RAFAEL PEDEZZI

Prospecção de Enzimas no Fungo *Purpureocillium lilacinum* Utilizando as Técnicas de Proteoma: Produção Recombinante de Enzimas com Potencial Biotecnológico e Avaliação de Antifúngicos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pedezzi, Rafael

Prospecção de Enzimas no Fungo *Purpureocillium lilacinum* Utilizando as Técnicas de Proteoma: Produção Recombinante de Enzimas com Potencial Biotecnológico e Avaliação de Antifúngicos. / Rafael Pedezzi - 2019. 115 p. 40 il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Cabral, Hamilton.

1. *Purpureocillium lilacinum*. 2. Resistência a antifúngicos. 3. Peptidases fúngicas. 4. Expressão recombinante 5. Transcriptoma

Nome: Rafael Pedezzi

Título: Prospecção de Enzimas no Fungo *Purpureocillium lilacinum* Utilizando as Técnicas de Proteoma: Produção Recombinante de Enzimas com Potencial Biotecnológico e Avaliação de Antifúngicos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico este trabalho à minha família: esposa, mãe, pai e irmã. Toda a minha vida é e será dedicada à demonstração de amor que tenho por todos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas bênçãos alcançadas e por ter iluminado meu caminho e minhas decisões.

À minha amada esposa, Bruna, por todo o amor dado através do companheirismo, cuidado e atenção. Essa é a base forte para o meu desenvolvimento pessoal e profissional

Aos meus pais, Joyce e Luiz e minha irmã Camila por todos os ensinamentos, dados pelos exemplos.

Ao meu orientador, Hamilton Cabral, por toda sua generosidade e companheirismo. Mais do que um doutor, o Prof. Hamilton me ajudou a me tornar um homem melhor.

Aos meus companheiros de laboratório, Nathália Garzon, Youssef Neto, Flavio Simões, Julia Martins, Luciana Coitinho, Ana Siqueira, Juliana, Ronivaldo e Tatiane. Todo o companheirismo e ajuda foram essenciais ao bom desenvolvimento do trabalho

Aos meus colegas do Laboratório de Bioinformática (Bit), Raul Torrieri, Ricardo Nociti, Erico Torrieri, Carlos Biagi, Marcelo Gomes, Jéssica PLaça e Josane pelo grande apoio na minha iniciação à bioinformática. Obrigado pela amizade.

Aos pesquisadores que colaboraram com este trabalho: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior, Kamila Chagas Peroni, Prof. Dr. José Cesar Rosa, Prof. Dr. Igor Polikarpov e Dr. Danilo Elton Evangelista. A colaboração de todos foi essencial para o correto desenvolvimento do projeto

Aos meus amigos de longa data por sempre me incentivarem a crescer como profissional e ser humano.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa concedida, processo 142369/2015-2

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa concedida, processo 2015/16084-4

Seja a mudança que você quer ver no mundo.

(Mahatma Gandhi)

Resumo

PEDEZZI, Rafael. **Prospecção de Enzimas no Fungo *Purpureocillium lilacinum* Utilizando as Técnicas de Proteoma: Produção Recombinante de Enzimas com Potencial Biotecnológico e Avaliação de Antifúngicos**2019. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, RibeirãoPreto, 2019.

O fungo ascomiceto *Purpureocillium lilacinum* pode ser encontrado em solo, vegetação em decomposição, insetos, nematoides e outros locais. Apresenta grande importância agrícola, visto que pode ser utilizado como controle biológico por ser capaz de infectar e matar nematoides pragas de culturas, graças às suas enzimas, como peptidases e quitinases. Além disso, o fungo apresenta importância médica, pois é capaz de gerar infecção em humanos. A terapêutica das doenças infecciosas causadas por *P. lilacinum* é dificultada pelo fato de ele apresentar resistência a antifúngicos “azólicos”, principais moléculas aplicadas na clínica médica atualmente. O presente trabalho teve como objetivo explorar molecularmente o fungo *P. lilacinum* com relação à sua capacidade de resistir a antifúngicos e à sua capacidade de produzir peptidases robustas, com potencial de aplicação biotecnológica. Ferramentas moleculares como transcriptômica e proteômica foram aplicadas para acessar os dados moleculares do fungo e viabilizar análises de expressão diferencial para verificar as respostas aos antifúngicos fluconazol e itraconazol e anotação gênica para prospecção de peptidases. Foi observado que *P. lilacinum* promove um aumento de expressão dos genes alvo dos antifúngicos e dos genes que codificam bombas de efluxo. Com esse mecanismo, não há acúmulo de antifúngico intracelular e há compensação numérica da enzima que está sendo inibida pelo antifúngico com mais expressão da mesma. Dessa forma, o fungo consegue manter a síntese de ergosterol normalizada. As enzimas prospectadas e expressas de maneira recombinante em *Pichia pastoris* foram uma serino peptidase (r*Pl*_SerPep) e uma metalo peptidase (r*Pl*_MetPep). A r*Pl*_SerPep se mostrou alcalina, com temperatura ótima aparente de 60 °C e termoestável. Já a r*Pl*_MetPep se mostrou ativa em pH neutro e com temperatura ótima aparente de 40 °C. Essas enzimas se mostraram promissoras para futuros testes de aplicação biotecnológica.

Palavras chave *Purpureocillium lilacinum*, Resistência a antifúngicos, Peptidases fúngicas, Expressão recombinante, Transcriptoma

Abstract

PEDEZZI, Rafael. **Prospecting of Enzymes in *Purpureocillium lilacinum* Using Proteomic Technique: Recombinant Production of Enzymes with Biotechnological Potential and Evaluation of Antifungals** 2019. 115 f. Thesis (Doctoral in Sciences) – Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto, University of São Paulo, Ribeirao Preto, 2019.

