction of *Paracoccidioides* sp., using carbonate sodium pH 11, 133 proteins were described as belonging the cell membranes of this fungus. In searching the literature and *in silico* analysis revealed proteins associated with different cell membranes. Proteins involved in the transport of ions through the plasma membrane include the ATPases, these proteins couple the ATP hydrolysis with the extrusion of H+, creating an electrochemical gradient along the plasma membrane, this family includes ATPases of calcium and sodium/potassium. Thereby, ATPases are one of the main transport proteins constituents of the plasma membrane of fungi. An example is the study of the genome of the fungi *Ustilago maydis*, which has genes that codified for ATPases conserved between different species of fungi[25]. These classical plasma membrane proteins as sodium transport ATPase, plasma membrane ATPase and calcium transport ATPase were also identified in membranes fraction of *Paracoccidioides* sp..

Other class of proteins identified in the proteome of membranes of *Paracoccidioides* sp. were the proteins of the Ras superfamily including Small GTPase Rho, Arfp, Ras 1 and Ras 2. The proteins of the Ras superfamily perform various cellular processes such as cell signaling, vesicle traffic and cytoskeletal dynamics[26]. The Rho GTPase prenylated protein in *Saccharomyces cerevisiae* was described as associated with the plasma membrane through of a FBAR domain responsible for mediating the interaction of protein with the phosphoinositides present in surface of the plasma membrane [27]. In proteome of the cell membranes of *Paracoccidioides* sp., ADP ribosylation factors were identified. In *Aspergillus nidulans* the ADP ribosylation factor, myristoylated protein (Arfp) was described as localized in a compartment involved with a secretion system and probably this compartment is the Golgi apparatus [28]. Thus, the presence of these proteins in proteome of the membrane fraction suggests a possible association with the plasma membrane and Golgi apparatus membrane.

Integral membrane proteins as dolichyl phosphate mannose proteins were identified in the present study. These proteins are involved in process of stabilization, folding and cell fate. The O-mannosyltransferase proteins comprise a large family of enzymes that initiate the process of O-mannosylation of proteins in the endoplasmic reticulum [29]. Analysis of the structures of the O-mannosyltransferase protein (Pmt1p) in *S. cerevisiae* revealed the presence of seven transmembrane helices, an carboxyl region facing for lumen of the endoplasmic reticulum and an amine region facing for cytosolic face[30]. The peroxin integral membrane protein was identified in the proteome of membranes of *Paracoccidioides* sp., in *Penicillium chrysogenum* the peroxin protein (Pec14/17p) was described as localized in the peroxisome membrane [31]. Therefore, the presence these proteins in membranes fraction suggests several forms of association with different cell membranes of *Paracoccidioides* sp., as described in literature.

Some proteins identified in fraction membranes as cytochrome b5 reductase, NADH ubiquinone oxidoreductase, cytochrome bc1,did not demonstrate any form of association with cell membranes of *Paracoccidioides* sp. through of the *in silico* analysis. The classical associations of the proteins with cell membranes, occurs via transmembrane domain, post translational modification and electrostatic interactions [11]. Nevertheless, other type of association of the proteins with the membranes can be due to protein-protein interactions with other proteins of membrane. This example of interaction is observed in proteins involved in

the respiratory chain present in inner membrane of the mitochondria[11]. Therefore, the proteins identified in membranes fraction of *Paracoccidioides* sp. above mentioned, may be considered membrane proteins even without the presence of a classic form of association.

The comparative analysis of the predicted membrane proteins present in genome database BROAD with the data present in proteome about integral membrane proteins of *Paracoccidioides* sp. revealed that the majority of the proteins identified in proteome were described in genome. However, a small percentage of integral membrane proteins were only described in proteome. In this way, this information can add data to genome of *Paracoccidioides* sp. about this protein class. In relation to the amount of genes contained in genome of *Paracoccidioides* sp. that encode integral membrane proteins and the data obtained in proteomic about this class protein, lead to the suggestion that not all genes that codified integral membrane proteins are translated into proteins. Additionally, the condition employed in this work does not allow the identification of certain integral membrane proteins, such as those with higher expression in a particular condition of study. Molley and collaborators (2000)[8] also verified this suggestion. The authors, employed sodium carbonate pH 11 in an initial condition and were unable of identifying iron receptors in *Escherichia coli*. When the cells were submitted the deprivation of iron, the receptors were identified, suggesting that the absence these receptors in an initial condition is due the low expression of these proteins and not due a limitation of the technique.

The methodology described here favors the identification of proteins of different cell membranes. In this way, other methodologies such as sucrose gradient, or aqueous two-phase partitioning[13], may be employed for identification of proteins contained in specific cell membranes. To our knowledge, this is the first description of membranes proteins in *Paracoccidioides* spp.

Conclusion

Different experimental methodologies were described in this work in order to determine the protocol for extraction of membranes proteins of *Paracoccidioides* sp.. After this step, the proteins of membranes were obtained and identified. From the total of proteins identified in membranes fraction, one hundred thirty-three were considered as membranes proteins. The methodology described here, allowed the identification of proteins involved in

different cellular processes, and several forms of association of the proteins with the cell membranes of *Paracoccidioides* sp. were verified. Therefore, the data obtained in this study allow adding more information in proteomics for this fungus and also add data regarding the proteins in this important pathogen.

Figures and Table

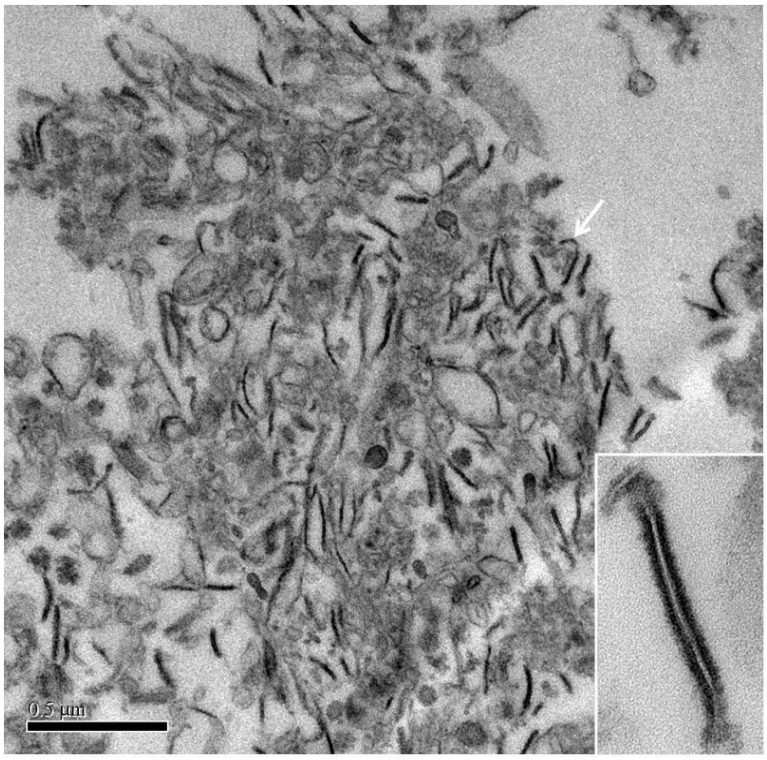


Figure 1- Transmission Electron Microscopy (TEM) representative of enriched fractions of membranes of *Paracoccidioides* sp.. Fragments of membranes are indicates by the white arrow. In detail, fragment of membrane, evidencing the lipid bilayer (400 thousand fold). Magnitude bar (0.5 µm = 50 thousand fold).

A

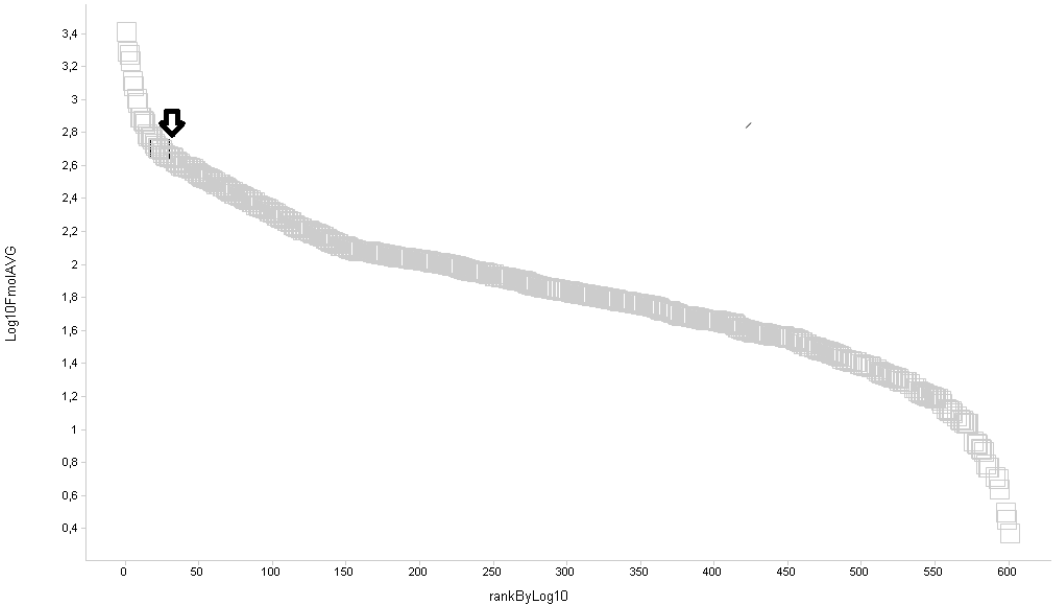


Figure 2- Detection of dynamic range of the experiment. The programs FBAT, Mas Pivot and SPORT FIRE were used by construction of the graphic. (**A**) square gray represent the proteins identified in membranes fraction indicating the concentration of protein in the experiment, many proteins remained in the same concentration range the square black shows external standard, rabbit phosphorylase B.

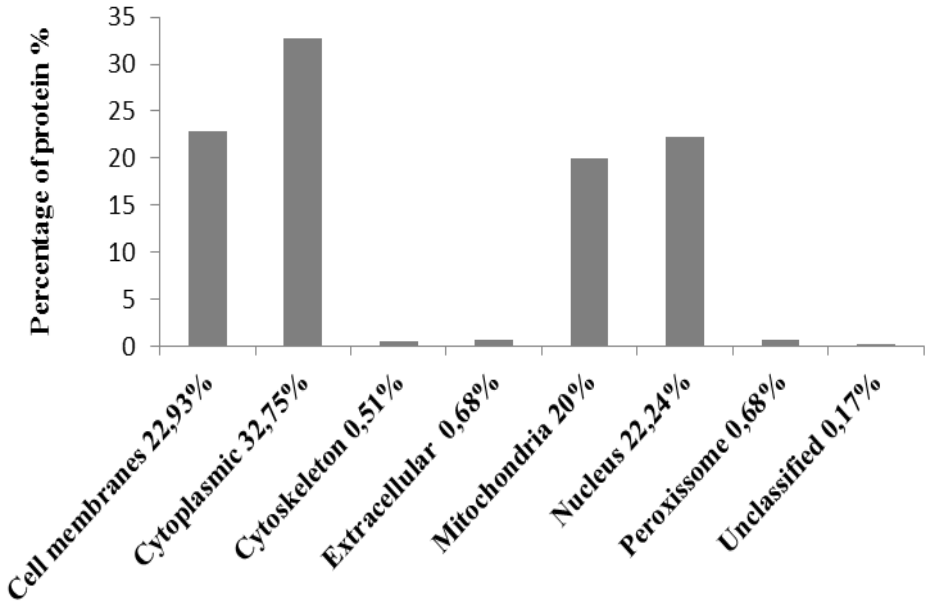


Figure 3 - Subcellular localization of proteins contained in membranes fraction of *Paracoccidioides* sp. The program Wolf PSORT and Gene ontology specifically the cellular component were used for *in silico* analyzes of the subcellular localization of the proteins. The presence of transmembrane domain and post translational modification were also evaluated in order determine localization of the proteins at the cell membranes of *Paracoccidioides* sp. The main subcellular localization of proteins contained in membranes fraction of *Paracoccidioides* sp. was the cytoplasmic region (32, 75%) followed by membrane region (22, 93%) and nuclear region (22, 24%).

Table 1- Functional classification and association of the proteins with cell membranes of *Paracoccidioides* sp.

Accession number [a]	Protein identification [b]	Score identification[c]	Coverage sequence% [d]	TMH [e]	PTM [f]	SignalP score ≥ 0.45 [g]
CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTES						
PAAG_02679	Vacuolar ATP synthase 98 kDa subunit	791,51755	18,15	7	*	*
PAAG_05329	Sodium transport ATPase	1072,34947	17,31	7	*	*
PAAG_07077	Calcium transporting ATPase	746,5261	14,61	9	*	*
PAAG_08082	Plasma membrane ATPase	27274,75	43,02	9	*	*
PAAG_04328	Endosomal cargo receptor Erp3	2983,61	26,78	2	*	0.912
PAAG_07328	Transport protein SEC61 subunit alpha	1217,93657	10,99	10	*	*
PAAG_03418	Mitochondrial precursor proteins import receptor	666,5225	11,27	1	*	*
PAAG_08620	ADP ATP carrier protein	28165	43,58	3	*	*
PAAG_01750	Signal sequence binding protein	426,2755	11,16	2	*	0.745
PAAG_00481	Membrane biogenesis protein Yop	11930,616	23,33	3	*	*
PAAG_00804	Endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment protein	1156,702	14,02	2	*	*
PAAG_07712	Surfeit locus protein	3032,651	15,95	7	*	*
PAAG_09048	Integral membrane protein sed5	2725,17467	19,04	1	*	*
PAAG_05443	Endoplasmic reticulum transmembrane protein	1993,7245	8,92	3	*	*
PAAG_03452	Carnitine acyl carnitine carrier	1279,529	30,89	2	*	*
PAAG_05828	Cation transporting ATPase	511,0087	15,88	3	*	*

Table 1- (Continued)

Accession number [a]	Protein identification [b]	Score identification[c]	Coverage sequence% [d]	TMH [e]	PTM [f]	SignalP score ≥ 0.45 [g]
CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTES						
PAAG_04529	Synaptobrevin	7249,744	18,97	1	*	*
PAAG_01210	Multidrug resistance protein fnx1	1,2164	0	3	*	*
PAAG_03472	Endomembrane protein EMP70	691,4818	10,51	9	*	0.859
PAAG_00929	Translocon protein Sec61beta	1063,598	19,17	1	*	*
PAAG_08469	Inorganic phosphate transporter	3271,07233	46,6	1	*	*
PAAG_06233	Vesicular fusion protein SEC17 293 aa	3253,58533	48,4	*	*	*
PAAG_05244	Mitochondrial import receptor subunit tom	1557,891	17,75	1	*	*
PAAG_04719	Oligosaccharyl transferase	748,855	7,585	13	*	*
PAAG_08029	Peroxisomal membrane protein PMP34	789,0512	10,09	5	*	*
PAAG_03162	Phosphoinositide phosphatase Sac1	555,73325	12,39	2	*	*
PAAG_04605	Transport protein sec22	432,3518	3,74	1	*	*
PAAG_01588	SNARE Ykt6	3530,632	26,4	*	C:15	*
PAAG_08093	GTP binding protein ypt3	7981,649	40,15	*	C:20	*
PAAG_07175	GTPase	4024,582	31,97	*	C:20	*
PAAG_07702	ADP ribosylation factor 184 aa	4599,55467	41,89	*	C:14	*
PAAG_03988	ADP ribosylation factor 187 aa	8,0265	3,23	*	C:14	*

Table 1- (continued)

Accession number [a]	Protein identification [b]	Score identification[c]	Coverage sequence% [d]	TMH [e]	PTM [f]	SignalP score ≥ 0.45 [g]
CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTES						
PAAG_06288	Vacuolar ATP synthase subunit B 507 aa	1458,79037	22,99	*	*	*
PAAG_07564	Outer mitochondrial membrane protein porin 285 aa	17746,9967	44,6	*	*	*
PAAG_05350	Mitochondrial phosphate carrier protein 422 aa	5905,831	30,4	*	*	*
PAAG_00639	Phosphate carrier protein 385 aa	2628,99033	25,69	*	*	*
PAAG_02625	Vesicle transport v SNARE protein vti1 209 aa	3110,546	40,38	*	*	*
PAAG_05107	AAA ATPase 921 aa	798,270133	18,22	*	*	*
PAAG_01345	Importin 8 1032 aa	617,5947	17,56	*	*	*
PAAG_08010	Mitochondrial carrier protein 311 aa	1513,36	19,03	*	*	*
PAAG_02824	Mitochondrial inner membrane translocase subunit TIM44 534 aa	754,41445	12,66	*	*	*
PAAG_03644	Mitochondrial import receptor subunit tom 40 356 aa	1032,59	18,31	*	*	*
PAAG_06563	Succinate fumarate mitochondrial transporter 328 aa	1233,059	28,44	*	*	*
PAAG_00105	Zinc transporter	417,6914	14,99	5	*	*
PROTEIN SYNTHESIS						
PAAG_01425	Eukaryotic translation initiation factor	725,7039	9,64	2	*	*
PAAG_06701	PCI domain containing protein	813,5891	5,74	1	*	0.790

Table 1- (continued)