The ascomicota fungus *Purpureocillium lilacinum* can be found in soil, decaying vegetation, insects, nematodes and other places. It has great agricultural importance, since it can be used as biological control by being able to infect and kill nematode crop pests, thanks to its enzymes such as peptidases and chitinases. In addition, the fungus is of medical importance because it can generate infection in humans. The treatment of infectious diseases caused by *P. lilacinum* is hampered by the fact that it is resistant to "azolic" antifungals, the main molecules applied in medical practice today. The present work aimed to molecularly explore the fungus *P. lilacinum* in relation to its ability to resist antifungal and its ability to produce robust peptidases with potential for biotechnological application. Molecular tools such as transcriptomics and proteomics were applied to access the molecular data of the fungus and enable differential expression analyzes to verify the responses to the antifungal fluconazole and itraconazole and gene annotation to prospect for peptidases. It has been observed that *P. lilacinum* promotes an increase in expression of antifungal target genes and genes encoding efflux pumps. With this mechanism, there is no accumulation of intracellular antifungal and there is numerical compensation of the enzyme that is being inhibited by the antifungus with more expression of the same. In this way, the fungus can maintain standard ergosterol synthesis. The serine peptidases prospected were recombinantly expressed in *Pichia pastoris*. There were a serine peptidase (r*Pl*_SerPep) and a metal peptidase (r*Pl*_MetPep). The r*Pl*_SerPep was alkaline, with an apparent optimum temperature of 60 ° C and showed thermostable characteristics. The r*Pl*_MetPep was neutral and with an apparent optimum temperature of 40 ° C. These enzymes have proven to be promising for future biotech application tests.

Keywords: *Purpureocillium lilacinum*, antifungal resistance, fungal peptidases, recombinant expression, transcriptome

Lista de figuras

Figura 1: Cultivo de *P. lilacinum* em placas de Petri. 1
Figura 2: Teste de esporulação. 23
Figura 3: Acompanhamento da massa seca de *P. lilacinum* 24
Figura 4 Análise do padrão de expressão entre os tratamentos:..... 25
Figura 5 Extração de RNA total de *P. lilacinum*. 27
Figura 6: Representação gráfica da qualidade dos RNAs...... 28
Figura 7: Representação gráfica da distribuição de tamanhos de cDNA em cada amostra..... 29
Figura 8: Gráfico de qualidade das sequências por base sequenciada 30
Figura 9: Gráfico PCA...... 31
Figura 10: Visão geral da expressão gênica...... 33
Figura 11: Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos. 34
Figura 12: Análise de *Gene Onthology*. 36
Figura 13: Heatmaps dos genes relacionados com resistência a antifúngicos.... 39
Figura 14: Análises de RT-qPCR. 41
Figura 15: Diagrama de Venn dos dados proteômicos 47
Figura 16: Mapa e região de múltipla clonagem do vetor pPICZα-A. 66
Figura 17: Gel SDS-PAGE 12 % corado com nitrato de prata:..... 74
Figura 18: Panorama de peptidases produzidas por *P. lilacinum*. 77
Figura 19: Sequência de aminoácidos e domínios conservados da serino peptidase: 78
Figura 20: Domínios conservados da metalo peptidase:..... 79
Figura 21: Caracterização do gene *Pl*_SerPep e sua tradução *in silico*...... 80
Figura 22: Colônias de *P. pastoris* transformadas com pPICZα-*Pl*_SerPep...... 81
Figura 23: *Screening* de colônias produtoras da r*Pl*_SerPep...... 82
Figura 24: Curva de expressão da colônia 11. 83
Figura 25: Curva cromatográfica da r*Pl*_SerPep...... 84
Figura 26: Teste de pureza da r*Pl*_SerPep...... 84
Figura 27: Curva de pH...... 86

Figura 28: Curva de temperatura. 87
Figura 29: Curva de estabilidade ao pH.. 91
Figura 30: Curva de estabilidade à temperatura. 92
Figura 31: Representações gráficas dos resultados de SAXS. 94
Figura 32: Representação espacial do modelo gerado por SAXS..... 95
Figura 33: Caracterização do gene *Pl*_MetPep e sua tradução *in silico*.. 97
Figura 34: Colônias de *P. pastoris* transformadas com pPICZα-*Pl*_MetPep. 98
Figura 35: *Screening* de colônias produtoras da r*Pl*_MetPep. 99
Figura 36: Curva de expressão da colônia 12. 100
Figura 37: Curva cromatográfica da r*Pl*_MetPep.. 101
Figura 38: Teste de pureza da r*Pl*_MetPep. 101
Figura 39: Curva de pH...... 102
Figura 40: Curva de temperatura...... 103

Lista de tabelas

Tabela 1: Meios de cultivo testados para indução de esporulação em *P. lilacinum*..... 12
Tabela 2: Sequência dos primers utilizados nos experimentos de qRT-PCR..... 20
Tabela 3: valores de expressão do gene VFPFJ_03164 em cada amostra..... 40
Tabela 4: Tabela Proteoma:..... 44
Tabela 5: Teste de interferência de íons..... 88
Tabela 6: Influência de surfactantes. 89
Tabela 7: Influência de agentes caotrópicos..... 90
Tabela 8: Dados de SAXS sumarizados..... 93

Lista de abreviaturas e siglas

CYP51	Citocromo P450 51
MFS	major facilitator superfamily transporter
PDA	Potatoe Dextrose Agar
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
FLC64	Traramento com fluconazol a 64 µ/mL
ITR16	Tratamento com itraconazol a 16 µ/mL
UAA	Unidades Arbitrárias de Absorbância
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
DMSO	Dimetilsulfóxido
PA	Para Análise
SDS	Dodecil sulfato de Sódio
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa a partir de produto de Transcrição Reversa
.BAM	Extensão binária de um arquivo de alinhamento
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
ACN	Acetonitrila
PCA	Análise do Componente Principa
TPM	Transcritos Por Milhão
MDR	MultiDrug Resistant
ABC	Família de transportadores de membrana
r*Pl*_SerPep	Serino Peptidase de *P. lilacinum* recombinante
r*Pl*_MetPep	Metalo Peptidase de *P. lilacinum* recombinante
EB	Extrato Bruto
EBC	Extrato Bruto Concentrado
TFA	Ácido trifluoroacético
ORF	Open Read Frame

AOX1	Gene da álcool oxidase 1
AOX2	Gene da ácool oxidase 2
His	Histidina
pPICZα-A	Plasmídeo de expressão em *Pichia pastoris*
TGA	Códon de terminação da tradução
YPD	Yeast Peptone Dextrose
YPDS	Yeast Peptone Dextrose Sorbitol
BMGY	Buffered Medium Glycerol Yeast
BMMY	Buffered Medium Methanol Yeast
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
DTT	ditiotreitol
SAXS	Small Angle X-ray Scattering
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
FRET	peptídicos sintéticos com supressão intramolecular de fluorescência
mAU	Mili Absorbance Unit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PFAM	Protein Family Database
DSD-PAGE	Eletroforese em Gel de Poli Acrilamida napresença de SDS

Lista de símbolos

α	Alfa
β	Beta
™	Trademark
®	Marca Registrada
μ	Micro
λ	Comprimento de onda
θ	Teta

Sumário

1. Introdução geral 1
2. Objetivos gerais 3
Capítulo 1: A Resistência a Antifúngicos 5
1. Introdução 10
2. Material e métodos 11
2.1. Isolamento e manutenção de *P. lilacinum* 11
2.2. Cultivo de *P. lilacinum* 11
2.2.1. Meio de esporulação 11
2.2.2. Condições gerais de cultivo com antifúngicos 13
2.2.3. Acompanhamento da biomassa 14
2.2.4. Perfil proteico ao longo do cultivo 15
2.3. Estudos transcriptômicos 15
2.3.1. Extração de RNA 16
2.3.2. Preparo das amostras e sequenciamento 17
2.3.3. Análises de bioinformática 18
2.3.4. qRT-PCR dos genes selecionados 19
2.4. Estudos proteômicos 20
2.4.1. Preparo das amostras 20
2.4.2. Espectrometria de massas 21
2.4.3. Análise dos resultados 21
3. Resultados e discussão 22
3.1. Teste de esporulação 22
3.2. Parâmetros dos cultivos com antifúngicos 23
3.3. Estudos transcriptômicos 26
3.3.1. RNA, cDNA e qualidade das amostras 26

3.3.2. Análises de bioinformática 29

3.3.3. qRT-PCR dos genes selecionados 41

3.4. Estudos proteômicos 43

4. Conclusões 49

Capítulo 2: *P. lilacinum* e suas peptidases 50

1. Introdução 56

2. Material e métodos 57

2.1. Estudo de peptidases nativas 57

2.1.1. Cultivo de *P. lilacinum* 58

2.1.2. Purificação de proteínas 58

2.1.3. Espectrometria de massas 60

2.2. Análise de transcriptoma 61

2.2.1. Montagem de transcriptoma *de novo* e seleção de genes para expressão heteróloga 61

2.3. O organismo *Pichia pastoris* e o plasmídeo pPICzα-A 63

2.4. Montagem do plasmídeo de expressão 64

2.5. Serino peptidase 66

2.5.1. Caracterização do gene 67

2.5.2. Transformação em *P. pastoris* 67

2.5.3. Bioprocesso de expressão recombinante 69

2.5.4. Purificação da serino peptidase 69

2.5.5. Caracterização bioquímica parcial 70

2.5.6. Estudos estruturais 71

2.6. Metalo peptidase 73

2.6.1. Caracterização bioquímica parcial 73

3. Resultados e discussão 74

3.1. Estudo de peptidases nativas 74

3.2. Análise de transcriptoma 76

3.2.1. Montagem de transcriptoma *de novo* 76

3.2.2. Seleção dos genes de duas peptidases 77

3.3. Serino peptidase 80

3.3.1. Caracterização do gene 80

3.3.2. Transformação em *Pichia pastoris* 81

3.3.3. Bioprocesso de expressão recombinante 81

3.3.4. Purificação da r*Pl*_SerPep 83

3.3.5. Caracterização bioquímica parcial 85

3.3.6. Estudos estruturais 93

3.4. Metalo peptidase 96

3.4.1. Caracterização do gene 96

3.4.2. Transformação em *Pichia pastoris* 98

3.4.3. Bioprocesso de expressão recombinante 98

3.4.4. Purificação da r*Pl*_MetPep 100

3.4.5. Caracterização bioquímica parcial 102

4. Conclusões 103

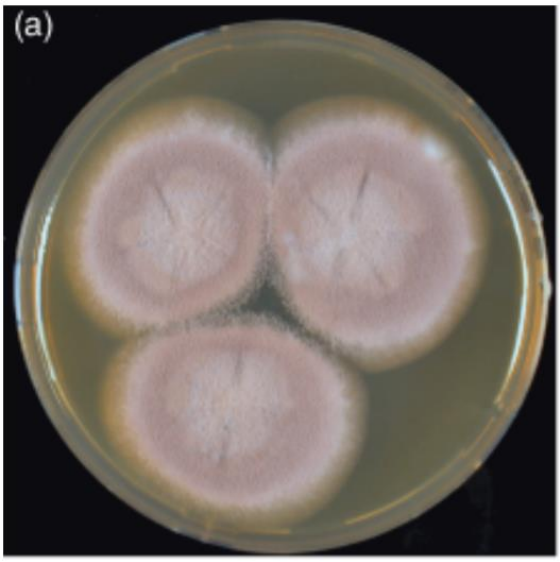
3. Discussão geral 105

4. Conclusão geral 106

1. Introdução geral

O fungo *Purpureocillium lilacinum* é um ascomiceto, está definido na classe dos Sordariomicetos, ordem Hypocreales e família dos Ophicordyciptaceos. Essas classe e família são compostas por fungos caracterizados por serem patógenos de plantas e insetos. Até 2011, *P. lilacinum* recebia o nome de *Paecilomyces lilacinus*. Seu nome foi alterado por ele apresentar discrepâncias com as características do gênero *Paecilimyces*, representada por fungos termoestáveis, por exemplo (Luangsa-ard et al., 2011). O fungo se caracterizou por apresentar conídios violeta ao iniciar sua esporulação em cultivos em placas de Petri e esse foi um dos motivos para moverem ele para o gênero *Purpureocillium* (Luangsa-ard et al., 2011). Apesar dessa mudança de nomes ter ocorrido em 2011, ainda há publicações de artigos se referindo ao nome *Paecilomyces lilacinus* (Burhan e Annon, 2019; Espadale et al., 2018 e Sanadhya et al., 2018).