Accession number [a]	Protein identification [b]	Score identification[c]	Coverage sequence% [d]	TMH [e]	PTM [f]	SignalP score ≥ 0.45 [g]
CELLULAR COMMUNICATION/SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM						
PAAG_04025	Osmosensor protein	1038,412	17,33	2	*	*
PAAG_01500	GTP binding protein SAS1	5798,67967	48,7	*	C:20	*
PAAG_02458	GTP binding protein ypt7	7513,77367	40,49	*	C:20	*
PAAG_08028	GTP binding protein ypt1	25168,0233	48,92	*	C:20	*
PAAG_07634	Small GTPase RhoA	14577,4633	43,8	*	C:20	*
PAAG_02351	Ras 1	5134,3345	37,5	*	C:15	*
PAAG_03900	GTP binding protein YPT52	3019,756	27,11	*	C:20	*
PAAG_08518	Ras 2	897,6986	20,59	*	C:20	*
PAAG_00542	Guanine nucleotide binding protein alpha 3	690,6583	20,55	*	C:14/C:16	*
PAAG_06815	Tricalbin	532,8388	14,06	2	*	*
CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE						
PAAG_01262	Hsp70 like protein 629 aa	7441,568	49,04	1	*	0.864
PAAG_00797	Mitochondrial protein import protein MAS5	4262,84033	30,16	*	C:15	*
PAAG_03292	Cytochrome c peroxidase 375 aa	16076,5867	52,14	*	*	*
PAAG_01791	Conserved hypothetical protein 627 aa	693,2148	25,24	1	*	*

Table 1- (continued)

Accession number [a]	Protein identification [b]	Score identification[c]	Coverage sequence% [d]	TMH [e]	PTM [f]	SignalP score ≥ 0.45 [g]
BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS						
PAAG_08209	Peroxin	14078,9467	35,71	1	*	*
PAAG_03489	Cell lysis protein cwl1	2231,21513	9,15	4	*	*
PAAG_07503	Acyl sn glycerol 3 phosphate acyltransferase beta	1204,6494	20,13	2	*	*
PAAG_03391	Chitin synthase	717,8049	15,3	6	*	*
PAAG_07457	Mitochondrial genome maintenance protein Mgr2	731,8563	18,58	2	*	*
PAAG_00622	Mitochondria fission 1 protein	971,2325	24,51	1	*	*
PAAG_01929	HNRNP arginine N methyltransferase 308 aa	547,1126	14,01	*	*	*
PAAG_00672	MRS7 family protein	499,9489	26,73	1	*	*
ENERGY						
PAAG_00953	NADH cytochrome b5 reductase 334 aa	2459,3725	25,37	*	*	*
PAAG_08966	NADH ubiquinone oxidoreductase 78 kDa subunit 729 aa	1246,33847	27,06	*	*	*
PAAG_04838	ATP synthase subunit 4 245 aa	13824,061	32,51	*	*	*
PAAG_04570	ATP synthase D chain mitochondrial 175 aa	3393,791	44,63	*	*	*
PAAG_06796	Cytochrome c oxidase polypeptide IV	2068,627	20,13	*	*	*
PAAG_01044	NADH ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit 260 aa	852,6889	22,39	*	*	*
PAAG_05031	NADH ubiquinone oxidoreductase 40 kDa subunit 294 aa	3032,05	35,03	*	*	*

Table 1- (continued)

Accession number [a]	Protein identification [b]	Score identification[c]	Coverage sequence% [d]	TMH [e]	PTM [f]	SignalP score ≥ 0.45 [g]
ENERGY						
PAAG_02266	NADH ubiquinone oxidoreductase 21 kDa subunit 226 aa	1014,265	20,89	*	*	*
PAAG_02656	NADH ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit 516 aa	1154,8971	22,52	*	*	*
PAAG_08088	Cytochrome b c1 complex subunit 2 464 aa	5059,41467	34,19	*	*	*
PAAG_02265	Mitochondrial F1F0 ATP synthase subunit	14358,8533	41,58	1	*	*
PAAG_06093	Cytochrome c1	2554,54233	33,85	1	*	*
PAAG_01265	Cytochrome b5	4814,31066	44,93	1	*	*
PAAG_08352	NADH-ubiquinone oxidoreductase 14kD subunit	3844,859	42,86	1	*	*
PAAG_03160	Formation of crista junctions protein	1367,604	12,7	1	*	*
PAAG_08315	NADH:ubiquinone oxidoreductase 20.1kD subunit	1060,693	18,71	1	*	*
PROTEIN FATE (folding, modification, destination)						
PAAG_07235	SNARE domain containing protein 252 aa	724,6943	20,12	*	*	*
PAAG_04458	Prohibitin 1 281 aa	14155,16	43,69	*	*	*
PAAG_02085	Signal sequence processing protein SEC11 198 aa	819,9139	15,23	*	*	*
PAAG_01390	Endoplasmic reticulum protein	608,8935	15,29	1	*	0.658
PAAG_08431	Dolichyl phosphate mannose protein mannosyltransferase	479,6459	14,23	9	*	*

Table 1- (continued)

Accession number [a]	Protein identification [b]	Score identification[c]	Coverage sequence% [d]	TMH [e]	PTM [f]	SignalP score ≥ 0.45 [g]
PROTEIN FATE (folding, modification, destination)						
PAAG_07037	Calnexin	710,96	23,33	1	*	0.826
PAAG_06464	Disulfide-isomerase A6	546,06765	10,8	1	*	0.851
PAAG_05910	Dolichyl phosphate mannose protein mannosyltransferase 917 aa	1059,8422	7,535	8	*	*
PAAG_04725	Dolichyl phosphate mannose protein mannosyltransferase 783 aa	506,2559	5,75	10	*	*
PAAG_04110	Dolichyl di phosphooligosaccharide protein glycotransferase	1612,26367	17,52	1	*	0.949
PAAG_07238	Alpha 1 2 mannosyltransferase KTR1	1050,5451	23,48	1	*	0.732
PAAG_00744	CAAX prenyl protease	1097,6945	6,03	4	*	*
PAAG_00852	Proteasome component C1	559,784	24,21	1	*	*
PAAG_05468	Translocation protein sec63	571,0369	11,85	3	*	*
PAAG_03464	Bleomycin hydrolase	749,9655	24,08	*	C:14	*
PAAG_08733	E3 ubiquitin protein ligase MARCH6	1,2164	0	16	*	*
METABOLISM						
PAAG_04054	Ubiquitin protein ligase molybdopterin converting factor 654 aa	947,333933	17,66	*	*	*
PAAG_09072	Mitochondrial nuclease	7582,71767	27,66	1	*	*

Table 1 - (continued)

Accession number [a]	Protein identification [b]	Score identification[c]	Coverage sequence% [d]	TMH [e]	PTM [f]	SignalP score ≥ 0.45 [g]
METABOLISM						
PAAG_06403	ATP binding cassette sub family G member	511,0931	8,45	8	*	0.455
PAAG_04109	NADH ubiquinone oxidoreductase	4248,134	47,37	1	*	*
PAAG_08517	Propionate CoA ligase	865,5263	9,295	1	*	*
PAAG_00116	Pyrroline 5 carboxylate reductase	477,0858	7,74	1	*	*
PAAG_08773	Squalene monooxygenase	687,71585	9,855	1	*	*
PAAG_00346	Triacylglycerol lipase	33,1402	0,67	1	*	*
CELL TYPE DIFFERENTIATION						
PAAG_07669	Mannan polymerase II complex ANP1 subunit 461 aa	540,5182	12,61	*	*	*
PAAG_07055	RGS domain protein (Rax1)	858,6917	11,2	4	*	*
PAAG_02314	DUF221 family protein	536,0427	3,64	10	*	*
CELL FATE						
PAAG_01193	DUF21 and CBS domain protein Mam3	608,4763	13,85	3	*	*
PAAG_02100	Glycolipid anchored surface protein	433,6463	13,45	2	GPI	*
CELL CYCLE AND DNA PROCESSING						
PAAG_01041	Prohibitin 2	5687,038	44,83	1	*	*

Table 1- (continued)

Accession number [a]	Protein identification [b]	Score identification[c]	Coverage sequence% [d]	TMH [e]	PTM [f]	SignalP score ≥ 0.45 [g]
CELL CYCLE AND DNA PROCESSING						
PAAG_08435	Cell division control protein	1166,532	6,36	1	*	*
UNCLASSIFIED PROTEINS						
PAAG_04911	Conserved hypothetical protein 300 a	954,1459	7,36	4	*	*
PAAG_05911	Conserved hypothetical protein 147 aa	4753,05047	25,11	1	*	*
PAAG_05510	Integral membrane protein	1998,4395	14,96	3	*	*
PAAG_04157	DUF1620 domain-containing protein	427,437	7,35	1	*	0.863
PAAG_07960	DDHD domain-containing protein	5972,249	16,56	4	*	*
PAAG_01890	Conserved hypothetical protein 190 aa	1876,07133	25,04	2	*	*
PAAG_05112	Conserved hypothetical protein 194 aa	661,5374	7,25	4	*	*
PAAG_01111	Conserved hypothetical protein 224 aa	1830,012	5,38	1	*	*
PAAG_00184	Endoplasmic reticulum protein	1113,9277	21,145	4	*	*
PAAG_05132	Conserved hypothetical protein 321 aa	454,613	16,56	7	*	*
PAAG_04131	Conserved hypothetical protein 374 aa	589,5588	25,74	1	*	*
PAAG_05875	Hypothetical protein 115 aa	2749,16	13,16	1	*	*
PAAG_05231	Hypothetical protein 73 aa	1501,416	30,56	1	*	*
PAAG_07570	MSP domain-containing protein	641,0787	20,16	1	*	*

Table 1- (continued)

Accession number [a]	Protein identification [b]	Score identification[c]	Coverage sequence% [d]	TMH [e]	PTM [f]	SignalP score ≥ 0.45 [g]
UNCLASSIFIED PROTEINS						
PAAG_01828	Peptidase family M28 family	0,6048	0	9	*	*
PAAG_03072	Predicted protein	479,1339	17,7	2	*	*
PAAG_06654	Signal sequence receptor alpha chain	2035,28	13,685	1	*	0.769
PAAG_06541	Erythrocyte band 7 integral membrane protein 361 aa	3142,19067	34,72	*	*	*

[a,b)] Number Accession and description of the protein according with database of *Paracoccidioides* spp. BROAD. (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).

[c)] Indicates when to match in % corresponds the sequence coverage of peptides.

[d)] Represents the peptides found by (MSMS)-number of peptides that match the masses of proteins.

[e)] Represents the amount of transmembrane domains identified in proteins using the program TMHMM version 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/).

[f)]Indicates the presence of post translational modification. The program TermiNator (http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator3/test.php) and Myristoylator (http://web.expasy.org/myristoylator/) were employed in the search by myristoylated proteins. To search by palmitoylated proteins the program TermiNator was used (http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator3/test.php). For prenylated proteins the program used was the PrePS-Prenylation Prediction Suite (http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/index.html). The prediction for GPI anchor was performed with program big-Pi fungi predictor (http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html). C:14 and C:16 indicates the presence a myristoyl or palmitoyl group on the protein respectively. C:15 indicates the presence of a recognition site to added a group farnesyl by enzyme FT- Farnesyltransferase and C:20 indicates the presence of a recognition site to added a group geranyl by enzyme GGT1- Geranylgeranyltransferase or a site recognition for to added a group geranyl by enzyme GGT2 - Rab Geranylgeranyltransferase. GPI represents the presence of a GPI anchor in protein.

[g)] The program SignalP version 4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) was employed in the search for signal peptide. The values demonstrate the score protein with signal peptide. The D-Score must be greater or equal the value of (0.05). In all cases the symbol (*) represent absent in the analyzed category.

The functional classification was performed used the database of FunCat2. (http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_brasi_Pb01). The database Gene Ontology (GO) using the information relative to cellular component was employed to evaluate the possible localization of proteins in cell membranes of *Paracoccidioides* sp.. Some proteins did not show any form of classical association with the lipid bilayer, but showed a cellular components in GO as belonging to regions of membranes, with score ≥ 50.

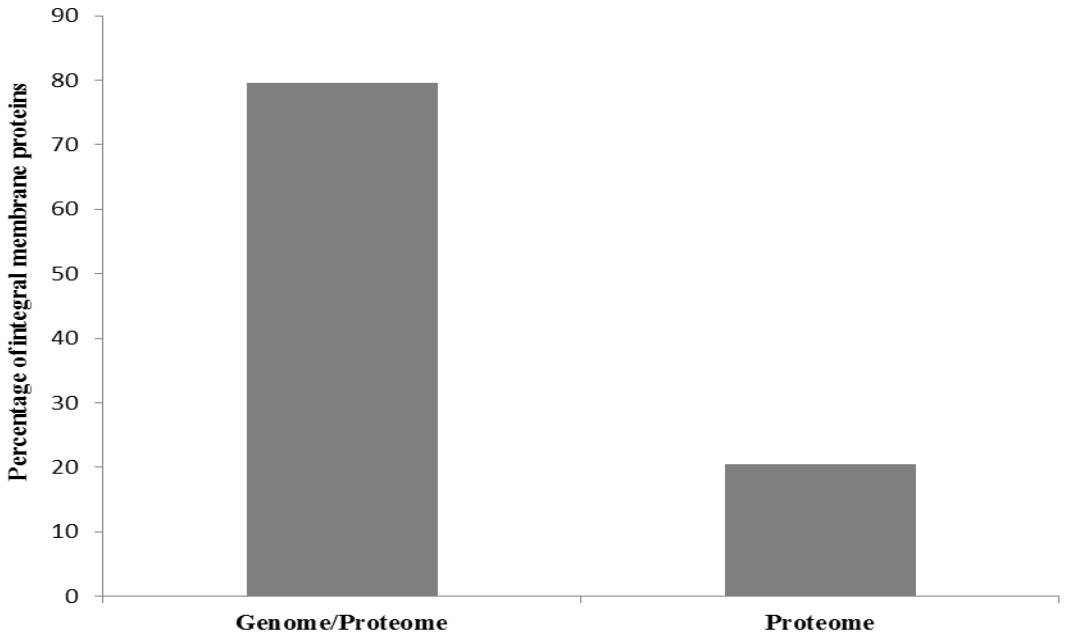


Figure 4- Comparison between proteome of the deduced membrane proteins of *Paracoccidioides* sp. The list of genes that encode integral membrane proteins provided by Christina Cuomo (Broad Institute) was compared with the information about eighty-eight integral membrane proteins identified this study. The information genome/proteome means the presence of the integral membranes proteins in both studies. The information proteome means the presence the protein only this study.

Supplementary table 1- Functional classification and association of the proteins identified in membranes fraction.

Accession number [a]	Protein identification [b]	Score identification[c]	Coverage sequence%[d]	TMH [e]	PTM [f]	SignalP score ≥ 0.45 [g]
CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTES						
PAAG_06751	DNA damage checkpoint protein rad24	3192,092	45,91	*	*	*
PAAG_05224	Hypothetical protein 282 aa	2371,155	17,08	*	*	*
PAAG_07564	Outer mitochondrial membrane protein porin	17746,9966	44,6	*	*	*
PAAG_02679	Vacuolar ATP synthase 98 kDa subunit 841 aa	791,5175	18,155	7	*	*
PAAG_05329	Sodium transport ATPase	1072,3494	17,31	7	*	*
PAAG_07077	Calcium transporting ATPase	746,5261	14,615	9	*	*
PAAG_08082	Plasma membrane ATPase	27274,75	43,02	9	*	*
PAAG_06288	Vacuolar ATP synthase subunit B 507 aa	1458,7903	22,99	*	*	*
PAAG_00639	Phosphate carrier protein 385 aa	2628,9903	25,69	*	*	*
PAAG_05350	Mitochondrial phosphate carrier protein 422 aa	5905,831	30,4	*	*	*
PAAG_05107	AAA ATPase 921 aa	798,2701	18,22	*	*	*
PAAG_026	Vesicle transport v SNARE protein vti1	3110,546	40,38	*	*	*
PAAG_04328	Endosomal cargo receptor Erp3	2983,61	26,78	2	*	0.912
PAAG_00782	Small COPII coat GTPase sar1 190	6270,3743	45,67	*	*	*
PAAG_07702	ADP ribosylation factor 184 aa	4599,5546	41,89	*	C:14	*
PAAG_07328	Transport protein SEC61 subunit alpha	1217,9365	10,99	10	*	*

PAAG_04276	Vesicular fusion protein SEC17	3253,5853	48,4	*	*	*
PAAG_03418	Mitochondrial precursor proteins import receptor	666,5225	11,27	1	*	*
PAAG_08620	ADP ATP carrier protein	28165	43,58	3	*	*
PAAG_01750	Signal sequence binding protein 1497 aa	426,2755	11,16	2	*	0.745
PAAG_00481	Membrane biogenesis protein Yop1	11930,616	23,33	3	*	*
PAAG_00804	Endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment protein 436	1156,702	14,02	2	*	*
PAAG_07712	Surfeit locus protein	3032,651	15,95	7	*	*
PAAG_01588	SNARE Ykt6 227 aa	3530,632	26,4	*	C:15	*
PAAG_09048	Integral membrane protein sed5	2725,1746	19,04	1	*	*
PAAG_06344	Rab GDP dissociation inhibitor 469 aa	1134,791	27,56	*	*	*
PAAG_07958	Fimbrin 646 aa	945,1015	20,2	*	*	*
PAAG_07734	Adenylyl cyclase associated protein 531 aa	1864,9233	14,71	*	*	*
PAAG_08093	GTP binding protein ypt3 221 aa	7981,649	40,15	*	C:20	*
PAAG_07175	GTPase	4024,582	31,97	*	C:20	*
PAAG_05443	Endoplasmic reticulum 25 kDa transmembrane protein	1993,7245	8,92	3	*	*
PAAG_03988	ADP ribosylation factor 187 aa	8,0265	3,23	*	C:14	*
PAAG_03452	Carnitine acyl carnitine carrier	1279,529	30,89	2	*	*
PAAG_05828	Cation transporting ATPase 1317 aa	511,0087	15,88	3	*	*
PAAG_04529	Synaptobrevin	7249,744	18,97	1	*	*
PAAG_01210	Multidrug resistance protein fnx1	1,2164	0	3	*	*
PAAG_02905	Conserved hypothetical protein 504 aa	652,466	8,75	*	*	*