Figura 1: Cultivo de *P. lilacinum* em placas de Petri. Cultura cultivada por 14 dias em meio de cultivo contendo extrato de malte. Pode-se observar coloração violeta, típica de esporulação do fungo



Fonte: Luangsa-ard et al., 2011

P. lilacinum é um fungo saprófito, encontrado em muitas localizações, mais frequentemente em solo, vegetação em decomposição, insetos e nematoides (Luangsa-ard et al., 2011). Existem relatos, inclusive, de associação de *P. lilacinum* com águas-vivas (Yue et al., 2015). Em cultura, apresenta crescimento ótimo entre 26 e 30 °C.

Cresce em uma faixa de pH abrangente e tolera uma vasta diversidade de substratos (Banu et al., 2006 e Sun et al., 2006). Sua grande capacidade de adaptação aos mais diversos ambientes o torna um fungo com um grande potencial genético a ser explorado. Possui dois projetos genoma completos depositados no banco de dados Esembl (https://fungi.ensembl.org/index.html), mas, diante de seu potencial, ainda possui poucos recursos bem explorados.

Uma característica bem estudada de *P. lilacinum* é sua capacidade de infectar invertebrados, como insetos e nematoides. Por essa característica, o fungo vem sendo explorado como possível controle biológico de pragas, principalmente para os nematoides (Wang et al., 2016 e Xie et al., 2016). Após os primeiros relatos de infecção nos nematoides *Meloidogyne incognita acrita* e *Globodera pallida*, que atacam culturas de batatas, estudos posteriores foram realizados (Jatala et al., 1979 e Stirling et al., 1991). Verificou-se que a virulência se dá pela produção e secreção de enzimas e metabólitos secundários capazes de desestabilizar as membranas dos ovos dos nematoides (Wang et al., 2016, Wang et al., 2010). Dentre as enzimas produzidas estão peptidases e quitinases (Khan et al., 2004). Um metabólito secundário foi isolado do fungo por atuar nos mecanismos de infecção e foi denominado leucinostatina (Wang et al.,2016). Hoje já existe uma linhagem de *P. lilacinum* (PL251) registrada nos Estados Unidos como controle biológico de nematoides (Kiewnick et al., 2011). O estudo da aplicação deste organismo e seus recursos genéticos na biotecnologia vem ganhando força e se mostra muito promissor.

P. lilacinum também é observado infectando seres humanos. Os relatos mostram que não só pessoas imunossuprimidas podem ser infectadas, mas também pessoas com sistema imunológico saudável (Carey et al., 2003 e Pastor e Guarro, 2006). O maior número de relatos é o de oculomicoses, seguidos de infecções cutâneas e subcutâneas (Pastor e Guarro, 2006). Além disso, há outras infecções relatadas, como sinusite, perfuração do septo nasal, osteomielite, onicomicose, fungemia, endocardite, doença pulmonar cavitária e vaginite (Pastor e Guarro, 2006; Carey et al., 2003; Khalique et al., 2018; Shivaprasad et al., 2012; Khan et al., 2012; Raghavan et al., 2018 e Evans et al., 2016).

Existe uma associação muito forte entre a causa dessas doenças e a utilização de materiais sintéticos contaminados. No caso das oculomicoses, por exemplo, os principais agentes inoculantes de fungo foram lentes implantadas, lentes de contato ou soluções de armazenamento de lentes contaminadas com *P. lilacinum* (Pastor e Guarro, 2006). Existem relatos de contaminação de material cirúrgico ou equipamento de tatuagem, que geraram infecções (Trinh e Angarone, 2017 e Khalique et al., 2018). Essa associação mostra que, mesmo com protocolos de esterilização e utilização de materiais sintéticos para evitar o crescimento de microrganismos, o fungo *P. lilacinum* se mantém viável nesses materiais e pode causar doenças que podem se complicar e causar morte (Khalique et al., 2018).

O tratamento de infecções causadas por *P. lilacinum* pode ser dificultado, pois o organismo apresenta resistência a vários dos principais antifúngicos utilizados na terapia atualmente, os “azóis” (Pastor e Guarro, 2006, Aguilar et al., 1998). Observam-se casos em que os testes de susceptibilidade apontam sensibilidade do fungo a uma dada molécula, mas a terapêutica não funciona como esperado (Hall et al., 2004). Os estudos dos mecanismos que promovem resistência têm se intensificado e se fazem muito importantes, dado o aumento de relatos de organismos resistentes a essas moléculas, como é o caso do *P. lilacinum*.

2. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo geral explorar molecularmente o fungo *P. lilacinum* com relação à sua capacidade de resistir a antifúngicos e à sua capacidade de produzir peptidases robustas, com potencial de aplicação biotecnológica.

Como objetivos específicos, separamos em dois capítulos, para que a linha de raciocínio faça mais sentido.

Capítulo 1: resistência a antifúngicos

- Cultivar *P. lilacinum* em condições capazes de estimular a resistência aos antifúngicos fluconazol e itraconazol

- Realizar um transcriptoma e correlacionar dados de expressão diferencial com mecanismos moleculares que geram resistência a antifúngicos.
- Realizar um proteoma e identificar proteínas importantes para o processo de resistência a antifúngicos.

Capítulo 2: Produção recombinante de peptidases

- Selecionar genes de peptidases a partir do transcriptoma de *P. lilacinum* e de dados gerados com enzimas nativas
- Caracterizar geneticamente o gene de uma serino peptidase e de uma metalo peptidase
- Produzir e purificar uma serino e uma metalo peptidases em sistema de expressão em *Pichia pastoris*.
- Realizar uma caracterização de uma serino e metalo peptidases.
- Realizar estudos estruturais com a serino peptidase para correlacionar com os dados bioquímicos.

Capítulo 1

P. lilacinum e sua resistência a Antifúngicos

Lista de figuras

Figura 1: Cultivo de *P. lilacinum* em placas de Petri. 1
Figura 2: Teste de esporulação.. 23
Figura 3: Acompanhamento da massa seca de *P. lilacinum*: 24
Figura 4 Análise do padrão de expressão entre os tratamentos:..... 25
Figura 5 Extração de RNA total de *P. lilacinum*: 27
Figura 6: Representação gráfica da qualidade dos RNAs...... 28
Figura 7: Representação gráfica da distribuição de tamanhos de cDNA em cada amostra. 29
Figura 8: Gráfico de qualidade das sequências por base sequenciada: 30
Figura 9: Gráfico PCA...... 31
Figura 10: Visão geral da expressão gênica...... 33
Figura 11: Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos. 34
Figura 12: Análise de *Gene Onthology*.. 36
Figura 13: Heatmaps dos genes relacionados com resistência a antifúngicos.... 39
Figura 14: análise de RT-qPCR...... 41
Figura 15: Diagrama de Venn dos dados proteômicos: 47

Lista de tabelas

Tabela 1: Meios de cultivo testados para indução de esporulação em *P. lilacinum*. 12
Tabela 2: Sequência dos primers utilizados nos experimentos de qRT-PCR 20
Tabela 3: valores de expressão do gene VFPFJ_03164 em cada amostra. 40
Tabela 4: Tabela Proteoma:. 44

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

CYP51	Citocromo P450 51
MFS	major facilitator superfamily transporter
PDA	Potatoe Dextrose Agar
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
FLC64	Traramento com fluconazol a 64 µ/mL
ITR16	Tratamento com itraconazol a 16 µ/mL
UAA	Unidades Arbitrárias de Absorbância
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
DMSO	Dimetilsulfóxido
PA	Para Análise
SDS	Dodecil sulfato de Sódio
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa a partir de produto de Transcrição Reversa
.BAM	Extensão binária de um arquivo de alinhamento
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
ACN	Acetonitrila
PCA	Análise do Componente Principa
TPM	Transcritos Por Milhão
MDR	MultiDrug Resistant
ABC	Família de transportadores de membrana
™	Trademark
®	Marca Registrada
µ	Micro
λ	Comprimento de onda
θ	Teta

Resumo

O fungo filamentoso *Purpureocillium lilacinum* é considerado um patógeno oportunista. Ele pode infectar tanto pessoas imunossuprimidas quanto pessoas com sistema imunológico íntegro. Apresenta resistência a vários tipos de antifúngicos “azólicos”. Apesar de os mecanismos de resistência serem estudados em *Aspergillus* e *Candida*, não há estudos relatando as respostas moleculares de *P. lilacinum* a essas moléculas. Os resultados do transcriptoma mostram modulação da expressão quando *P. lilacinum* é desafiado com fluconazol a 64 µg/mL e itraconazol a 16 µg/mL após 12 horas de tratamento. Uma vez que esses antifúngicos atacam a via de biossíntese do ergosterol, dois genes homólogos codificando a enzima alvo dos antifúngicos (CYP51) tiveram um aumento de expressão em ambas as condições testadas. Bombas de efluxo codificando genes, major facilitator superfamily transporter (MFS), também tiveram expressão aumentada em amostras tratadas. Nós propomos que *P. lilacinum* pode expressar resistência antifúngica através da elevação dos níveis de expressão da CYP51 e bombas de efluxo. Essas modulações confeririam um aumento da enzima alvo intracelular e uma retirada antifúngica constante. Esta situação forçaria o aumento da administração de antifúngicos para obter morbidade ou mortalidade por fungos. Esta informação pode ser importante para apoiar o poder de decisão sobre estratégias de tratamento em situações de infecção por *P. lilacinum*.

Abstract

Purpureocillium lilacinum, a filamentous fungus, is considering an emerging pathogen. It can infect imunocompromised and imunocompetent humans and shows resistance against several azole antifungal molecules. Although azole resistance mechanisms are studied in *Aspergillus sp*. and *Candida sp*., there is no study reporting *P. lilacinum* molecular responses against these molecules so far. Transcriptomic results showed gene expression modulations when *P. lilacinum* is challenged in two conditions, with fluconazole (64 µg/mL) and itraconazole (16 µg/mL) antifungals until 12 hours of execution. Once these antifungals attack the ergosterol biosynthesis pathway, two homologous genes coding for Cytochrome P450 51 enzyme - azole antifungals target - had an increase of expression in both tested conditions. Efflux pumps coding genes, like major facilitator superfamily transporter (MFS), also had expression increasing in treated samples. We propose that *P. lilacinum* can express antifungal resistance trough rising the Cytochrome P450 51 and efflux pumps expression levels. These modulations would confer an increasing of intracellular target enzyme and a constant antifungal withdrawing. This situation would force an increase of antifungal administration to get fungal morbidity or mortality. This information could be important to support the decision power about treatment strategies in situations of *P. lilacinum* infection.

1. Introdução

O fungo *Purpureocillium lilacinum* é considerado um patógeno emergente, pois os números de relatos de infeções causadas por ele vêm aumentando (Pastor e Guarro, 2006). Esse aumento se deve, primariamente, por conta do aumento no número de pessoas em condição de imunossupressão, como receptores de doações de órgãos ou pacientes em tratamento com quimioterápicos (Walsh et al., 2004). O fator agravante das infecções causadas por *P. lilacinum* é sua capacidade de resistir aos tratamentos convencionais.

Os antifúngicos mais comuns na terapêutica de infecções fúngicas são do tipo “azol”, como cetoconazol, fluconazol, itraconazol, miconazol, voriconazol e outros. Os mecanismos de ação dessas moléculas tipo “azóis” se caracterizam pelo ataque à biossíntese de ergosterol, inibindo a enzima lanosterol 1,4-α-sterol-dimetilase. Essa enzima é dependente do citocromo P450 e codificada pelos genes CYP51 A e B em fungos filamentosos. A inativação dessa enzima gera acúmulo de lanosterol 1,4-α-metilado. Isso resulta em maior permeabilidade e instabilidade na membrana do fungo, o que atrapalha a replicação do organismo (Como et al, 1994).