PAAG_05680	RRM domain-containing protein	545,6037	18,66	*	*	*
PAAG_03472	Endomembrane protein EMP70	691,4818	10,51	9	*	0.859
PAAG_00929	Hypothetical protein 121 aa	1063,598	19,17	1	*	*
PAAG_01345	Importin 8 1032 aa	617,5947	17,56	*	*	*
PAAG_08469	Inorganic phosphate transporter	3271,0723	46,6	1	*	*
PAAG_08010	Mitochondrial carrier protein 311 aa	1513,3628	19,03	*	*	*
PAAG_05244	Mitochondrial import receptor subunit tom 20	1557,891	17,75	1	*	*
PAAG_03644	Mitochondrial import receptor subunit tom 40	1032,59	18,31	*	*	*
PAAG_02824	Mitochondrial inner membrane translocase subunit TIM44 534 aa	754,41445	12,66	*	*	*
PAAG_00109	Mitochondrial intermembrane space translocase subunit Tim 108 aa	1136,12	43,93	*	*	*
PAAG_07791	NADH ubiquinone oxidoreductase 212 aa	2232,247	23,22	*	*	*
PAAG_05960	NIPSNAP family protein 410 aa	480,8903	22,74	*	*	*
PAAG_04719	Oligosaccharyl transferase subunit 739 aa	748,855	7,585	13	*	*
PAAG_01716	Peroxisomal biogenesis factor 6 1451 aa	67,7153	0,34	*	*	*
PAAG_08029	Peroxisomal membrane protein PMP34	789,0512	10,09	5	*	*
PAAG_03162	Phosphoinositide phosphatase Sac1	555,73325	12,39	2	*	*
PAAG_06563	Succinate fumarate mitochondrial transporter 328 aa	1233,059	28,44	*	*	*
PAAG_04605	Transport protein sec22	432,3518	3,74	1	*	*
PAAG_07285	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A 727 aa	874,2319	10,33	*	*	*
PAAG_07866	Vacuolar protein sorting associated protein 354 aa	965,6238	30,88	*	*	*
PAAG_03573	Vacuolar protein sorting associated protein 594 aa	574,9968	23,61	*	*	*

PAAG_07133	Vesicular fusion protein SEC18	545,6563	12,23	*	*	*
PAAG_00105	Zinc transporter SLC39A9 408 aa	417,6914	14,99	5	*	*
PAAG_06233	Vesicular fusion protein SEC17	3253,585333	48,4	*	*	*
PAAG_05497	Vacuolar ATP synthase subunit d 364 aa	911,8522	19,83	*	*	*
PROTEIN SYNTHESIS						
PAAG_00689	ATP dependent RNA helicase eIF4A	13888,35	49,58	*	*	*
PAAG_09096	Hypothetical protein 70 aa	17787,2166	41,54	*	*	*
PAAG_03816	40S ribosomal protein S4 263 aa	12744,61	51,27	*	*	*
PAAG_01939	60S ribosomal protein L27 A 136 aa	18212,6933	51,85	*	*	*
PAAG_03513	40S ribosomal protein S18 156 aa	23189,2166	51,39	*	*	*
PAAG_02111	40S ribosomal protein S0 296 aa	2592,6025	25,87	*	*	*
PAAG_06320	60S ribosomal protein L13 218 aa	24832,5966	44,7	*	*	*
PAAG_00264	40S ribosomal protein S8 B 203 aa	4805,0338	40,43	*	*	*
PAAG_00765	60S ribosomal protein L36	11981,475	46,6	*	*	*
PAAG_00969	60S ribosomal protein L15 204 aa	1082,234	40,56	*	*	*
PAAG_06569	60S ribosomal protein L43 93 aa	5344,552	52,17	*	*	*
PAAG_08888	60S ribosomal protein L4 A 373 aa	20772,5266	49,46	*	*	*
PAAG_00724	Ribosomal protein 11 large subunit 176 aa	18825,27	34,47	*	*	*
PAAG_00088	60S ribosomal protein L3 393 aa	3409,2816	33,5	*	*	*
PAAG_05379	60S ribosomal protein L17 185 aa	5113,051	25	*	*	*
PAAG_08497	60S ribosomal protein L19 192 aa	13699,7833	38,04	*	*	*

PAAG_09043	40S ribosomal protein S2 261 aa	10855,034	47,05	*	*	*
PAAG_02394	37S ribosomal protein S5 411 aa	436,7075	11,22	*	*	*
PAAG_08955	40S ribosomal protein S3aE 256 aa	14486,05	54,11	*	*	*
PAAG_05590	60S ribosomal protein L12 166 aa	16621,9033	42,22	*	*	*
PAAG_05337	40S ribosomal protein S22 131 aa	12141,1446	53,59	*	*	*
PAAG_00385	40S ribosomal protein S23 146 aa	3719,7945	43,44	*	*	*
PAAG_08847	60S ribosomal protein L28 150 aa	1065,8673	13,64	*	*	*
PAAG_06367	30S ribosomal protein S17P 162 aa	21821,3466	54,65	*	*	*
PAAG_05484	40S ribosomal protein S5 215 aa	9307,9596	47,03	*	*	*
PAAG_01435	40S ribosomal protein S16 144 aa	19042,2733	61,3	*	*	*
PAAG_04690	40S ribosomal protein S15 154 aa	26836,95	46,84	*	*	*
PAAG_07955	60S ribosomal protein L18 190 aa	14746,837	32,8	*	*	*
PAAG_01433	40S ribosomal protein S14 152 aa	10376,395	56,73	*	*	*
PAAG_06882	40S ribosomal protein S24 135 aa	7796,98	33,33	*	*	*
PAAG_06743	Ribosomal protein L23e 141 aa	4693,5456	54,76	*	*	*
PAAG_02634	Ribosomal protein S6 238 aa	3820,773	24,51	*	*	*
PAAG_01834	60S ribosomal protein L16 203 aa	2315,6485	26,98	*	*	*
PAAG_00430	60S ribosomal protein L2 255 aa	8289,2076	39,89	*	*	*
PAAG_04998	60S ribosomal protein L8 B 262 aa	16780,1233	37,67	*	*	*
PAAG_00347	60S ribosomal protein L9 B 193 aa	2904,832	38,89	*	*	*
PAAG_03322	40S ribosomal protein S20 117 aa	9793,53	30,74	*	*	*

PAAG_04965	60S ribosomal protein L31 124 aa	12321,1766	44,98	*	*	*
PAAG_05017	40S ribosomal protein S10 A 166 aa	7893,2276	34,54	*	*	*
PAAG_05704	40S ribosomal protein S13 1 152 aa	15139,276	46,58	*	*	*
PAAG_05778	40S ribosomal protein S19 147 aa	20574,9	40,64	*	*	*
PAAG_07182	40S ribosomal protein S7 202 aa	17031,93	39,8	*	*	*
PAAG_07385	60S ribosomal protein L23a 154 aa	17913,7533	39,65	*	*	*
PAAG_07841	60S acidic ribosomal protein P1	13992,66	31,23	*	*	*
PAAG_07847	40S ribosomal protein S26 122 aa	15844,64	26,17	*	*	*
PAAG_04425	60S ribosomal protein L22 123 aa	10561,6733	42,89	*	*	*
PAAG_00548	60S ribosomal protein L5 300 aa	10488,1493	32,33	*	*	*
PAAG_01413	40S ribosomal protein S17 143 aa	8833,323	42,25	*	*	*
PAAG_03664	Ribosomal L28 protein	1151,4313	21,75	*	*	*
PAAG_03827	60S ribosomal protein L21 A 161 aa	16095,7733	52,5	*	*	*
PAAG_00952	60S ribosomal protein L20 175 aa	16359,6566	33,71	*	*	*
PAAG_01785	40S ribosomal protein S3 271 aa	22863,9933	59,38	*	*	*
PAAG_08817	Translation initiation factor 2 subunit beta 284 aa	615,299	14,84	*	*	*
PAAG_00594	Elongation factor 2 832 aa	12986,1366	56,23	*	*	*
PAAG_02921	Elongation factor Tu 442 aa	1836,782	32,27	*	*	*
PAAG_07381	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 475 aa	1481,475	27,22	*	*	*
PAAG_00376	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F 352 aa	4347,937	15,95	*	*	*
PAAG_01330	Eukaryotic translation initiation factor 3 RNA binding subunit 2	1156,556	20,83	*	*	*

PAAG_01777	Alanyl tRNA synthetase 963 aa	2095,7183	22,8	*	*	*
PAAG_02024	Elongation factor 1 alpha 461 aa	49541,14	48,19	*	*	*
PAAG_03556	Elongation factor 1 gamma 1 408 aa	2902,8356	22,52	*	*	*
PAAG_06489	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8 864 aa	833,3361	16,51	*	*	*
PAAG_01425	Eukaryotic translation initiation factor 3 478 aa	725,7039	9,64	2	*	*
PAAG_01050	Cytosolic large ribosomal subunit protein L30 110 aa	12563,9273	49,54	*	*	*
PAAG_05015	Leucyl tRNA synthetase 1119 aa	440,3124	19,68	*	*	*
PAAG_03828	40S ribosomal protein S9 192 aa	8600,9943	45,72	*	*	*
PAAG_01052	60S ribosomal protein L10 B 224 aa	8152,1156	44,1	*	*	*
PAAG_08634	40S ribosomal protein S12 152 aa	2584,765	13,91	*	*	*
PAAG_01436	54S ribosomal protein L23 179 aa	484,5053	8,99	*	*	*
PAAG_07707	60S ribosomal protein L10a 230 aa	1994,469	24,98	*	*	*
PAAG_05233	60S ribosomal protein L26 135 aa	4538,587	30,97	*	*	*
PAAG_06627	60S ribosomal protein L32 132 aa	13007,6656	28,49	*	*	*
PAAG_00648	60S ribosomal protein L33 B 110 aa	4282,2145	27,98	*	*	*
PAAG_06792	60S ribosomal protein L34 B 121 aa	7187,788	22,5	*	*	*
PAAG_07550	60S ribosomal protein L44 107 aa	499,9373	7,55	*	*	*
PAAG_03019	60S ribosomal protein L6 B 205 aa	1778,2423	26,3	*	*	*
PAAG_03780	ATP dependent RNA helicase DBP5 505 aa	529,0863	17,85	*	*	*
PAAG_02552	Conserved hypothetical protein 421 aa	642,0301	9,52	*	*	*
PAAG_02582	Elongation factor 2 1023 aa	33,1402	0,39	*	*	*

PAAG_00747	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma 521 aa	878,9116	24,42	*	*	*
PAAG_08348	Eukaryotic translation initiation factor 3 39 kDa subunit 341 aa	577,11925	23,675	*	*	*
PAAG_00302	Exportin 1 1068 aa	482,0931	11,62	*	*	*
PAAG_00205	Hypothetical protein 161 aa	4407,652	22,29	*	*	*
PAAG_00206	Hypothetical protein 63 aa	8359,267	29,03	*	*	*
PAAG_01786	Phenylalanyl tRNA synthetase beta chain 601 aa	901,8291	9,89	*	*	*
PAAG_00244	Polyadenylate binding protein 823 aa	669,2831	13,565	*	*	*
PAAG_02889	Ribosomal protein L35 126 aa	10969,99	39,46	*	*	*
PAAG_06945	Ribosome biogenesis protein RLP24 192 aa	487,9297	12,04	*	*	*
PAAG_08702	Seryl tRNA synthetase 489 aa	712,1422	21,72	*	*	*
PAAG_05882	Translation factor SUI1 90 aa	2545,766	22,47	*	*	*
PAAG_00234	Translation initiation factor IF 2 1068 aa	471,0718	15,28	*	*	*
PAAG_00238	Ubiquitin 219 aa	6713,367	33,03	*	*	*
CELLULAR COMMUNICATION, SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM						
PAAG_01500	GTP binding protein SAS1 207 aa	5798,6796	48,7	*	C:20	*
PAAG_06996	G protein comlpex beta subunit CpcB 317 aa	3241,0136	51,16	*	*	*
PAAG_00773	DNA damage checkpoint protein rad24 293 aa	1744,8313	30,7	*	*	*
PAAG_02458	GTP binding protein ypt7 206 aa	7513,7736	40,49	*	C:20	*
PAAG_08028	GTP binding protein ypt1 202 aa	25168,0233	48,92	*	C:20	*
PAAG_02820	GTP dependent nucleic acid binding protein engD 413 aa	616,9049	13,11	*	*	*
PAAG_06948	Mitogen activated protein kinase MKC1 432 aa	1226,755	27,15	*	*	*

PAAG_08247	Calmodulin 150 aa	1517,4153	41,16	*	*	*
PAAG_03649	WD repeat containing protein 593 aa	1401,816	34,29	*	*	*
PAAG_07634	Small GTPase RhoA 192 aa	14577,4633	43,8	*	C:20	*
PAAG_02351	Ras 1	5134,3345	37,5	*	C:15	*
PAAG_04025	Osmosensor protein 278 aa	1038,412	17,33	2	*	*
PAAG_02817	Stomatin family protein 457 aa	1912,6302	24,78	*	*	*
PAAG_07640	Casein kinase I 284 aa	1194,843	8,48	*	*	*
PAAG_04784	COP9 signalosome complex subunit 1 490 aa	490,1936	17,38	*	*	*
PAAG_02973	Diploid state maintenance protein chpA 318 aa	645,303	13,25	*	*	*
PAAG_06020	Dual specificity protein kinase FUZ7 545 aa	482,1505	26,29	*	*	*
PAAG_03900	GTP binding protein YPT52 210 aa	3019,756	27,11	*	C:20	*
PAAG_00542	Guanine nucleotide binding protein alpha 3 subunit 327 aa	690,6583	20,55	*	C:14/C:16	*
PAAG_08675	Guanine nucleotide binding protein subunit alpha 354 aa	2,1821	0	*	*	*
PAAG_07139	Histidine kinase D5 2004 aa	33,1402	0,2	*	*	*
PAAG_01955	kinase domain containing protein 589 aa	427,5783	13,61	*	*	*
PAAG_05033	Mitogen activated protein kinase 361 aa	1393,813	18,89	*	*	*
PAAG_08518	Ras 2	897,6986	20,59	*	C:20	*
PAAG_06815	Tricalbin 3	532,8388	14,06	2	*	*
CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE						
PAAG_00797	Mitochondrial protein import protein MAS5 411 aa	4262,8403	30,16	*	C:15	*
PAAG_01962	Proteasome 26S subunit 159 aa	3009,604	47,89	*	*	*

PAAG_05142	10 kDa heat shock protein mitochondrial 104 aa	4093,524	47,57	*	*	*
PAAG_07750	Heat shock protein Hsp88 728 aa	786,21653	20,77	*	*	*
PAAG_08059	Heat shock protein 593 aa	21724,6633	55,63	*	*	*
PAAG_03292	Cytochrome c peroxidase 375 aa	16076,5866	52,14	*	*	*
PAAG_03027	Chaperone protein clpB 733 aa	1042,0083	24,77	*	*	*
PAAG_01262	Hsp70 like protein 629 aa	7441,568	49,04	1	*	0.864
PAAG_07775	Heat shock protein SSB1 558 aa	5471,205	40,87	*	*	*
PAAG_05679	Heat shock protein 696 aa	30101,0233	55,39	*	*	*
PAAG_08003	Hsp70 like protein 655 aa	21873,3533	61,47	*	*	*
PAAG_02130	Heat shock protein HSP98 927 aa	1555,2711	22,5	*	*	*
PAAG_01339	Heat shock protein SSC1 681 aa	8222,1776	39,7	*	*	*
PAAG_00871	30 kDa heat shock protein 259 aa	3575,6276	29,07	*	*	*
PAAG_05249	Aldehyde dehydrogenase 497 aa	3533,569	38,64	*	*	*
PAAG_01791	Conserved hypothetical protein 627 aa	693,2148	25,24	1	*	*
PAAG_02106	DNA-repair protein rad13	520,3849	11,8	*	*	*
PAAG_03502	Cytochrome c peroxidase 310 aa	122,946	3,56	*	*	*
PAAG_06811	Heat shock protein STI1 579 aa	670,6323	10,03	*	*	*
PAAG_02686	Hsp90 co chaperone AHA1 330 aa	1188,3823	25,93	*	*	*
PAAG_02164	Mitochondrial GTPase 1230 aa	33,1402	0,33	*	*	*
PAAG_03216	Mitochondrial peroxiredoxin PRX1 223 aa	1142,1105	25,45	*	*	*
PAAG_00535	Mitogen activated protein kinase HOG1 361 aa	1199,4874	11,66	*	*	*

PAAG_08664	Phenylacetate 2 hydroxylase 373 aa	679,416	15,72	*	*	*
BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS						
PAAG_02553	54S ribosomal protein YmL6 347 aa	1058,9765	10,26	*	*	*
PAAG_03489	Cell lysis protein cwl1 358 aa	2231,2151	9,15	4	*	*
PAAG_08209	Peroxin	14078,9466	35,71	1	*	*
PAAG_07503	Acyl sn glycerol 3 phosphate acyltransferase beta 304 aa	1204,6494	20,13	2	*	*
PAAG_06192	ARP2 3 complex 20 kDa subunit 170 aa	859,9917	25,74	*	*	*
PAAG_03391	Chitin synthase B	717,8049	15,3	6	*	*
PAAG_07457	Mitochondrial genome maintenance protein Mgr2	731,8563	18,58	2	*	*
PAAG_03161	GTP binding protein ypt5 215 aa	5948,282	47,97	*	*	*
PAAG_01929	HNRNP arginine N methyltransferase 308 aa	547,1126	14,01	*	*	*
PAAG_07192	Microtubule associated protein RP EB family member	3274,7946	37,83	*	*	*
PAAG_00622	Mitochondria fission 1 protein 154 aa	971,2325	24,51	1	*	*
PAAG_01647	Tubulin alpha 1 chain 452 aa	12488,2443	50,85	*	*	*
PAAG_08104	Alpha tubulin 73 aa	1951,851	73,61	*	*	*
PAAG_00672	MRS7 family protein 551 aa	499,9489	26,73	1	*	*
ENERGY						
PAAG_03138	Alanine glyoxylate aminotransferase 494 aa	1391,719	6,29	*	*	*
PAAG_08468	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 339 aa	37419,7233	22,25	*	*	*
PAAG_01995	Fructose bisphosphate aldolase 361 aa	1132,2143	27,15	*	*	*
PAAG_02869	Phosphoglycerate kinase 418 aa	10327,3906	50,12	*	*	*