Em fungos filamentosos, existem três mecanismos principais para resistência a “azóis”: mutação da enzima alvo, lanosterol 1,4-α-sterol-dimetilase, o que resulta em menor afinidade entre a enzima e o antifúngico; super expressão da enzima alvo, que gera efeito compensatório à inativação pelo antifúngico; e atuação de bombas de efluxo, que retiram ativamente as moléculas de antifúngico do organismo (Srinivasan *et*. al, 2014). Em *Aspergillus fumigatus* já foi descrito que os genes CYP51A e CYP51B são mutados e geram enzimas com baixa afinidade ao fluconazol (Leonardelli *et.*al, 2016, Srinivasan *et*. al, 2014). Além disso, foi verificado que o fator de transcrição SrbA promove um *uptake* de produção desses genes para normalização da via do ergosterol (Blosser e Cramer, 2012). As principais famílias de bomba de efluxo são proteínas de ligação ao ATP e facilitadores mistos. Essas proteínas, quando envolvidas em mecanismos de resistência, evitam o acúmulo de antifúngico no interior da célula e assim o organismo não sofre alteração de desenvolvimento (Vandeputte et al, 2012).

Outros estudos propõem que a entrada de antifúngico nas células não ocorre de maneira passiva, mas sim via difusão facilitada, independente de pH e ATP, mas seletiva para moléculas específicas. Pode ocorrer competição entre antifúngico e outras moléculas para acessar o interior da célula e isso afeta o acúmulo de antifúngico no citoplasma, o que resultaria em desenvolvimento normal do fungo (Mansfield et al, 2010).

Os estudos nessa área têm sido direcionados principalmente para os gêneros *Candida* e *Aspergillus* e ainda há carência de informação a respeito de todas as estratégias adotadas por esses fungos para resistir à ação de antifúngicos. O desenvolvimento de resistência a antifúngicos nos chamou a atenção, pois o conhecimento molecular desse mecanismo em *P. lilacinum* pode gerar possibilidades de estudos mais específicos, que podem resultar no desenvolvimento de estratégias mais eficientes na sua terapêutica.

Este capítulo é dedicado a associar estudos moleculares, como transcriptoma e proteoma, para descrever como ocorre a resistência de *P. lilacinum* aos antifúngicos fluconazol e itraconazol.

2. Material e métodos

2.1. Isolamento e manutenção de *P. lilacinum*

O fungo *P. lilacinum* está depositado na micoteca do Laboratório de Tecnologia Enzimática da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hamilton Cabral. O microrganismo foi isolado de solo em uma área rural do município de Miguelópolis, estado de São Paulo. Tem sido mantido em tubo de ensaio e frascos do tipo Erlenmeyer, contendo o meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA), armazenado a 4 °C, segundo o método de Castellani, 1967.

2.2. Cultivo de *P. lilacinum*

2.2.1. Meio de esporulação

O cultivo de *P. lilacinum* em PDA não resulta em um grau de esporulação satisfatório para experimentos que exigem concentrações de inoculo superiores a 10^4

esporos/mL. Sendo assim, foram realizados testes de esporulação utilizando meios de cultivo com extratos de origem diferente, como MUCILON^R (Nestlé) que tem farinha de arroz na sua composição; extrato de malte, aveia em flocos e farinha de aveia. As composições dos meios de cultivo estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Meios de cultivo testados para indução de esporulação em *P. lilacinum*. O fungo foi incubado a 30 °C por 10 dias em placas de Petri preenchidas com cada um dos meios de cultivo a baixo.

Principal componente	Porcentagem (%)	Agar (%)
Mucilon^R (Nestlé)	3	2
Mucilon^R (Nestlé)	1,5	2
Extrato de malte (OXOID)	2	1,5
Aveia em flocos (Natu's)	5	1,5
Farinha de aveia (Natu's)	5	1,5

Fonte: Autor

Todas as formulações passaram por um cozimento de 10 min. e foram esterilizadas por 15 min., 121 °C ou 1,5 atm. Placas de Petri estéreis de 7 cm de diâmetro foram utilizadas e nelas foram adicionados 20 mL dos meios de cultivo. Foram feitas 3 placas com cada meio de cultivo. O inoculo do fungo foi realizado por espalhamento da massa micelial, com alça de inoculação, e as placas foram cultivadas por 10 dias em estufa a 30 °C.

A extração de esporos foi realizada com a adição de 2 mL de solução salina (NaCl a 0,85 % e Tween 20 a 1%) nas placas. As placas foram raspadas com uma espátula e o líquido remanescente foi transferido para tubos Falcon. Os extratos foram centrifugados a 10.000 x *g* por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e diluídos em uma razão de 1:10 para então serem usados na contagem de esporos em câmara de Neubauer. O número de esporos por mL corresponde ao valor da média de esporos por quadrante, multiplicada pelo fator de diluição e pelo volume adicionado na câmara. Cada placa experimentada foi quantificada e então foi possível verificar qual constituição de meio de cultivo gera maior rendimento de esporulação.

Foi realizado um teste T de *student*, com modelo bicaudal, para saber se a diferença de produção entre os dois meios que mais produziram esporos é significativa, considerando significativa em caso de *p valor* menor ou igual a 0,05.

2.2.2. Condições gerais de cultivo com antifúngicos

A norma da NCCLS, expedida em 2002 (NCCLS, 2002), trata da padronização dos cultivos em meio líquido para ensaios de resistência a antifúngicos para fungos filamentosos. Realizamos algumas modificações e escolhemos induzir resistência com dois antifúngicos do tipo Azol: Fluconazol e Itraconazol. Escolhemos essa classe de moléculas, pois constitui os antifúngicos mais utilizados na terapêutica antifúngica (Graninger et al., 2018). As concentrações utilizadas foram baseadas na metade das maiores concentrações já testadas destes antifúngicos e publicadas na literatura, que atingiram valores adequados de Concentração Inibitória Mínima (MIC – Minimum Inhibitory concentrations) (Aguilar et. al, 1998). Ficaram definidas, portanto, a concentração de 64 µg/mL de Fluconazol (FLC64) e de 16 µg/mL de Itraconazol (ITR16).

As condições básicas de cultivo se iniciam no preparo de placas para esporulação. O meio de cultura selecionado para essa etapa foi Mucilon a 3%, pois foi o que apresentou maior taxa de esporulação. A quantificação dos esporos foi realizada por espectrofotometria em um comprimento de onda de 530 nm (NCCLS, 2002). Uma alíquota da solução de esporos foi quantificada em espectrofotômetro. Realizou-se uma diluição para se atingir a concentração equivalente à leitura de 0,15 UAA (Unidades Arbitrárias de Absorbância). Essa concentração é equivalente a $5x10^4$ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia por mililitro), como descrito em NCCLS, 2002. A solução foi, portanto, usada para inocular as culturas de *P. lilacinum*.

O meio de cultura RPMI utilizado para o cultivo frente aos antifúngicos foi tamponado com HEPES 50 mM (Sigma Aldrich) e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH. A esterilização do meio foi realizada com filtro “Stericup and Steritop” (Millipore) com auxílio de uma bomba a vácuo. Posteriormente, a solução foi fracionada em Erlenmeyers esterilizados por autoclavagem de 40 min, 121 °C ou 1,5 atm.

O inoculo foi realizado com a adição de 1 mL de solução de esporos para um volume final de 50 mL de cultivo. Foram preparados 77 Erlenmeyers para cada condição testada. A cultura foi mantida a 30 °C e sob agitação de 120 rpm. A indução de resistência foi realizada após 24 h da inoculação. No total, foram realizadas três condições de cultivo

a saber: sem antifúngico (controle); com 64 µg/mL de Fluconazol (FLC64); com 16 µg/mL de Itraconazol (ITR16). Os antifúngicos foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO) com posterior diluição em água. Sendo assim, as soluções de antifúngico ficaram com uma concentração final de DMSO de 1,7 % (V/V). Considerando isso, para equiparar o DMSO em todos as amostras, o cultivo controle recebeu uma solução aquosa com DMSO a 1,7% na etapa de indução de resistência. Imediatamente após a indução de resistência, 10 Erlenmeyers de cada condição foram retirados do cultivo e representaram o tempo 0 h de indução. O restante foi mantido a 30 °C sob agitação de 120 rpm. Seguindo o experimento, 10 Erlenmeyers foram retirados de cada condição nos tempos 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h e 96 h. Somente 1 Erlenmeyer de cada tempo de indução foi retirado para acompanhamento do crescimento da biomassa, descrito posteriormente.

Os Erlenmeyers retirados de cada tratamento e de cada tempo de indução passaram por filtração em filtro qualitativo para separação do meio de cultivo e massa micelial. A massa micelial foi lavada com solução salina (NaCl 0,9%). Os Erlenmeyers foram reunidos de 5 em 5, portanto, para cada tempo de indução existem duas replicatas, chamadas A e B (por exemplo: amostra “controle12hA” e amostra “controle12hB”). Tanto o meio de cultivo quanto a massa micelial de cada amostra são aproveitados, portanto, todo esse material separado foi armazenado em freezer -80 °C. As amostras do meio de cultivo foram liofilisadas no equipamento “Alpha 2-4 LD plus” (CHRIST).

2.2.3. Acompanhamento da biomassa

O acompanhamento de ganho de biomassa durante o bioprocesso foi destinado à verificação da influência do tratamento com antifúngicos no crescimento celular de *P. lilacinum*. Sendo assim, para todos os bioprocessos, um Erlenmeyer de cada tempo de tratamento foi separado para essa análise. O tratamento dessas amostras se iniciou com filtração em filtro qualitativo para separação da massa micelial e meio de cultivo. Os filtros utilizados nesta etapa foram previamente mantidos em estufa a 50 °C por 24 h e então pesados e identificados. Após a filtração, os filtros contendo o fungo foram incubados em estufa a 50 °C até que parassem de perder massa, ou seja, estivessem completamente

secos (aproximadamente 48h). A massa seca do fungo foi considerada a massa resultante da subtração dos valores para o filtro com fungo e sem fungo.

2.2.4. Perfil proteico ao longo do cultivo

A produção de proteínas foi acompanhada em todas as etapas de retirada de alíquotas. Com isso foi possível verificar em qual tempo de indução começaram a surgir diferenças de expressão entre controle e FLC64 ouITR16. A verificação foi realizada com as frações da massa micelial. Para isso, uma porção do material foi descongelado, tratado com solução de inibidores de protease “Complete Ultra” (ROCHE) e “lisado” por sonicação com o seguinte programa: potência 75%; 5 min. alternados de 60 seg. ligado e 30 s. desligado; em banho de gelo. Seguiu-se com centrifugação a 8000 x *g* por 15 min a 4 °C e separação do precipitado (resquícios celulares) e sobrenadante (moléculas solúveis).

A solução sobrenadante passou por uma precipitação de proteínas. O protocolo de precipitação é constituído pela adição de Acetona (P.A.) na proporção de 6 vezes o volume de solução; incubação a -20 °C por, pelo menos, 16 h e centrifugação a 10000 x *g*, 15 min. e 4 °C. O precipitado formado foi ressolubilizado por uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,05 %.

O material foi quantificado por método de Bradford (Bradford, 1976) e preparado para um SDS-PAGE. A análise do padrão de bandas do gel revela se há diferença de expressão entre os tratamentos.

2.3. Estudos transcriptômicos

Os estudos transcriptômicos foram propostos, principalmente, para embasar uma análise de expressão capaz de elucidar adaptações moleculares de *P. lilacinum* quando o mesmo foi desafiado com antifúngicos. Outra vantagem dessa técnica é já se ter em mãos as sequências gênicas para uma possível aplicação em estudos direcionados com expressão recombinante.

A realização dos estudos transcriptômicos foi realizado com a *facility* de prestação de serviços do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP (Hemocentro).

2.3.1. Extração de RNA

As primeiras etapas desse processo são a indução de expressão diferencial com bioprocesso tratado com antifúngicos e extração de RNA de boa qualidade para o sequenciamento.

Sendo assim, iniciou-se com o bioprocesso nas mesmas condições já apresentadas no item “Condições gerais de cultivo com antifúngicos”, com a diferença no número de Erlenmeyers. Foram produzidas 3 replicatas de cada condição: Controle; FLC64 e ITR16. Em 12 h de indução, a massa micelial foi separada do meio de cultivo por filtração em papel qualitativo, lavada com solução salina (NaCl 0,9%) e rapidamente congelada com N_2 líquido.