PAAG_00771	Enolase 405 aa	9634,8496	40,51	*	*	*
PAAG_06380	Pyruvate kinase 535 aa	3437,8333	36,76	*	*	*
PAAG_04444	Transketolase 686 aa	2235,8636	24,38	*	*	*
PAAG_04166	Transaldolase 325 aa	3236,9633	29,93	*	*	*
PAAG_01534	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta 378 aa	11137,9293	47,92	*	*	*
PAAG_08295	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha 406 aa	1311,68293	25,68	*	*	*
PAAG_08351	Mitochondrial NADP specific isocitrate dehydrogenase 234 aa	2336,1739	35,9	*	*	*
PAAG_02653	Acetyl coenzyme A synthetase 670 aa	868,5573	16,19	*	*	*
PAAG_05150	ATP citrate synthase subunit 1 660 aa	2928,3643	31,61	*	*	*
PAAG_01463	Succinyl CoA ligase subunit beta 445 aa	5584,4703	43,77	*	*	*
PAAG_01725	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit 597 aa	1130,4856	23,71	*	*	*
PAAG_08551	ATP synthase subunit g 200 aa	5893,458	27,64	*	*	*
PAAG_02656	NADH ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit 516 aa	1154,8971	22,52	*	*	*
PAAG_08088	Cytochrome b c1 complex subunit 2 464 aa	5059,4146	34,19	*	*	*
PAAG_00151	NADH cytochrome b5 reductase 310 aa	1436,068	27,51	*	*	*
PAAG_00953	NADH cytochrome b5 reductase 334 aa	2459,3725	25,37	*	*	*
PAAG_07246	Cytochrome-c oxidase chain VI	12040,7766	49,9	*	*	*
PAAG_08966	NADH ubiquinone oxidoreductase 78 kDa subunit 729 aa	1246,3384	27,06	*	*	*
PAAG_04838	ATP synthase subunit 4 245 aa	13824,061	32,51	*	*	*
PAAG_04570	ATP synthase D chain mitochondrial 175 aa	3393,791	44,63	*	*	*
PAAG_06796	Cytochrome c oxidase polypeptide IV	2068,627	20,13	*	*	*

PAAG_07672	Ubiquinol-cytochrome c reductase subunit 7	11419,6336	44,53	*	*	*
PAAG_08057	Cytochrome c oxidase polypeptide V 200 aa	2165,2433	24,12	*	*	*
PAAG_02265	Mitochondrial F1F0 ATP synthase subunit 102 aa	14358,8533	41,58	1	*	*
PAAG_01044	NADH ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit 260 aa	852,6889	22,395	*	*	*
PAAG_04820	ATPase alpha subunit 466 aa	28841,8933	41,79	*	*	*
PAAG_05576	ATP synthase gamma chain 298 aa	4072,588	43,32	*	*	*
PAAG_08037	ATP synthase subunit beta 514 aa	2882,6873	37,55	*	*	*
PAAG_06093	Cytochrome c1	2554,5423	33,85	1	*	*
PAAG_05031	NADH ubiquinone oxidoreductase 40 kDa subunit 294 aa	3032,05	35,03	*	*	*
PAAG_01265	Cytochrome b5	4814,3106	44,93	1	*	*
PAAG_03160	Formation of crista junctions protein	1367,604	12,7	1	*	*
PAAG_03309	Suaprga1 307 aa	1644,429	23,855	*	*	*
PAAG_00403	Alcohol dehydrogenase 355 aa	1140,0755	23,44	*	*	*
PAAG_02050	Pyruvate decarboxylase 575 aa	1721,0479	20,79	*	*	*
PAAG_04542	Malate synthase 540 aa	780,7088	20,1	*	*	*
PAAG_05367	Alcohol dehydrogenase zinc binding domain containing protein 339	755,2223	20,71	*	*	*
PAAG_08352	NADH-ubiquinone oxidoreductase 14kD subunit	3844,859	42,86	1	*	*
PAAG_08315	NADH-ubiquinone oxidoreductase 20.1kD subunit	1060,693	18,71	1	*	*
PAAG_04698	NADH-ubiquinone oxidoreductase	1624,4416	21,59	*	*	*
PAAG_06970	Mitochondrial ribosomal protein subunit S24	1646,1945	10,25	*	*	*
PAAG_02297	Cytochrome b c1 complex subunit Rieske	592,9667	10	*	*	*

PAAG_06268	Cytochrome c 112 aa	753,4983	36,94	*	*	*
PAAG_03330	Dihydrolipoyl dehydrogenase	790,2839	16,37	*	*	*
PAAG_08062	F-type H+-transporting ATPase subunit epsilon	4030,074	43,24	*	*	*
PAAG_01307	NADH dehydrogenase iron sulfur protein 289 aa	2644,2713	23,15	*	*	*
PAAG_02266	NADH ubiquinone oxidoreductase 21 kDa subunit 226 aa	1014,265	20,89	*	*	*
PAAG_05735	NADH ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit 480 aa	2164,0415	27,45	*	*	*
PAAG_00726	Pyruvate carboxylase 1197 aa	559,2315	13,79	*	*	*
PAAG_02769	Pyruvate dehydrogenase protein X component 496 aa	19,8429	0	*	*	*
PAAG_04238	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit 655 aa	129,203	1,99	*	*	*
PROTEIN FATE (folding, modification, destination)						
PAAG_01874	Dolichol phosphate mannosyltransferase 280 aa	5748,877	39,43	*	*	*
PAAG_05417	Mitochondrial processing peptidase subunit beta 480 aa	4156,864	30,55	*	*	*
PAAG_04458	Prohibitin 1	14155,16	43,69	*	*	*
PAAG_01926	Protease regulatory subunit 4	1438,5101	21,62	*	*	*
PAAG_03334	Peptidyl prolyl cis trans isomerase D 374 aa	598,0195	19,03	*	*	*
PAAG_07037	Calnexin 568 aa	710,96	23,33	1	*	0.826
PAAG_01727	T complex protein 1 subunit delta 511 aa	3194,1623	26,4	*	*	*
PAAG_07394	T complex protein 1 subunit zeta 541 aa	1379,762	15,18	*	*	*
PAAG_08287	T complex protein 1 subunit theta 594 aa	907,9338	14,67	*	*	*
PAAG_06068	T complex protein 1 subunit beta 555 aa	1181,8893	20,88	*	*	*
PAAG_07165	T complex protein 1 subunit gamma 539 aa	1592,7283	25,09	*	*	*

PAAG_07851	T complex protein 1 subunit eta 564 aa	1976,1166	26,4	*	*	*
PAAG_08184	T complex protein 1 epsilon subunit 569 aa	941,2573	17,84	*	*	*
PAAG_03952	T complex protein 1 subunit alpha 569 aa	1952,3523	29,57	*	*	*
PAAG_06464	Dissulfeto isomerase	546,0676	10,8	1	*	0.851
PAAG_00986	Disulfide isomerase Pdi1 539 aa	786,5967	18,27	*	*	0.772
PAAG_01278	karyopherin Kap123 1102 aa	695,3227	11,99	*	*	*
PAAG_00493	Autophagy related protein 3 387 aa	867,66	8,81	*	*	*
PAAG_00730	Clathrin heavy chain 1 1650 aa	847,8577	11,8	*	*	*
PAAG_05643	Endoplasmic reticulum and nuclear membrane proteinc Npl4 907 aa	876,5252	11,81	*	*	*
PAAG_00188	Intermembrane space import and assembly protein	634,6738	16,75	*	*	*
PAAG_05910	Dolichyl phosphate mannose protein mannosyltransferase 917 aa	1059,8422	7,53	8	*	*
PAAG_04725	Dolichyl phosphate mannose protein mannosyltransferase 783 aa	506,2559	5,75	10	*	*
PAAG_04110	Dolichyl di phosphooligosaccharide protein glycotransferase 471	1612,2636	17,52	1	*	0.949
PAAG_01390	Endoplasmic reticulum protein 570 aa	608,8935	15,29	1	*	0.658
PAAG_02085	Signal sequence processing protein SEC11 198 aa	819,9139	15,23	*	*	*
PAAG_05962	26S proteasome non ATPase regulatory subunit 3 642 aa	682,4932	21,06	*	*	*
PAAG_06536	Ubiquitin 155 aa	6828,7246	49,13	*	*	*
PAAG_08205	Proteasome non ATPase regulatory subunit 6 491 aa	917,8456	19,49	*	*	*
PAAG_07286	Vacuolar protein sorting associated protein 133 aa	1150,235	37,88	*	*	*
PAAG_00770	26S protease regulatory subunit 355 aa	623,0903	16,38	*	*	*
PAAG_04899	26S protease regulatory subunit 4 393 aa	897,8351	27,295	*	*	*

PAAG_01963	26S protease regulatory subunit 6B 236 aa	1330,2047	20,215	*	*	*
PAAG_01479	26S protease regulatory subunit 8 390 aa	808,7674	22,96	*	*	*
PAAG_05509	26S proteasome non ATPase regulatory subunit 11 425 aa	536,9644	18,16	*	*	*
PAAG_07238	Alpha 1 2 mannosyltransferase KTR1 397 aa	1050,5451	23,48	1	*	0.732
PAAG_05663	ARP2 3 complex 34 kDa subunit 319 aa	727,3793	15,09	*	*	*
PAAG_07024	Autophagy related protein 24 488 aa	394,0214	15,61	*	*	*
PAAG_03464	Bleomycin hydrolase 516 aa	749,9655	24,08	*	C:14	*
PAAG_00744	CAAX prenyl protease 457 aa	1097,6945	6,03	4	*	*
PAAG_01596	Chromatin remodeling complex subunit Arp5 766 aa	395,7057	16,99	*	*	*
PAAG_07426	Prefoldin subunit	545,3953	13,64	*	*	*
PAAG_08547	Conserved hypothetical protein 277 aa	497,0858	13,04	*	*	*
PAAG_01674	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	423,416	10,39	*	*	*
PAAG_02584	Importin subunit alpha-1	674,6906	17,1	*	*	*
PAAG_02783	Conserved hypothetical protein 599 aa	19,8429	0	*	*	*
PAAG_07765	Vacuolar protein sorting-associated protein	480,8707	19,92	*	*	*
PAAG_08431	Dolichyl phosphate mannose protein mannosyltransferase 746 aa	479,6459	14,23	9	*	*
PAAG_08733	E3 ubiquitin protein ligase MARCH6 1669 aa	1,2164	0	16	*	*
PAAG_00852	Proteasome component C1 348 aa	559,784	24,21	1	*	*
PAAG_00866	Proteasome component C5 267 aa	587,9078	15,41	*	*	*
PAAG_07802	Proteasome component PRE6 270 aa	564,5434	22,68	*	*	*
PAAG_01104	Proteasome component PUP1 277 aa	499,7239	13,04	*	*	*

PAAG_07235	SNARE domain containing protein 252 aa	724,6943	20,12	*	*	*
PAAG_05468	Translocation protein sec63 693 aa	571,0369	11,85	3	*	*
PAAG_04327	Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase 1122 aa	0,2467	0	*	*	*
METABOLISM						
PAAG_00435	R benzylsuccinyl CoA dehydrogenase 445 aa	1791,7953	21,92	*	*	*
PAAG_00731	Bifunctional purine biosynthesis protein ADE17 605 aa	1626,1536	31,18	*	*	*
PAAG_00850	Glucosamine fructose 6 phosphate aminotransferase 489 aa	16121,64	44,6	*	*	*
PAAG_00856	Isocitrate dehydrogenase subunit 1 389 aa	4554,502	35,57	*	*	*
PAAG_01002	NAD specific glutamate dehydrogenase 1104 aa	2632,0266	29,49	*	*	*
PAAG_01178	Phosphogluconate dehydrogenase 492 aa	2827,05	37,2	*	*	*
PAAG_01321	Oxidoreductase 2 nitropropane dioxygenase family 356 aa	15024,1833	53,14	*	*	*
PAAG_01524	Fatty acid synthase subunit beta dehydratase 2087 aa	2062,9183	26,38	*	*	*
PAAG_01525	Fatty acid synthase subunit alpha reductase 1884 aa	2100,563	28,66	*	*	*
PAAG_01568	Glycine dehydrogenase 1184 aa	621,9026	14,79	*	*	*
PAAG_01575	Sterol 24 C methyltransferase 378 aa	1029,047	20,69	*	*	*
PAAG_01833	Succinylbenzoate CoA ligase 583 aa	964,2529	14,54	*	*	*
PAAG_01882	Acetolactate synthase catalytic subunit 702 aa	2207,4957	17,35	*	*	*
PAAG_01931	Phosphoacetylglucosamine mutase 549 aa	1523,6973	21,35	*	*	*
PAAG_02603	Aspartate aminotransferase 430 aa	5199,8433	35,66	*	*	*
PAAG_02633	Ribose phosphate pyrophosphokinase 321 aa	1878,9536	27,29	*	*	*
PAAG_02718	Mannose 1 phosphate guanyltransferase 416 aa	1568,0041	18,87	*	*	*

PAAG_02901	S adenosylmethionine synthetase 386 aa	882,1443	26,23	*	*	*
PAAG_03296	Isopropylmalate dehydratase 749 aa	1051,8044	22,46	*	*	*
PAAG_03978	Hydroxyisobutyrate dehydrogenase 345 aa	6986,7013	49,51	*	*	*
PAAG_04102	Isovaleryl CoA dehydrogenase 431 aa	1649,296	17,82	*	*	*
PAAG_04233	Nitropropane dioxygenase 331 aa	2111,5705	17,42	*	*	*
PAAG_04401	Branched chain amino acid aminotransferase 411 aa	3525,2723	25,52	*	*	*
PAAG_04550	Methylcitrate synthase 470 aa	3237,7276	33,12	*	*	*
PAAG_05048	Isopropylmalate dehydratase large subunit 728 aa	1650,6153	35,71	*	*	*
PAAG_05328	Isopropylmalate dehydrogenase A 363 aa	766,7624	17,26	*	*	*
PAAG_05392	Betaine aldehyde dehydrogenase 479 aa	785,2955	21,13	*	*	*
PAAG_05419	rRNA 2 O methyltransferase fibrillarin 319 aa	3643,779	20,23	*	*	*
PAAG_06289	Tryptophan synthase 725 aa	924,6957	12,29	*	*	*
PAAG_06387	Homoisocitrate dehydrogenase 362 aa	5511,934	37,49	*	*	*
PAAG_06431	Ornithine aminotransferase 461 aa	698,6504	22,17	*	*	*
PAAG_06506	Aspartate aminotransferase 464 aa	1243,903	19,01	*	*	*
PAAG_06961	Aldehyde dehydrogenase 496 aa	1666,524	12,62	*	*	*
PAAG_07036	Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase 587 aa	1451,5292	20,02	*	*	*
PAAG_07089	Homocitrate synthase 430 aa	2083,0766	31,39	*	*	*
PAAG_07114	Argininosuccinate synthase 414 aa	6397,1293	42,05	*	*	*
PAAG_07412	Serine hydroxymethyltransferase 472 aa	3078,0356	17,19	*	*	*
PAAG_07605	Acetolactate synthase small subunit 338 aa	540,1877	17,95	*	*	*

PAAG_07729	Isocitrate dehydrogenase subunit 2 342 aa	8592,0716	40,17	*	*	*
PAAG_07786	Acetyl CoA acetyltransferase 400 aa	5703,5216	24,89	*	*	*
PAAG_07804	D lactate dehydrogenase 525 aa	601,67615	12,5	*	*	*
PAAG_08075	Citrate synthase 475 aa	6440,8543	41,35	*	*	*
PAAG_08100	O acetylhomoserine thiol lyase 440 aa	2910,88	34,16	*	*	*
PAAG_08174	Mannose 1 phosphate guanyltransferase subunit beta A 506 aa	2440,3996	21,52	*	*	*
PAAG_08313	L PSP endoribonuclease family protein Hmf1 168 aa	1207,5103	28,44	*	*	*
PAAG_02068	Conserved hypothetical protein 450 aa	779,8277	18,26	*	*	*
PAAG_08349	C 1 tetrahydrofolate synthase 940 aa	818,1634	16,83	*	*	*
PAAG_08512	Serine hydroxymethyltransferase 536 aa	1250,777	15,42	*	*	*
PAAG_08668	Anthranilate synthase component 2 772 aa	606,0465	18,55	*	*	*
PAAG_08859	Peroxisomal multifunctional enzyme 902 aa	902,4442	15,64	*	*	*
PAAG_09072	Mitochondrial nuclease 336 aa	7582,7176	27,66	1	*	*
PAAG_00050	Pyruvate dehydrogenase protein X component 490 aa	582,5558	17,58	*	*	*
PAAG_00053	Malate dehydrogenase 341 aa	1838,3945	30,59	*	*	*
PAAG_08915	Dihydrolipoamide succinyltransferase 514 aa	653,7219	10,43	*	*	*
PAAG_05454	Acyl CoA dehydrogenase 440 aa	1087,9606	22,66	*	*	*
PAAG_02664	ketoacyl CoA thiolase 418 aa	3311,172	29,57	*	*	*
PAAG_00932	Dynein light chain 95 aa	831,9982	23,4	*	*	*
PAAG_04904	ATP binding cassette sub family F member 2 628 aa	1984,2146	13,34	*	*	*
PAAG_00468	Aminobutyrate aminotransferase 286 aa	1280,0103	23,04	*	*	*

PAAG_03643	6 phosphofructo 2 kinase 535 aa	449,4869	17,23	*	*	*
PAAG_01583	6 phosphofructokinase subunit beta 801 aa	1036,5602	22,46	*	*	*
PAAG_08731	Acetyl CoA carboxylase 2273 aa	677,9765	17,67	*	*	*
PAAG_04528	Acetylglutamate kinase 905 aa	579,4745	15,04	*	*	*
PAAG_02859	Adenosylhomocysteinase 448 aa	802,827	17	*	*	*
PAAG_02170	Adenylosuccinate synthetase 422 aa	574,3149	8,67	*	*	*
PAAG_08105	Alpha tubulin 263 aa	1122,185	26,59	*	*	*
PAAG_06407	Argininosuccinate lyase 300 aa	911,2136	28,59	*	*	*
PAAG_01144	Aspartate aminotransferase 440 aa	628,6774	20,73	*	*	*
PAAG_08065	Aspartate semialdehyde dehydrogenase 395 aa	502,869	9,9	*	*	*
PAAG_06403	ATP binding cassette sub family G member 2 1102 aa	511,0931	8,45	8	*	0.455
PAAG_03971	FAD synthetase	551,6823	8,67	*	*	*
PAAG_05665	Alpha/beta hydrolase fold-3 domain-containing protein	493,2758	11,74	*	*	*
PAAG_03299	Serum paraoxonase/arylesterase	1053,0627	26,6	*	*	*
PAAG_00030	Elongation factor 3 1073 aa	417,4897	9,7	*	*	*
PAAG_05460	Glutamyl tRNA Gln amidotransferase subunit A 614 aa	1432,3316	15,33	*	*	*
PAAG_05984	Glutaryl CoA dehydrogenase 429 aa	1156,394	36,45	*	*	*
PAAG_00545	Glycogen phosphorylase 878 aa	479,5542	8,44	*	*	*
PAAG_07276	Glycogen synthase 711 aa	594,2717	17,09	*	*	*
PAAG_04348	Homoserine kinase 359 aa	569,2174	14,53	*	*	0.779
PAAG_03404	Ketol acid reductoisomerase 134 aa	1772,618	36,84	*	*	*

PAAG_02644	Kynurenine oxoglutarate transaminase 452 aa	657,4313	6,21	*	*	*
PAAG_02604	Tyrosine decarboxylase 578 aa	510,3899	7,28	*	*	*
PAAG_01336	Long chain fatty acid CoA ligase 669 aa	665,508	13,02	*	*	*
PAAG_04597	Malate dehydrogenase 360 aa	606,8244	25,91	*	*	*
PAAG_04109	NADH ubiquinone oxidoreductase 9 5 kDa subunit 77 aa	4248,134	47,37	1	*	*
PAAG_08277	Nitroreductase family protein 223 aa	924,5701	27,93	*	*	*
PAAG_04291	Nucleoside diphosphate kinase 153 aa	1323,2328	18,09	*	*	*
PAAG_05951	Octanoyltransferase 312 aa	33,1402	1,29	*	*	*
PAAG_08156	Onanonoxo 7 onima 8 eninoihtemlysoneda 756 aa	19,8429	0	*	*	*
PAAG_03237	Phospho 2 dehydro 3 deoxyheptonate aldolase 457 aa	499,7952	16,01	*	*	*
PAAG_04548	Prion formation protein 1110 aa	0,6048	0	*	*	*
PAAG_08517	Propionate CoA ligase 711 aa	865,5263	9,29	1	*	*
PAAG_03659	Protein kinase gsk3 395 aa	778,7439	24,11	*	*	*
PAAG_07321	Pyridoxine biosynthesis protein PDX1 325 aa	1167,5454	22,53	*	*	*
PAAG_00116	Pyrroline 5 carboxylate reductase 337 aa	477,0858	7,74	1	*	*
PAAG_02115	Ribose phosphate pyrophosphokinase 455 aa	451,0374	22,03	*	*	*
PAAG_07339	S phase kinase associated protein 1A 170 aa	4489,4033	40,04	*	*	*
PAAG_03141	Serine threonine protein kinase SAPK2 1177 aa	1,8255	0	*	*	*
PAAG_00783	Serine threonine protein phosphatase PP1 326 aa	842,7886	22,46	*	*	*
PAAG_06953	Short chain dehydrogenase reductase family 261 aa	1530,8896	33,71	*	*	*
PAAG_08773	Squalene monooxygenase 478 aa	687,7158	9,85	1	*	*

PAAG_00417	Succinyl CoA ligase subunit alpha 332 aa	694,6887	14,8	*	*	*
PAAG_00346	Triacylglycerol lipase 599 aa	33,1402	0,67	1	*	*
PAAG_01711	tRNA methyltransferase Trm5 480 aa	44,6446	0	*	*	*
PAAG_04054	Ubiquitin protein ligase molybdopterin converting factor 654 aa	947,3339	17,66	*	*	*
PAAG_06237	Urease accessory protein ureG 271 aa	1211,046	23,33	*	*	*
PAAG_06700	Uridylate kinase 258 aa	2033,3245	30,15	*	*	*
PAAG_06817	UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase 526 aa	1071,9173	24,12	*	*	*
PAAG_08353	Vacuolar import and degradation protein 1098 aa	598,5093	16,23	*	*	*
CELL TYPE DIFFERENTIATION						
PAAG_07055	RGS domain protein (Rax1)	858,6917	11,2	4	*	*
PAAG_04183	Clock controlled protein	558,5612	21,55	*	*	*
PAAG_02314	DUF221 family protein	536,0427	3,64	10	*	*
PAAG_07669	Mannan polymerase II complex ANP1 subunit 461 aa	540,5182	12,61	*	*	*
CELL FATE						
PAAG_09083	TCTP family protein 183 aa	2468,5025	24,72	*	*	*
PAAG_07849	Metacaspase 1 384 aa	579,4543	27,15	*	*	*
PAAG_05737	Calcium calmodulin dependent protein kinase 446 aa	705,2043	13,03	*	*	*
PAAG_01193	DUF21 and CBS domain protein Mam3 781 aa	608,4763	13,85	3	*	*
PAAG_00240	Eukaryotic translation initiation factor 5A 139 aa	1369,348	65,22	*	*	*
PAAG_02100	Glycolipid anchored surface protein 447 aa	433,6463	13,45	2	GPI	*
PAAG_08936	SH3 domain containing protein 470 aa	840,806	11,09	*	*	*

CELL CYCLE AND DNA PROCESSING						
PAAG_03993	DNA replication licensing factor MCM2 886 aa	652,9418	14,35	*	*	*
PAAG_07273	DNA replication licensing factor mcm5 719 aa	645,9526	19,78	*	*	*
PAAG_06511	Mitochondrial genome maintenance protein mgm101 296 aa	2913,459	29,04	*	*	*
PAAG_02364	Thioredoxin 117 aa	8033,065	52,01	*	*	*
PAAG_01041	Prohibitin 2	5687,038	44,83	1	*	*
PAAG_06891	mRNA binding post transcriptional regulator Csx1 401 aa	1334,453	18	*	*	*
PAAG_01726	26S protease regulatory subunit 8 440 aa	1253,5539	22,1	*	*	*
PAAG_07395	Nucleolar protein NOP56 522 aa	1328,9376	21,75	*	*	*
PAAG_08918	Late histone H2B L4 142 aa	20075,15	43,26	*	*	*
PAAG_08471	Histone H2A Z 139 aa	10121,3633	29,22	*	*	*
PAAG_05518	Cell division cycle protein 821 aa	1492,435	27,39	*	*	*
PAAG_03532	Actin 376 aa	33003,8333	69,24	*	*	*
PAAG_03031	Tubulin beta chain 448 aa	12954,2133	37,28	*	*	*
PAAG_07170	Eukaryotic translation initiation factor 3 135 kDa subunit 1270	664,5688	16,55	*	*	*
PAAG_02396	Actin 441 aa	2095,0516	20,83	*	*	*
PAAG_01186	Cell division control protein 334 aa	974,0853	16,52	*	*	*
PAAG_08880	Cell division control protein 386 aa	543,7969	22,34	*	*	*
PAAG_08435	Cell division control protein 394 aa	1166,532	6,36	1	*	*
PAAG_00182	Cell division control protein 522 aa	518,4965	14,87	*	*	*
PAAG_00153	Condensin subunit Cut3	518,4066	10,24	*	*	*

PAAG_02627	AAA family ATPase Pontin	919,4902	7,79	*	*	*
PAAG_06260	Calcineurin binding protein	522,6362	16,94	*	*	*
PAAG_01493	Chromosome segregation in meiosis protein 3	544,9095	18,1	*	*	*
PAAG_08460	RNA-binding protein Cip2	411,3778	14,87	*	*	*
PAAG_05896	Conserved hypothetical protein 736 aa	566,882	16,46	*	*	*
PAAG_03905	DNA directed RNA polymerase 1406 aa	19,8429	0	*	*	*
PAAG_02567	EF hand superfamily Ca2 modulated protein 220 aa	418,4697	27,4	*	*	*
PAAG_03710	Small nuclear ribonucleoprotein SmG	561,246	7,1	*	*	*
PAAG_02262	Pre mRNA splicing factor cef1 792 aa	486,8365	13,91	*	*	*
PAAG_00294	Replication factor A protein 604 aa	530,816	11,28	*	*	*
PAAG_07682	Ribonucleoside diphosphate reductase large chain 879 aa	579,6788	13,95	*	*	*
PAAG_00363	Ribosome biogenesis ATPase RIX7 747 aa	67,7153	0,67	*	*	*
PAAG_04487	Serine threonine protein kinase sid2 658 aa	555,7713	10,88	*	*	*
PAAG_00570	Tubulin gamma chain 448 aa	679,0067	7,38	*	*	*
PAAG_04282	UBX domain containing protein 393 aa	489,9365	21,94	*	*	*
PAAG_00987	Uracil DNA glycosylase 898 aa	544,1973	12,26	*	*	*
TRANSCRIPTION						
PAAG_00734	ATP dependent RNA helicase DED1 684 aa	1987,9416	24,89	*	*	*
PAAG_04651	GTP binding nuclear protein GSP1 Ran 216 aa	22009,1066	49,61	*	*	*
PAAG_00126	Histone H4 2 104 aa	33088,815	58,735	*	*	*
PAAG_07099	Histone H3 3 137 aa	7287,8926	27,2	*	*	*

PAAG_08833	ATP dependent RNA helicase DHH1 516 aa	1219,0685	21,555	*	*	*
PAAG_05498	Nucleolar protein NOP58 890 aa	568,46075	15,075	*	*	*
PAAG_01062	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 122 aa	2723,722	28,93	*	*	*
PAAG_07349	Glycyl tRNA synthetase 656 aa	1016,8775	21,22	*	*	*
PAAG_01097	Poly rC binding protein 496 aa	1314,502	22,42	*	*	*
PAAG_07098	Histone H4 1 104 aa	36684,25	54,36	*	*	*
PAAG_06487	60S ribosomal protein L7 C 249 aa	9156,1423	51,48	*	*	*
PAAG_00801	60S acidic ribosomal protein P0 lyase 314 aa	4829,718	30,67	*	*	*
PAAG_07283	ATP dependent RNA helicase FAL1 409 aa	4941,251	36,52	*	*	*
PAAG_04511	ATP dependent RNA helicase SUB2 468 aa	3377,1966	28,33	*	*	*
PAAG_07785	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component 990 aa	422,8015	5,42	*	*	*
PAAG_06484	ATP dependent RNA helicase DBP2 548 aa	1866,7076	23,52	*	*	*
PAAG_02173	ATP dependent RNA helicase mss116 680 aa	559,2405	10,9	*	*	*
PAAG_08223	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	3291,0935	33,62	*	*	*
PAAG_04572	Ribosomal protein L14 148 aa	2791,169	18,37	*	*	*
PAAG_02537	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 115 aa	1924,009	33,33	*	*	*
PAAG_05103	Threonyl tRNA synthetase 765 aa	600,3844	11,52	*	*	*
PAAG_08117	Transcriptional regulator 469 aa	934,946	16,24	*	*	*
PAAG_02865	Translation initiation factor RLI1 624 aa	754,3664	17,41	*	*	*
PAAG_02488	tRNA pseudouridine synthase 411 aa	443,684	17,8	*	*	*
PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT (structural or catalytic)						

PAAG_04913	Nucleolar protein	2801,6966	28,43	*	*	*
DEVELOPMENT (Systemic)						
PAAG_02244	Nucleolysin TIA-1	506,3225	7,05	*	*	*
INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT						
PAAG_05638	F actin capping protein subunit beta 267 aa	3084,986	41,35	*	*	*
UNCLASSIFIED						
PAAG_01412	Conserved hypothetical protein 458 aa	668,8752	18,38	*	*	*
PAAG_01347	Actin cytoskeleton protein VIP1 267 aa	1140,4921	31,58	*	*	*
PAAG_02379	Hypothetical protein 215 aa	1523,9997	17,13	*	*	*
PAAG_03243	Conserved hypothetical protein 319 aa	533,5339	20,12	*	*	*
PAAG_04911	Conserved hypothetical protein 300 aa	954,1459	7,36	4	*	*
PAAG_05911	Conserved hypothetical protein 147 aa	4753,0504	25,11	1	*	*
PAAG_05510	Integral membrane protein 245 aa	1998,4395	14,96	3	*	*
PAAG_02600	Peptidyl-tRNA hydrolase	3488,741	30,83	*	*	0.665
PAAG_08268	Conserved hypothetical protein 573 aa	1959,3893	8,21	*	*	*
PAAG_06541	Erythrocyte band 7 integral membrane protein 361 aa	3142,1906	34,72	*	*	*
PAAG_04157	DUF1620 domain-containing protein	427,437	7,35	1	*	0.863
PAAG_06701	PCI domain containing protein 750 aa	813,5891	5,74	1	*	0.790
PAAG_04015	NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit	804,09	11,65	*	*	*
PAAG_04346	Conserved hypothetical protein 107 aa	514,0698	24,53	*	*	*
PAAG_04990	Conserved hypothetical protein 1164 aa	3,6886	0	*	*	*

PAAG_02086	Conserved hypothetical protein 130 aa	855,1489	21,71	*	*	*
PAAG_07960	DDHD domain-containing protein	5972,249	16,56	4	*	*
PAAG_08058	Conserved hypothetical protein 156 aa	2512,436	28,39	*	*	*
PAAG_01844	Conserved hypothetical protein 1697 aa	33,1402	0,24	*	*	*
PAAG_04011	Conserved hypothetical protein 184 aa	572,0509	22,95	*	*	*
PAAG_01890	Conserved hypothetical protein 190 aa	1876,0713	25,04	2	*	*
PAAG_05112	Conserved hypothetical protein 194 aa	661,5374	7,25	4	*	*
PAAG_01111	Conserved hypothetical protein 224 aa	1830,012	5,38	1	*	*
PAAG_08751	Conserved hypothetical protein 226 aa	567,5331	22,67	*	*	*
PAAG_00184	Endoplasmic reticulum protein	1113,9277	21,145	4	*	*
PAAG_05132	Conserved hypothetical protein 321 aa	454,613	16,56	7	*	*
PAAG_04131	Conserved hypothetical protein 374 aa	589,5588	25,74	1	*	*
PAAG_08234	Transcription factor RfeF	715,7649	16,75	*	*	*
PAAG_05356	30 kDa heat shock protein	1151,737	10,43	*	*	*
PAAG_02192	DUF292 domain protein	1569,5043	11,45	*	*	*
PAAG_06296	Conserved hypothetical protein 418 aa	483,2823	17,27	*	*	*
PAAG_07173	Conserved hypothetical protein 426 aa	600,4747	21,88	*	*	*
PAAG_06978	Conserved hypothetical protein 427 aa	33,1402	0,94	*	*	*
PAAG_07989	Conserved hypothetical protein 485 aa	1134,087	28,93	*	*	*
PAAG_03068	Conserved hypothetical protein 487 aa	480,3353	9,88	*	*	*
PAAG_04199	Scramblase family protein	1024,489	8,59	*	*	*

PAAG_07365	Conserved hypothetical protein 590 aa	566,0575	13,75	*	*	*
PAAG_05082	Conserved hypothetical protein 612 aa	409,8799	9	*	*	*
PAAG_09113	Conserved hypothetical protein 64 aa	603,4567	19,05	*	*	*
PAAG_03636	DUF410 domain-containing protein	574,9553	14,57	*	*	*
PAAG_03247	DUF757 domain containing protein 139 aa	2478,991	34,06	*	*	*
PAAG_05875	Hypothetical protein 115 aa	2749,16	13,16	1	*	*
PAAG_02434	Hypothetical protein 132 aa	1034,5634	51,905	*	*	*
PAAG_00490	DUF1337 domain-containing protein	699,7263	25,97	*	*	*
PAAG_08510	MOSC domain-containing protein	803,8138	22,58	*	*	*
PAAG_08756	Hypothetical protein 239 aa	550,3054	24,79	*	*	*
PAAG_03092	Hypothetical protein 587 aa	567,2517	10,07	*	*	*
PAAG_05231	Hypothetical protein 73 aa	1501,416	30,56	1	*	*
PAAG_12011	Mitochondria cytochrome c oxidase subunit	3885,7656	16,33	*	*	*
PAAG_07570	MSP domain containing protein 373 aa	641,0787	20,16	1	*	*
PAAG_07609	Pentatricopeptide repeat protein 732 aa	44,6446	0	*	*	*
PAAG_01828	Peptidase family M28 family 994 aa	0,6048	0	9	*	*
PAAG_03267	Phosphotransferase enzyme family protein 464 aa	424,699	12,74	*	*	*
PAAG_08571	Predicted protein 103 aa	683,6893	57,84	*	*	*
PAAG_08363	Predicted protein 144 aa	485,1282	18,18	*	*	*
PAAG_03008	Predicted protein 149 aa	505,0739	7,43	*	*	*
PAAG_06757	Predicted protein 185 aa	974,2714	13,04	*	*	*

PAAG_04096	Predicted protein 192 aa	1006,242	34,55	*	*	*
PAAG_04480	Predicted protein 198 aa	491,6375	14,72	*	*	*
PAAG_07010	Zinc knuckle transcription factor	524,2431	14,57	*	*	*
PAAG_04065	Predicted protein 208 aa	492,5695	11,11	*	*	*
PAAG_03072	Predicted protein 227 aa	479,1339	17,7	2	*	*
PAAG_00085	Citrate synthase	642,1614	12,41	*	*	*
PAAG_00972	Predicted protein 301 aa	545,882	20,67	*	*	*
PAAG_08321	Predicted protein 402 aa	660,437	8,73	*	*	*
PAAG_06376	Predicted protein 410 aa	503,9177	10,51	*	*	*
PAAG_01280	Ser Thr protein phosphatase family protein 680 aa	479,5305	13,035	*	*	*
PAAG_06654	Signal sequence receptor alpha chain 275 aa	2035,28	13,68	1	*	0.769
PAAG_00842	Tetratricopeptide repeat domain containing protein 314 aa	1096,839	23,96	*	*	*

[a,b] Number Accession and description of the protein according with database of *Paracoccidioides* spp. BROAD. (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).

[c] Indicates when to match in % corresponds the sequence coverage of peptides.

[d] Represents the peptides found by (MSMS)-number of peptides that match the masses of proteins.

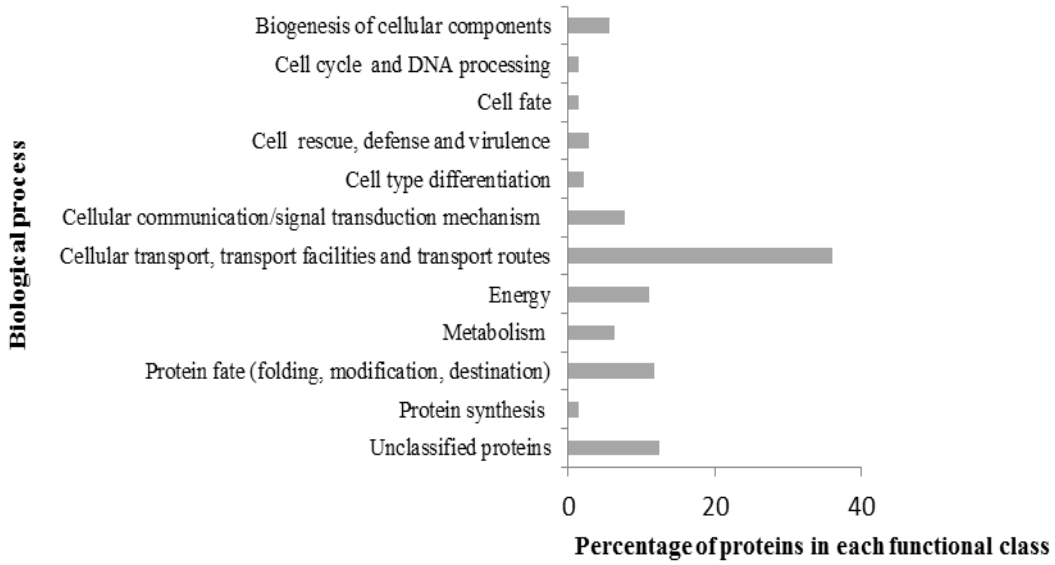
[e] Represents the amount of transmembrane domains identified in proteins using the program TMHMM version 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/).

[f] Indicates the presence of post translational modification. The program TermiNator (http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator3/test.php) and Myristoylator (http://web.expasy.org/myristoylator/) were employed in the search by myristoylated proteins. To search by palmitoylated proteins the program TermiNator was used (http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator3/test.php). For prenylated proteins the program used was the PrePS-Prenylation Prediction Suite (http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/index.html). The prediction for GPI anchor was performed with program big-Pi fungi predictor (http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html). C:14 and C:16 indicates the presence a myristoyl or palmitoyl group on the protein respectively. C:15 indicates the presence of a recognition site to added a group farnesyl by enzyme FT- Farnesyltransferase and C:20 indicates the presence of a recognition site to added a group geranyl by enzyme GGT1- Geranylgeranyltransferase or a site recognition for to added a group geranyl by enzyme GGT2 - Rab Geranylgeranyltransferase. GPI represents the presence of a GPI anchor in protein.

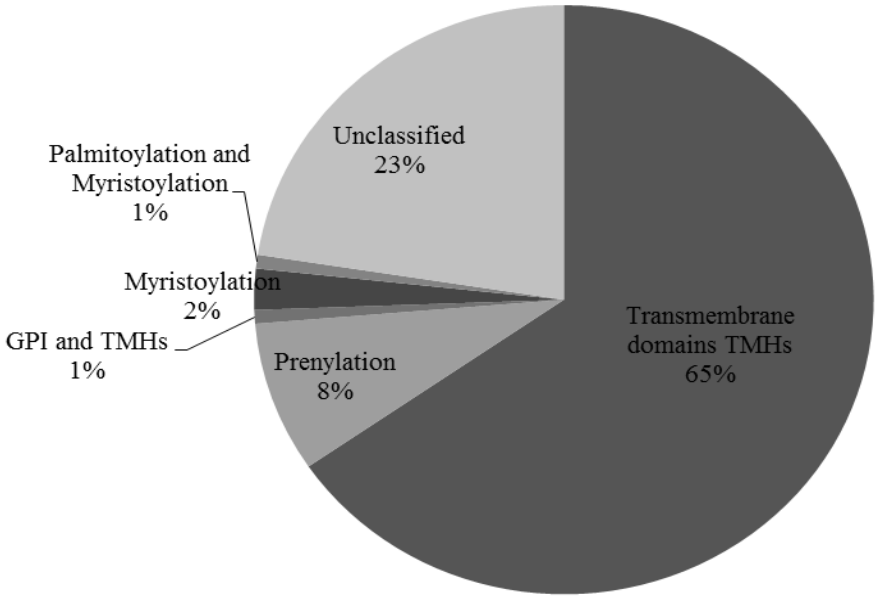
[g] The program SignalP version 4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) was employed in the search for signal peptide. The values demonstrate the score protein with signal peptide. The D-Score must be greater or equal the value of (0.05). In all cases the symbol (*) represent absent in the analyzed category.

The functional classification was performed used the database of FunCat2. (http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_brasi_Pb01).

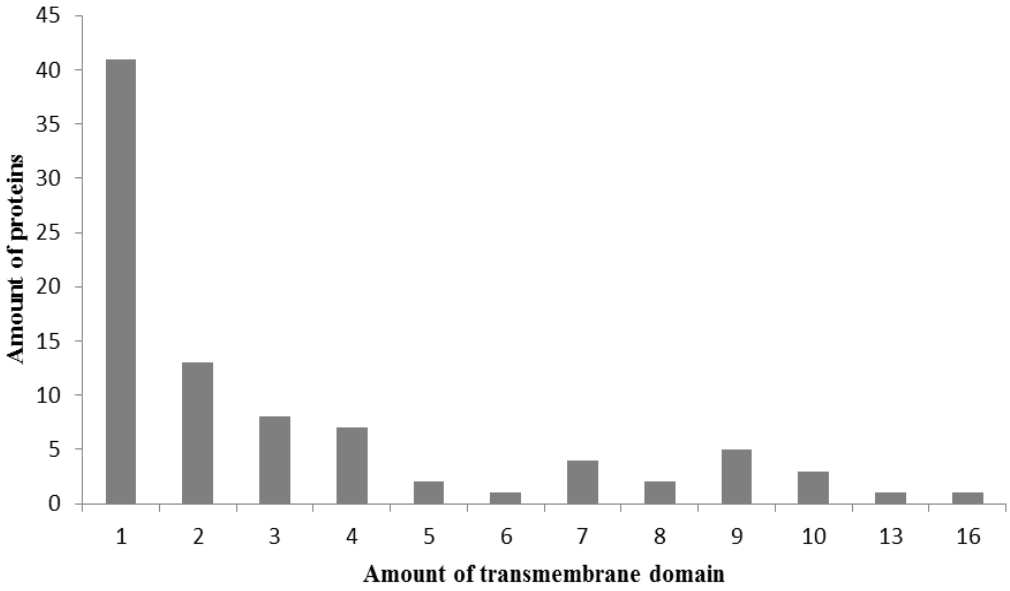
The database Gene Ontology (GO) using the information relative to cellular component was employed to evaluate the possible localization of proteins in cell membranes of *Paracoccidioides* sp.. Some proteins did not show any form of classical association with the lipid bilayer, but showed a cellular components in GO as belonging to regions of membranes, with score ≥ 50.



Supplementary figure 1- Functional classification of the membrane proteins. The functional classification of the proteins used the database Funcat2. Membrane proteins (one hundred thirty-three) were mainly involved with processes of transport, fate (folding, modification, destination) and energy.



Supplementary figure 2- Association of the proteins with the cell membranes. The figure represents the forms of association of proteins with the cell membranes of *Paracoccidioides* sp., the main form of association of the proteins of membranes were through transmembrane domain (TMHs: 65 %). Some proteins not present transmembrane domain or post translational modification but showed the cellular component in gene ontology (GO) as regions of cell membranes (23% unclassified).



Supplementary figure 3- Amount of transmembrane domain among the integral membrane proteins of *Paracoccidioides* sp.. The program TMHMM was used in search by transmembrane domain. The most of the integral membrane proteins of *Paracoccidioides* sp. showed only a transmembrane domain.

REFERENCES

1-RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, Medellin, v.23, p.323-334, 1985.

2-MOREJÓN, K. M. L; MACHADO A. A. MARTINEZ R. Paracoccidioidomycosis in Patients Infected with and Not Infected with Human Immunodeficiency Virus: A Case-Control Study. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, Ribeirão Preto, n. 80, p 359–366, 2009.

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

4-SHIKANAI-YASUDA, M. A.; FILHO, F. Q. T.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Guideliness in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.39, p.297-310, 2006.

5-BASTOS, K. P.; BAILÃO, A. M.; BORGES, C. L.; FARIA, F. P.; FELIPE, M. S. S.; SILVA, M. G.; MARTINS, W. S.; FIÚZA, R. B.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. A. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC Microbiology**, Goiania, v.7, p.1-14, 2007. **INFECTION AND IMMUNITY,** Goiânia, v.74, 382–389, 2006.

6-SILVA, M. G.; SCHRANK, A.; BAILÃO, E. F. L. C.; BAILÃO, A. M.; BORGES, C. L.; CHARLEY, C. S.; PARENTE, A. J.; PEREIRA, M.; IZAAC, S. M. S.; GIANNINI, M. S. J. S.; OLIVEIRA, Z. M. R.; SILVA, R. K. L.; NOSANCHUK, D. J.; VAINSTEIN, H. M.; SOARES, A. M. C. The homeostasis of iron, copper and zinc in Paracoccidioides brasiliensis, Cryptococcus neoformans var. grubii, and Cryptococcus gattii: a comparative analysis. **FrontiersMicrobiol**, Goiania, *v.2*, p.1-19, 2011

7-VIDAKOVICS, M. L. P.; PABA, J.; LAMBERTI, Y.; RICART, C. A.; SOUSA, M. V.; RODRIGUEZ, M. E. Profiling the *Bordetella pertussis* Proteome during Iron Starvation. **Journal of Proteome Research**, La Plata, v. 6, p. 2518-2528, 2006.

8-MOLLOY, M. P.; HERBERT, B. R.; SLADE, M. B.; RABILLOUD, T.; NOUWENS, A. S.; WILLIAMS, K. L.; GOOLEY, A. A. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane, **Eur. J. Biochem**, Michigan, v. 267, p. 2871-2881, 2000.

9-WALLIN, E.; HEIJNE, G. V. -wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. **Protein Science**, Stockholm, v. 7, p.1029-1038, 1998.

10-TAN, S.; TAN, H. T.; CHUNG, M. C. M. Membrane proteins and membrane proteomics. **Proteomics**, Singapore, v.8, p.3924–3932, 2008.

11-SANTONI, V.; MOLLOY, M.; RABILOUD, T. Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? **Electrophoresis**, France, v. 21, p.1054-1070, 2000.

12-GILMORE, J. S.; WASHBURN, M. P. Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes. **Journal of proteomics**, Kansas City, v.73, p.2078-2091, 2010.

13-HOPFF, D.; WIENKOOP, S.; LUTHJE, S. The plasma membrane proteome of maize roots grown under low and high iron conditions. **Journal of proteomics**, Hamburg, v.20, p. 1-14, 2013.

14-RUCEVIC, M.; HIXSON, D.; JOSIC, D. Mammalian plasma membrane proteins as potential biomarkers and drug targets. **Electrophoresis**, Island, v. 32, p. 1549-1564, 2011.

15-FAVA-NETTO C, 1955. Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul americana, com antígeno polissacarídico. *Arq Cir Clin Exp 18*: 197- 254.

16-RESTREPO, A.; JIMÉNEZ, B. E; Growth of Paracoccidioides brasiliensis yeast phase in a chemically defined culture medium. **J Clin Microbiol** v12, p. 279–281, 1980

17-DA FONSECA C. A.; JESUINO, R. S. A.; FELIPE, M. S. S.; CUNHA, D. A.; BRITO, W. A, SOARES, C. M. A. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, Goiânia, v.3, p.535−542, 2001.

18-BARBOSA, M. S.; BÁO, S. N.; ANDREOTTI, P. F.; FARIA, F. P.; FELIPE, M.S.S.; FEITOSA, L.S.; GIANNINI, M. J.S.M.; SOARES, C. M.A. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* Is a Cell Surface Protein Involved in Fungal Adhesion to Extracellular Matrix Proteins and Interaction with Cells.

19-MURRAD, A. M.; SOUSA, G. H. M. F.; GARCIA, J. S.; RECH, E. L. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS ^{E} **J Sep. Sci**. v.34, p. 2618–2630, 2011.

20-DESJARDINS C. A.; CHAMPION M. D.; HOLDER J.W.; MUSZEWSKA A.; GOLDBERG J.; *et al*. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. **PLos Genetics,** Massachusetts, v10 e1002345, 2007.

21-YADETA, K. A.; ELMORE, J. M.; COAKER. G. Advancements in the analysis of the Arabidopsis plasma membrane proteome. **Frontier in plant science**, California, v.4, p.1-9, 2013.

22-FONTAINE, T.; MAGNIN, T.; MELHERT, A.; LAMONT. D.; LATGÉ, J. P.; FERGUSON, M. A. J. Structures of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Aspergillus fumigatus* membrane protein. **Glycobiology**, Paris, v.3, p.169-177, 2003.

23-MBEUNKUI, F.; GOSHE, M. Investigation of solubilization and digestion methods for microsomal membrane proteome analysis using data-independent LC-MS^{E} . **Proteomics**, North Carolina, v.11, p.898–911, 2011.

24-SZOPINSKA, A.; DEGAND, H.; HOCHSTENBACH, J. F.; NADER, J. MORSOMME, P. Rapid response of the yeast plasma membrane proteome to salt stress. **Mol Cell Proteomics**, Belgium, p. 1-15, 2011.

25- MARTINEZ, L. R.; PARDO, J. P.; MIRANDA, M.; MENDEZ, T. V.; ORTEGA, M. G. M.; HERNÁNDEZ, G. M.; SÁNCHEZ, G. G. The basidiomycete *Ustilago maydis* has two plasma membrane H+ ATPases related to fungi and plants. **J Bioenerg Biomembr**, México, v.10, p. 1-14, 2013.

26- COLICELLI, J. Human RAS Superfamily Proteins and Related GTPases. **Sci STKE**,

27-MAULÉON, V. P.; LEFEBVRE, F.; THORAVAL, T.; CROUZET, M.; DOIGNON, F. Phosphoinositides Affect both the Cellular Distribution and Activity of the F-BAR-containing RhoGAP Rgd1p in Yeast **J. Biol. Chem**, Bordeaux, v. 283, p.33249-33257, 2008.

28-LEE, S. C.; SHAW, B. D. Localization and function of ADP ribosylation factor A in *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiol Lett**, Texas, v. 283, p. 216–222, 2008.

29-GIRRBACH, V.; ZELLER, T.; ZELLER, M.; STRAHL-BOLSINGER, S. Structure-Function Analysis of the Dolichyl Phosphate-Mannose:Protein O-Mannosyltransferase ScPmt1p. **The Journal of Biological Chemistry**, Regensburg, v. 275, p. 19288–19296, 2000.

30-BOLSINGER, S. S.; SCHEINOST, A. Transmembrane Topology of Pmt1p, a Member of an Evolutionarily Conserved family of protein O-Manosyltransferases. **J. Biol. Chem**, Regensburg, v. 274, p.9068-9075, 1999.

31-OPALINSKI, L.; KIEL, J. A. K. W.; HOMAN, T. G.; VEENHUIS, M.; KLEI, I. J. D. *Penicillium chrysogenum* Pex14⁄17p – a novel component of the peroxisomal membrane that is important for penicillin production. **FEBS Journal**, Groningen, v.277, p.3203–3218, 2010.

Capítulo 3

1. DISCUSSÃO

1.1 Análises das proteínas da fração de membranas de *Paracoccidioides* sp. empregando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e o método de extração usando carbonato de sódio pH 11.

O proteoma de membrana engloba as proteínas de membrana expressas em determinadas condições e tempo (GILMORE e WASHBURN, 2010). Entretanto, análises de proteínas hidrofóbicas contidas na fração de membrana representam um desafio subproteômico quando comparadas com as proteínas hidrofílicas presentes no citoplasma (MBEUNKI e GOSHE, 2011).

Inicialmente, para as análises de proteínas de membrana de *Paracoccidioides* sp., a abordagem proteômica baseada em eletroforese bidimensional de proteínas (2-DE) foi empregada. Entretanto, os resultados obtidos pela técnica, não representaram o perfil proteômico de *Paracoccidioides* sp., devido ao pequeno número de proteínas identificadas. Abordagens proteômicas baseadas em 2-DE geralmente são limitadas para o estudo de proteínas integrais de membrana devido ao fato que proteínas de membrana apresentam abundância reduzida dentro da célula dificultando sua análise em géis bidimensionais. Adicionalmente, proteínas integrais de membrana são frequentemente insolúveis em soluções aquosas contidas no tampão de reidratação da focalização isoelétrica (SANTONI et al., 2000) e muitas vezes, estas proteínas precipitam perto do seu ponto isoelétrico dificultando a transferência para a segunda etapa da eletroforese bidimensional (MBEUNKI e GOSHE, 2011). Em função do exposto a opção por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, foi realizada no presente trabalho.

Abordagens proteômicas baseada em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) tem sido a ferramenta de escolha para identificação em larga escala e quantificação de proteínas. Esta abordagem é amplamente empregada para o estudo de proteínas de membrana (YADETA et al., 2013). No presente trabalho três metodologias para a extração de proteínas de membrana utilizando espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida foram realizadas. A primeira metodologia utilizada para extração de proteínas de membrana foi baseada em ultracentrifugação conforme descrito por (FONTAINE et al., 2003); a segunda metodologia empregava ultracentrifugação e sonicação (MBEUNKUI

e GOSHE, 2011) e a terceira metodologia utilizava ultracentrifugação e solubilização em carbonato de sódio pH 11 (VIDAKOVICS et al., 2006). Os extratos proteicos de membranas de *Paracoccidioides* sp. obtidos como descrito acima, foram analisados por NanoUPLC-MS^E. Após a obtenção dos dados, análises *in silico* foram realizadas com intuito de determinar a possível localização subcelular das proteínas e desta forma determinar a metodologia mais eficiente em obter proteínas de membranas. Após esta etapa, a metodologia empregando ultracentrifugação e tampão com carbonato de sódio pH 11 (VIDAKOVICS et al., 2006) foi o método de escolha para a obtenção de proteínas da fração de membranas de *Paracoccidioides* sp.

Quando células são lisadas em soluções aquosas, a membrana celular que limita a célula, ou membranas provenientes de diferentes organelas podem fragmentar e formas vesículas. Muitas vezes dentro destas vesículas formadas após a lise celular, proteínas citoplasmáticas ficam aprisionadas. Desta forma, etapas usado soluções como carbonato de sódio em pH 11 são usadas a fim de se remover proteínas que não se associam fortemente com a membrana e se obter um extrato proteico enriquecido de membrana (SANTONI et al., 2000). O uso do tampão com carbonato de sódio tem sido amplamente descrito na literatura como uma ferramenta de escolha para obter proteínas de membrana. Análises de membranas de micro-organismos patogênicos e não patogênicos como *Escherichia coli* (MOLLEY et al., 2000), *Bordetella pertussis* (VIDAKOVICS et al., 2006) *Saccharomyces cerevisiae* (SZOPINSKA et al., 2011) empregando o método com carbonato de sódio em pH 11, permitiu a identificação de inúmeras proteínas de membranas. No proteoma de membranas de *Paracoccidioides* sp., usando carbonato de sódio pH 11, cento e trinta e três proteínas foram descritas como pertencentes a membranas deste fungo.

1.2 Descrição das proteínas identificadas na fração de membranas de *Paracoccidioides* sp. em outros micro-organismos e análises do genoma e proteoma.

Uma variedade de processos celulares é executada pelas proteínas de membrana incluindo adesão, sinalização e transporte celular (GILMORE e WASHBURN, 2010). Proteínas envolvidas em transporte de íons através da membrana plasmática englobam as ATPases, ou bombas de prótons. Estas proteínas acoplam a hidrólise do ATP com a extrusão de H^+, criando um gradiente eletroquímico ao longo da membrana plasmática, o qual é envolvido em inúmeros processos celulares. A família das ATPases incluem as bombas de

cálcio e de sódio/potássio. ATPases são um dos principais transportadores constituintes da membrana plasmática das células fúngicas, dados estes confirmados pela análise do genoma do fungo *Ustilago maydis* o qual possuem genes que codificam para ATPases de membrana conservadas em diferentes fungos (MARTÍNEZ et al., 2013). No extrato protéico referente à fração de membranas de *Paracoccidioides* sp., ATPases de membrana plasmática e ATPases de transporte de sódio e de cálcio foram identificadas. A presença destas proteínas na fração de membranas corrobora com dos dados descritos na literatura em que ATPases são proteínas clássicas constituintes da membrana plasmática (MARTÍNEZ et al., 2013).

O tráfego vesicular é essencial para o transporte de proteínas através das vias endocítica e exocítica. Proteínas SNARES facilitam a fusão entre vesículas e o direcionamento para a membrana alvo. Estas proteínas possuem um domínio conservado em diferentes espécies de fungos. No proteoma da fração de membranas de *Paracoccidioides* sp. as proteínas v SNARE foram identificadas. Durante o desenvolvimento da hifa do fungo filamentoso *Trichoderma reesei* a proteína v SNARE foi descrita em uma região ocupada por vesículas presentes na extremidade da hifa (VALKONEN et al., 2007). A presença da proteína v SNARE em regiões ricas em vesículas sugere uma possível associação das proteínas v SNARE encontradas no proteoma de *Paracoccidioides* sp. com regiões vesiculares dentro da célula.

As proteínas da superfamília Ras executam variados processos celulares como sinalização celular, tráfego de vesículas e dinâmica do citoesqueleto. Esta superfamília engloba as proteínas Rasp, Rhop, Arfp (COLICELLI, 2004). No perfil proteômico da fração de membranas de *Paracoccidioides* sp. as proteínas da superfamília Ras, incluindo Rho GTPase e proteínas Rasp, foram detectadas. Em *Saccharomyces cerevisiae* a proteína prenilada Rho GTPase foi descrita como associada à membrana plasmática através de um domínio F-BAR que media a interação da proteína com o fosfoinositídeos presentes na superfície da membrana plasmática (MAULÉON et al., 2008). A presença destas proteínas preniladas no proteoma da fração de membranas sugere uma possível associação com a membrana plasmática de *Paracoccidioides* sp.

Tráfego de vesículas e organização do citoesqueleto são processos desempenhados por fatores de ribosilação do ADP (Arfp). Fatores de ribosilação do ADP são proteínas miristoiladas as quais se associam à membrana através de ligação ao GTP (WALKER et al.,

1992). Fatores de ribosilação do ADP foram identificados no proteoma de membranas de *Paracoccidioides* sp. Em *Aspergillus nidulans* o fator de ribosilação do ADP localiza-se em um compartimento envolvido no sistema de secreção e provavelmente este compartimento seja o aparato de Golgi (LEE e HAW, 2008). Análises da possível localização subcelular do fator de ribosilação Arl1p revelaram que esta proteína localiza-se na sub-região do *trans*-Golgi (LIU et al., 2005). A presença destas proteínas miristoiladas sugere uma possível associação com a membrana do Golgi durante o tráfego de vesículas em *Paracoccidioides* sp.

Proteínas dolicil fostato manose manosiltransferases foram encontradas na fração de membranas de *Paracoccidioides* sp. Tais proteínas são envolvidas em processos de estabilização, dobramento e destino celular. Proteínas O-manosiltransferases (Pmts) compreendem uma grande família de enzimas que iniciam o processo de O-manosilação de proteínas no retículo endoplasmático (GIRRBACH et al., 2000). Em *Saccharomyces cerevisiae* detectou-se maior atividade da enzima manosiltransferase em regiões ricas em membranas provenientes do retículo endoplasmático (MARRIOTT e TANNER, 1979). Análises da proteína 0-manosiltransferase (Pmt1p) de *S. cerevisiae* demonstraram a presença de sete hélices transmembrama, uma região carboxila terminal voltada para o lúmen do retículo endoplasmático e uma região amino terminal voltada para a face citosólica (BOLSINGER e SCHEINOST, 1999). Outra proteína descrita como sendo integral de membrana do retículo endoplasmático e identificada na fração de membrana de *Paracoccidioides* sp. é a proteína calnexina. No fungo *Schizosaccharomyces pombe* a estrutura da calnexina (Cnx1p) é constituída pelos domínios luminal, citosólico e transmembrânico. O domínio luminal é formado por uma região contendo peptídeo sinal com vinte e dois aminoácidos, seguido por uma região N- terminal com um domínio altamente conservado (hcd), um domínio transmembrana e por fim uma pequena região citosólica com quarenta e oito aminoácidos na porção C-terminal da proteína (GUÉRIN et al., 2008). A identificação destas proteínas integrais de membrana no extrato protéico de *Paracoccidioides* sp. pode sugerir uma forma de associação com a membrana do retículo endoplasmático deste fungo.

Outra proteína identificada na fração de membranas de *Paracoccidioides* sp. foi a ATP sintase FOF1. Em *S. cerevisiae* uma proteína homóloga foi descrita na membrana da mitocôndria sendo constituída por uma parte catalítica (F1) e uma porção membranosa (FO)

(THOMAS et al., 2008). As proteínas proibitina 1 e 2 foram também identificadas no proteoma da fração de membranas de *Paracoccidioides* sp.. O complexo das proibitinas compreende uma família de proteínas altamente conservada executando funções durante o ciclo celular e apoptose. Na levedura *Saccharomyces. cerevisiae* o complexo das proibitinas Phb1p e Phb2p associa-se à membrana interna da mitocôndria, dando origem a uma estrutura que adota a forma de um círculo sugerindo um possível papel destas proteínas na morfologia da mitocôndria (TATSUTA et al., 2005). A proteína peroxina foi identificada na fração de membranas de *Paracoccidioides* sp. Em *Penicillium chrysogenum* a proteína peroxina Pec14/17p foi descrita como localizada na membrana do peroxissoma (OPALINSKI et al., 2010). A presença destas proteínas na fração de membranas de *Paracoccidioides* sp. sugere um extrato enriquecido com proteínas de diferentes membranas.

Algumas proteínas identificadas na fração de membranas de *Paracoccidioides* sp. como citocromo b5 reductase, NADH ubiquinone oxidoreductase, citocromo bc1 não demonstraram nenhum tipo de associação com as membranas celulares, através das análises em bancos de dados. As formas clássicas de associação das proteínas na bicamada lipídica ocorrem através, de domínio transmembrana, modificação pós traducional ou por interações eletrostáticas. Entretanto, outra forma de associação das proteínas com as membranas ocorre por meio de interação entre as proteínas com proteínas localizadas na bicamada. Este tipo de interação ocorre com proteínas da cadeia respiratória localizadas na membrana interna da mitocôndria (SANTONI et al., 2000). Desta forma, mesmo estas proteínas citadas acima que não demostraram nenhuma forma clássica de associação com a bicamada, podem ser consideradas como proteínas pertencentes a membranas celulares.

Análises comparativas entre as proteínas preditas como integrais de membranas, no genoma do fungo, e os dados contidos no proteoma, revelaram que a maioria das proteínas integrais identificadas no proteoma de *Paracoccidioides* sp. foram descritas no genoma. Entretanto, uma pequena porção de proteínas integrais de membrana identificadas no proteoma não foi descrita no genoma. Desta forma esta informação pode agregar mais dados ao genoma deste fungo sobre as proteínas integrais de membrana.

Em relação à quantidade de genes contidos no genoma que codificam proteínas integrais de membrana comparada aos dados obtidos no proteoma, pode-se sugerir que nem todos os genes são transcritos/traduzidos em proteínas, ou que a condição de estudo deste

trabalho não permite a identificação de proteínas de membranas expressas em determinadas condições. Esta hipótese foi confirmada por Molley e colaboradores (2000). Empregando o método de carbonato de sódio em pH 11 na condição inicial de estudo, os autores não conseguiram identificar receptores de ferro nas células de *Escherichia coli*. Entretanto, quando estas células foram submetidas à privação de ferro, os receptores foram detectados, demonstrado que ausência destas proteínas na condição inicial de estudo não era devido à limitação da técnica e sim à baixa expressão das proteínas dificultando sua detecção.

Como demonstrado, o protocolo de extração utilizado neste trabalho resultou em um enriquecimento de proteínas associadas a diferentes membranas celulares de *Paracoccidioides* sp.. Muitas das proteínas identificadas já foram descritas em subproteomas de membrana em outros organismos, demonstrando que o método utilizado foi eficiente. Contudo, para identificação de proteínas de membranas celulares específicas outros métodos como gradiente de sacarose e particionamento de duas fases aquosas (HOPPY et al., 2013) podem ser empregados.

Conclusão

2. CONCLUSÃO

Diferentes metodologias experimentais foram empregadas a fim de se determinar o melhor protocolo para obtenção de proteínas de membrana de *Paracoccidioides* sp.. Após as etapas de definição da metodologia e obtenção do extrato protéico, análises do perfil proteômico referente à fração de membranas de *Paracoccidioides* sp. foram realizadas. Do total de proteínas identificadas na fração de membrana, cento e quarenta e quatro foram classificadas como proteínas pertencentes a membranas celulares e categorizadas em diferentes classes funcionais. Os processos celulares executados pelas proteínas identificadas na fração de membranas incluem transporte celular, sinalização celular, ciclo celular e processamento de DNA, destino celular, diferenciação celular, metabolismo, destino da proteína (modificação, dobramento e endereçamento) entre outras classes funcionais. A presença de domínios transmembrana e modificações pós traducionais demonstram diferentes formas de associações das proteínas com as membranas de *Paracoccidioides* sp.. A descrição das proteínas identificadas na fração de membrana corrobora com os dados descritos na literatura sobre a constituição protéica das membranas celulares. Portanto, a análise do perfil proteômico da fração de membranas de *Paracoccidioides* sp. permite agregar informação aos dados já obtidos para proteínas citoplasmáticas neste fungo, e favorecer o estudo desta classe de proteínas em *Paracoccidioides* spp..

Perspectivas

3. PERSPECTIVAS

● *Western blot* com anticorpos específicos para marcadores de membranas: Pma1p, Calnexina, Proibitina;

● Confirmação da presença das proteínas descritas acima no extrato de membranas, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas;

● Imunoflourescência;

● Estudos com proteínas de membranas usando este protocolo, em condições de privação de metal;

● Estudo das subfrações de membranas.

Referências

4. REFERÊNCIAS

ALBERTS B, **Molecular Biology of the Cell,** New York: Garland Publishing, Inc, 1994.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. I.; ALQUATI, S,; MIYAJI, M.; de CAMARGO, Z. P.; GOMES, G. M.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** São Paulo,v.58, p.505–512, 1998.

BAGAGLI, E.; BOSCO, S.M.; THEODORO, R.C.; FRANCO, M.; Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, São Paulo, v.6, p. 344-351, 2006.

BAGAGLI, E.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M. G.; MCEWEN, J. G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, São Paulo, v.165, p.197–207, 2008.

BASTOS, K. P.; BAILÃO, A. M.; BORGES, C. L.; FARIA, F. P.; FELIPE, M. S. S.; SILVA, M. G.; MARTINS, W. S.; FIÚZA, R. B.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. A. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC Microbiology**, Goiania, v.7, p.1-14, 2007.

BOCCA A. L; AMARAL A.C; TEIXEIRA M. M; SATO P.K; SHIKANAI‑YASUDA M.P; FELIPE M. S. S. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiol.** Brasília, n.8, p. 1177–1191, 2013.

BOLSINGER, S. S.; SCHEINOST, A. Transmembrane Topology of Pmt1p, a Member of an Evolutionarily Conserved family of protein O-Manosyltransferases. **J. Biol. Chem**, Regensburg, v. 274, p.9068-9075, 1999.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomicose: an update. **Clin Microbiol Ver**, California, v.6, p. 89-117, 1993.

CARRERO, L. L.; NIÑO-VEJA, G.; TEIXEIRA, M. M.; CARVALHO, M. J. A.; SOARES, C. M. A., PEREIRA, M.; JESUINO, R. S. A.; MCEWEN, J. G., MENDOZA, L.; TAYLOR, J. W.; FELIPE, M. S.; SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genetics and Biology**, Caracas v.45, p.605–612, 2008.

CASEY, P. J.; SEABRA, M. Protein Prenyltransferases. **The journal of biological chemistry**, North Carolina, v. 271, p.5289- 5292, 1996.

CATAÑO, J. C.; AGUIRRE, H. D. Images in Clinical Tropical Medicine, Disseminated Paracoccidioidomycosis, **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 88, p.407 – 408, 2013.

COLICELLI, J. Human RAS Superfamily Proteins and Related GTPases. **Sci STKE**, p.1- 53, 2004

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, BODO. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995), **Cad. Saúde Pública**, v.15, 1441-1454, 2002.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R, P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. S. Paracoccidioidomycosis: A recently proposed classification of its clinical forms. Revista da sociedade brasileira de medicina tropical, v. 20, p. 129-132, 1987.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C. S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil, **Med Mycol**. São Paulo, v.38, p.185-91, 2000.

FERGUSON, M. A.; HOMANS, S. W.; DWEK, R. A.; RADEMACHER, T. W. Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. **Science**, Oxford, v.239, p.753–759, 1988.

FONTAINE, T.; MAGNIN, T.; MELHERT, A.; LAMONT. D.; LATGÉ, J. P.; FERGUSON, M. A. J. Structures of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Aspergillus fumigatus* membrane protein. **Glycobiology**, Paris, v.3, p.169-177, 2003.

FUJIKI, Y.; HUBBARD, A. L.; FOWLER, S.; LAZAROW, P. B. Isolation of Intracellular Membranes by Means of Sodium Carbonate Treatment: Application to Endoplasm is Reticulum. **THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY**, Maryland, v. 93, p. 97-102, 1982.

FUJITA, M.; KINOSHITA, T. (a). Structural remodeling of GPI anchors during biosynthesis and after attachment to proteins. **FEBS Letters**, Osaka, v.584, p.1670–1677, 2010.

FUJITA, M.; KINOSHITA, T. (b). GPI-anchor remodeling: Potential functions of GPI-anchors in intracellular trafficking and membrane dynamics. **Biochim Biophys Acta**, v.1821, p.1050–1058, 2012.

GESSLBAUER, B.; POLJAK, A.; HANDWERKER, C.; SCHULER, W.; SCHWENDENWEIN, D.; WEBER, C.; LUNDBERG, U.; MEINKE, A.; KUNGL, A. J. Comparative membrane proteome analysis of three *Borrelia* species, **Proteomics**, Austria, v. 12, p. 845–858, 2012.

GILMORE, J. S.; WASHBURN, M. P. Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes. **Journal of proteomics**, Kansas City, v.73, p.2078-2091, 2010.

GIRRBACH, V.; ZELLER, T.; ZELLER, M.; STRAHL-BOLSINGER, S. Structure-Function Analysis of the Dolichyl Phosphate-Mannose:Protein O-Mannosyltransferase ScPmt1p. **The Journal of Biological Chemistry**, Regensburg, v. 275, p. 19288–19296, 2000.

GUÉRIN, R.; ARSENEAULT, G.; DUMONT, S.; ROKEACH, L. A. Calnexin Is Involved in Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress in the Fission Yeast. **Molecular Biology of the Cell**, Montréal, v.19, p. 4404–4420, 2008.

GRAVES, J.; CHAMBERLAIN, L. H. Palmitoylation-dependent protein sorting. **J Cell Biol**, Glasgow, v.176, p.249–254, 2007.

HAMADA, K.; TERASHIMA, H.; ARISAWA, M.; KITADA, K. Amino acid sequence requeriment for efficient incorporation of glicosylphosphatidylinositol-associated protein into cell wall of *Sccharomyces cerevisiae*.**J Bol Chem**, Kanagawa, v.273, p.26946-53, 1998.

HOPFF, D.; WIENKOOP, S.; LUTHJE, S. The plasma membrane proteome of maize roots grown under low and high iron conditions. **Journal of proteomics**, Hamburg, v.20, p. 1-14, 2013.

JAGANNADHAM, M. V.; SARANYA, S.. Analysis of the Membrane proteins of an Antarctic Bacterium *Pseudomonas Syringae*. **Proteomics Insights**, India, v.4, p.13–19, 2011.

KANAPIN, A.; BATALOV, S.; DAVIS, M. J.; GOUGH, J.; GRIMMOND, S.; KAWAJI, H.; MAGRANE, M.; MATSUDA, H.; SCHONBACH, C.; TEASDALE, R.; YUAN, Z. Mouse Proteome Analysis. **Genome Research**, Hinxton, v.13, p. 1335:1344, 2003.

LEE, S. C.; SHAW, B. D. Localization and function of ADP ribosylation factor A in *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiol Lett**, Texas, v. 283, p. 216–222, 2008.

LIU, Y. W.; HUANG, C. F.; HUANG, K. B.; LEE, F. J. S. Role for Gcs1p in Regulation of Arl1p at Trans-Golgi Compartments. **Molecular Biology of the Cell**, Taiwan, v.16, p. 4024–4033, 2005.

MALINSKY, J.; OPEKAROVA, M.; GROSSMANN, G.; TANNER. W. Membrane Microdomains, Rafts, and Detergent-Resistant Membranes in Plants and Fungi, **Annu. Rev. Plant**, Czech Republic, v. 64, p.501–29, 2013.

MATUTE, D. R.; MCEWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NINO-VEJA, G.; TAYLOR, J. W. Cryptic Speciation and Recombination in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as Revealed by Gene Genealogies. **Mol. Biol. Evol**, Medellín, v. 23, p.65–73, 2006.

MARMAGNE, A.; FERRO, M.; MEINNEL, T.; BRULEY, C.; KUHN, L.; GARIN, J.; BRYGOO, H. B.; EPHRITIKHINE, G.. A High Content in Lipid-modified Peripheral Proteins and Integral Receptor Kinases Features in the Arabidopsis Plasma Membrane Proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, France, v.6, p. 1980-1996, 2007.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **An Bras Dermatol**, São Paulo, v.88, p.700-711, 2013.

MARTINEZ, L. R.; PARDO, J. P.; MIRANDA, M.; MENDEZ, T. V.; ORTEGA, M. G. M.; HERNÁNDEZ, G. M.; SÁNCHEZ, G. G. The basidiomycete *Ustilago maydis* has two plasma membrane H+ ATPases related to fungi and plants. **J Bioenerg Biomembr**, México, v.10, p. 1-14, 2013.

MARRIOTT, M.; TANNER, W. Localization of dolichyl phosphate- and pyrophosphate-dependent glycosyl transfer reactions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal de bacteriology**, Regensburg, v.139, p.565-572, 1979.

MAULÉON, V. P.; LEFEBVRE, F.; THORAVAL, T.; CROUZET, M.; DOIGNON, F. Phosphoinositides Affect both the Cellular Distribution and Activity of the F-BAR-containing RhoGAP Rgd1p in Yeast **J. Biol. Chem**, Bordeaux, v. 283, p.33249-33257, 2008.

MBEUNKUI, F.; GOSHE, M. Investigation of solubilization and digestion methods for microsomal membrane proteome analysis using data-independent LC-MS^{E} . **Proteomics**, North Carolina, v.11, p.898–911, 2011.

MOREJÓN, K. M. L; MACHADO A. A. MARTINEZ R. Paracoccidioidomycosis in Patients Infected with and Not Infected with Human Immunodeficiency Virus: A Case-Control Study. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, Ribeirão Preto, n. 80, p 359–366, 2009.

MOORES, S. L.; SCHABER, M. D.; MOSSE, S. S.; MONICA, E. R.; O'HARA, M. B.; GARSKY, V. M.; MARSHALL, M. S.; POMPLIANO, D. L.; GIBBS, B. Sequence Dependence of Protein Isoprenylation, **The journal of biological chemistry**, Pennsylvania, v.266, p.14603-1461, 1991.

MOLLOY, M. P.; HERBERT, B. R.; SLADE, M. B.; RABILLOUD, T.; NOUWENS, A. S.; WILLIAMS, K. L.; GOOLEY, A. A. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane, **Eur. J. Biochem**, Michigan, v. 267, p. 2871-2881, 2000.

MUÑIZ M, MORSOMME P, RIEZMAN H. Protein Sorting upon Exit from the Endoplasmic Reticulum, **Cell**, Switzerland, v.104, p.313-320, 2001.

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

NELSON, DAVID L; COX, MICHAEL M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 5 ed., Porto Alegre, 2011. 373 p.

NICOLSON, G. L. The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years, **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1-16, 2013.

OPALINSKI, L.; KIEL, J. A. K. W.; HOMAN, T. G.; VEENHUIS, M.; KLEI, I. J. D. *Penicillium chrysogenum* Pex14⁄17p – a novel component of the peroxisomal membrane that is important for penicillin production. **FEBS Journal**, Groningen, v.277, p.3203–3218, 2010.

QUEIROZ-TELLES F, 1994. *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural Wndings. Paracoccidioidomycosis. Franco, M. Lacaz, C.S., Restrepo-Moreno, A. and Del Negro, G, London, **CRC Press**, p.27-44.

RESH, M. D. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. **Biochim Biophys Acta**, New York, v.1451, p.1-16, 1999.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens Inhibit Mycelium-to-Yeast Transformation in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for Resistance of Females to

Paracoccidioidomycosis. **INFECTION AND IMMUNITY**, Colombia, v.46, p. 346-353, 1984.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, Medellin, v.23, p.323-334, 1985.

RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis. **Clinical Mycology.** W E, Dismukes PG, Pappas J, Sobel, New York, Oxford University Press, p. 328–345, 2003.

RICHARD, M. L.; PLAINE, A. Comprehensive Analysis of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in *Candida albicans*. **EUKARYOTIC CELL,** Thiverval-Grignon, v.6, p. 119-133, 2007.

RICCI, G.; MOTA, F. T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R.C.; BORRA, R.C.; FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis, **Med Mycol**, São Paulo, v.42, p. 379-83, 2004.

RICHINI-PEREIRA; V. B.; BOSCO, Sde, M.; GRIESE, J.; THEODORO, R.C.; MACORIS, S.A.; daSILVA, R.J.; BARROZO, L.; TAVARES, P. M.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Med Mycol**, Botucatu, v. 46, p.35-40, 2008. RUCEVIC, M.; HIXSON, D.; JOSIC, D. Mammalian plasma membrane proteins as potential biomarkers and drug targets. **Electrophoresis**, Island, v. 32, p. 1549-1564, 2011.

RUCEVIC, M.; HIXSON, D.; JOSIC, D. Mammalian plasma membrane proteins as potential biomarkers and drug targets. **Electrophoresis**, Island, v. 32, p. 1549-1564, 2011.

SANTONI, V.; MOLLOY, M.; RABILOUD, T. Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? **Electrophoresis**, France, v. 21, p.1054-1070, 2000.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, California, v.175, p.720-731, 1972.

SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes, **Nature**, v. 387, p. 569-572, 1997.

SILVA, M. G.; SCHRANK, A.; BAILÃO, E. F. L. C.; BAILÃO, A. M.; BORGES, C. L.; CHARLEY, C. S.; PARENTE, A. J.; PEREIRA, M.; IZAAC, S. M. S.; GIANNINI, M. S. J. S.; OLIVEIRA, Z. M. R.; SILVA, R. K. L.; NOSANCHUK, D. J.; VAINSTEIN, H. M.; SOARES, A. M. C. The homeostasis of iron, copper and zinc in Paracoccidioides brasiliensis, Cryptococcus neoformans var. grubii, and Cryptococcus gattii: a comparative analysis. **FrontiersMicrobiol**, Goiania, *v.2*, p.1-19, 2011

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; FILHO, F. Q. T.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Guideliness in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.39, p.297-310, 2006.

SPEERS, A. E.; WU, C. C. Proteomics of Integral Membrane Proteins Theory and Application, **Chem Rev**, Colorado, v.107, p.3687−3714, 2007.

STROH, S, M.; GOUDA, M.; NOVATCHKOVA, M.; SCHLEIFFER, A.; SCHNEIDER, G.; SIROTA, F. L.; WILDPANER, M.; HAYASHI, N.; EISENHABER, F. Analysis of genome-

wide glycine myristoylation enlarges the functional spectrum of eukaryotic myristoylated **Genome Biology**, Vienna,v.5,p.1-16, 2004.

SZOPINSKA, A.; DEGAND, H.; HOCHSTENBACH, J. F.; NADER, J. MORSOMME, P. Rapid response of the yeast plasma membrane proteome to salt stress. **Mol Cell Proteomics**, Belgium, p. 1-15, 2011.

TAN, S.; TAN, H. T.; CHUNG, M. C. M. Membrane proteins and membrane proteomics. **Proteomics**, Singapore, v.8, p.3924–3932, 2008.

TATSUTA, T.; MODEL, K.; LANGER, T. Formation of Membrane-bound Ring Complexes by Prohibitins in Mitochondria. **Molecular Biology of the Cell**, Germany, v.16, p. 248–259, 2005.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; CARVALHO, M. J. A.; FERNANDES, L.; PAES, H. C.; HAHN, R. C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. Phylogenetic analisys reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Brasília, v.52, p. 273-283, 2009.

TIEDE, A.; BASTICH, I.; SCHUBERT, J.; ORLEAN, P.; SCHMIDT, R. E. Byosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. **Bio chem**, Hannover, v.380, p.503-523, 1999.

THOMAS, D.; BRON, P.; WEIMANN, T.; DAUTANT, A.; GIRAUD, M. F.; PAUMARD, P.; SALIN, B.; CAVALIER, A.; VELOURS, J.; BRETHES, D. Supramolecular organization of the yeast F1 F0 -ATP synthase. **Biol. Cell**. Botucatu, v.100 p.591–601, 2008.

UNTEREINER, W. A.; SCOTT, J. A.; NAVEAU, F. A.; SIGLER, L.; BACHEWICH, J.; ANGUS, A.; The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, Canada, pg. 812–821, 2004

VALLEJO, M. C.; NAKAYASU, E. S.; LONGO, L. V. G.; GANIKO, L.; LOPES, F. G.; MATSUO, A. L.; ALMEIDA, I. C.; PUCCIA, R.; Lipidomic Analysis of Extracellular Vesicles from the Pathogenic Phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Plos One*. São Paulo, v.7, p.1-10, 2012.

VALKONEN, M.; KALKMAN, E. R.; SALOHEIMO, M.; PENTTILA, M.; READ, N. D.; DUNCAN, R. R.; Spatially segregated SNARE protein interations in living fungal cells. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, Finland, v. 282, p.22775-22785, 2007.

VAN, D. P.; BIERENBROODSPOT, F.; TELGTT, D. S.; KWAKMAN, J. M.; de WILDE, P. C.; MEIS, J. F. A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in The Netherlands. **Med Mycol**, Nijmegen, v. 44, p.13-8, 2006.

VIDAKOVICS, M. L. P.; PABA, J.; LAMBERTI, Y.; RICART, C. A.; SOUSA, M. V.; RODRIGUEZ, M. E. Profiling the *Bordetella pertussis* Proteome during Iron Starvation. **Journal of Proteome Research**, La Plata, v. 6, p. 2518-2528, 2006.

YADETA, K. A.; ELMORE, J. M.; COAKER. G. Advancements in the analysis of the Arabidopsis plasma membrane proteome. **Frontier in plant science**, California, v.4, p.1-9, 2013.

WALLIN, E.; HEIJNE, G. V. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. **Protein Science**, Stockholm, v. 7, p.1029-1038, 1998.

WALMSLEY, M. I. B.; CHEN, D.; CHEN, X.; WALMSLEY, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **TRENDS in Microbiology**, Glasgow**,** v. 10, p. 81-87, 2002.

WALKER, M. W.; BOBAK, D. A.; TSAI, S. C.; MOSS, J.; VAUGHAN, M. GTP but Not GDP Analogues Promote Association of ADP-ribosylation Factors, 20-kDa Protein Activators of Cholera Toxin, with Phospholipids and PC- 12 Cell Membranes, **J Biol Chem**, Bethesda, v. 267, p.3230-3235, 1992.

WANKE, B.; AIDÊ, M. A. Chapter 6 – Paracoccidioidomycosis. **J Bras Pneumol**, Niterói, v.35, p. 1245-1249, 2009.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology, **nature biotechnology**, San Diego, v. 19, p. 242-247, 2001.

WU, C. C.; MACCOSS, M. J.; HOWELL, K. E.; YATES, J.R. A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins . **nature biotechnology.** Colorado, v.21, p.532- 538, 2003.

ZANG, M. M.; WU, P. Y. J.; KELLY, F. D.; NURSE, P.; HANG, C. H. Quantitative Control of Protein S –Palmitoylation Regulates Meiotic Entry in Fission Yeast. **PLoS Biol**, New York, v.11, p. 1-11, 2013.

PRODUÇÕES CIENTIFÍCA DURANTE O MESTRADO

Trabalhos apresentados em eventos

1º de CURCIO, J.S.; SILVA, M.G.; BAILÃO, M.G.S.; Báo, S. N.; CASALETTI, L.; BAILÃO, A.M.; SOARES, C.M.A. **Analysis of membrane proteins from *Paracoccidioides*.** 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Natal-Rio Grande do Norte. 2013.

2º de CURCIO, J.S.; SILVA, M.G.; BAILÃO, M.G.S.; Báo, S. N.; CASALETTI, L.; BAILÃO, A.M.; SOARES, C.M.A. **IDENTIFICATION OF MEMBRANE PROTEINS FROM THE HUMAN PATHOGENIC FUNGUS *Paracoccidioides***. XI Seminário de Patologia Tropical e Saúde Pública IV Semana da Patologia. Goiânia-Go, 2013.

3º de CURCIO, J.S.; SILVA, M.G.; BAILÃO, M.G.S.; Báo, S. N.; CASALETTI, L.; BAILÃO, A.M.; SOARES, C.M.A. **PROTEÍNAS DE MEMBRANA DO FUNGO PATOGÊNICO DO GÊNERO *Paracoccidioides***. X Seminário de Pós-Graduação da UFG. Goiânia-Go, 2013.

4º SILVA, M.G.; de CURCIO, J.S.; BAILÃO, M.G.S.; Báo, S. N.; CASALETTI, L.; BAILÃO, A.M.; SOARES, C.M.A. Proteomic analysis of *Paracoccidioides* membrane during zinc deprivation. Seminário de Patologia Tropical e Saúde Pública IV Semana da Patologia. Goiânia-Go, 2013.

Manuscrito em preparação

Analysis of the proteins contained in the membrane fractions of the pathogenic fungus *Paracoccidioides* sp.