A quantidade de 100 mg de cada amostra foi macerada em cadinhos na presença de N_2 líquido. O macerado foi transferido para microtubos de 1,5 mL e as amostras foram tratadas com TRI Reagent® (Sigma Aldrich), na proporção de 5 µL de TRI Reagent para cada miligrama de tecido (5:1). A esta mistura foi adicionado clorofórmio na proporção de 1:1. As amostras foram agitadas vigorosamente em vortex e incubadas por 12 minutos a 25 °C. O material foi centrifugado por 5 minutos a 4 °C e 12000 x *g* e a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Após a transferência realizou-se uma nova extração com clorofórmio (1:1). Em seguida, o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com adição de isopropanol gelado (0,7 volumes). Após incubar por 10 minutos a 25 °C, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 x *g* a 4 °C. Posteriormente, o precipitado foi lavado com etanol 75% gelado, seco em temperatura ambiente e as amostras foram ressuspendidas em água tratada com DEPC.

As amostras selecionadas passaram por tratamento com DNase I RNAse Free (Invitrogen), em uma reação contendo 1 unidade de enzima para cada 3 µg de RNA total, incubando por 30 min. à 37 °C e inativando em seguida com adição de 1 µL de EDTA 50 mM e incubação a 65 °C por 5 minutos.

2.3.2. Preparo das amostras e sequenciamento

As amostras de RNA foram quantificadas em equipamento Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). A análise de qualidade foi também avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras foram consideradas de boa qualidade quando apresentaram as relações tanto de 260/280 nm quanto de 260/230 nm entre os valores de 1.8 e 2.0. A eletroforese em gel de agarose possibilitou a verificação tanto das bandas de RNA ribossomal quanto do grau de degradação das amostras.

Os experimentos de preparo de biblioteca e sequenciamento foram executados no Hemocentro de Ribeirão Preto – SP, pela Dra. Kamila Chagas Peronni.

Já no Hemocentro de Ribeirão Preto, portanto, as amostras passaram por análise de qualidade no equipamento 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) com o kit “total RNA nano” e então foram selecionadas as amostras que tiveram qualidade (score) maior ou igual a 7.

Antes do preparo da biblioteca, o primeiro procedimento foi a quantificação do RNA em fluorímetro “QU Bit 3.0” (Life Technologies). Posteriormente, a concentração de todas as amostras foi corrigida para 6 ng/µL em um volume final de 50 µL.

Todas as etapas, a partir desse ponto, foram realizadas com kits adquiridos da empresa Illumina, específicos para execução de experimento de RNAseq no sequenciador Next-Seq 500.

Inicia-se a produção da biblioteca de DNA com uma purificação do RNAm utilizando *beads* carregadas com cauda poli-T (Oligo-dT *beads*), que hibridizam em RNAs com cauda poli-A e separam o RNAm dos outros tipos de RNA. Após a separação, o RNA foi fragmentado, purificado e se iniciou a síntese da primeira fita de cDNA por Transcrição Reversa e, posteriormente, síntese da segunda fita por transcrição convencional (PCR). Utilizaram-se exonucleases para deixar as extremidades “*blunt ends*” e polimerase para adicionar Adenina nas extremidades 3’ das sequências. Realizou-se então a ligação de adaptadores. Cada amostra recebeu um adaptador diferente. A ligação foi interrompida e o material foi purificado por duas vezes por precipitação de DNA. Realizou-se uma

PCR para enriquecimento das sequências da biblioteca utilizando *primers* que hibridizam nas regiões dos adaptadores.

Uma validação da construção dessa biblioteca foi realizada com o uso do 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) (kit DNA 1000) e qPCR (Life technologies), segundo o protocolo “Sequencing Library qPCR Quantification Guide”. A primeira etapa da validação foi a quantificação por fluorímetro “QU Bit 3.0” (Life Technologies), seguida pela análise do padrão de tamanho das sequências geradas em Bioanalyser (Agilent Technologies) (kit DNA 1000) e, por fim, quantificação das amostras diluídas (1:1000) via qPCR (Life Technologies).

O material quantificado foi então aplicado ao equipamento Next-seq 500 (Illumina) para que tivesse quantidades iguais de cada amostra. A biblioteca foi construída para gerar *reads* de 150 pb, em construção *paired-ends*. O sequenciamento ocorreu e os resultados foram compartilhados via nuvem, em uma plataforma disponibilizada pela Illumina. Os dados brutos ficaram disponíveis para *download*, que foi realizado já no servidor utilizado para as análises.

2.3.3. Análises de bioinformática

A qualidade das sequências geradas foi verificada pelo programa FastQC, versão 0.11.8 (Andrews, 2018). Foram analisados parâmetros de estatística básica – como conteúdo de GC, número de sequências, tamanho médio das sequências, etc - qualidade da sequência por base, conteúdo da sequência por base, proporções de GC na sequência, distribuição dos comprimentos das sequências, presença de nucleotídeo mal sequenciado (N), níveis de duplicação de sequência, sequências super representadas, conteúdo de *kmer*.

O software seguinte foi o STAR, versão 2.5.2a_modified (Dobin, 2012). O STAR realiza o alinhamento e mapeamento das *reads* sequenciadas com uma referência. As referências foram: um arquivo de anotação genômica (Purpureocillium_lilacinum_gca_001653265.ASM165326v1.40.gff3) e um arquivo de transcritos (Purpureocillium_lilacinum_gca_001653265.ASM165326v1.dna.toplevel.fa). Estes arquivos foram baixados do website https://fungi.ensembl.org/index.html, um

repositório genômico com projetos finalizados. Os resultados dessa análise são apresentados em arquivos de mapas binários de alinhamento (extensão .BAM). Estes arquivos puderam ser lidos pelo software que faz a contagem gênica, o RSEM, versão 1.2.31 (Li e Dewey, 2011). A contagem gênica foi realizada para cada amostra e cada replicata. O pacote DESeq2, versão 1.22.2 (Love et al., 2014), pôde ser aplicado, em ambiente R, para realizar a análise de expressão diferencial dos arquivos gerados pelo RSEM. Os critérios para considerar genes diferencialmente expressos foram apresentarem *fold-change* maior que 1,5 e *P valor* ajustado menor que 0,05.

As listas de genes diferencialmente expressos em cada comparação de condições foram aplicadas em uma ferramenta de ontologia gênica *online* disponibilizada pelo site https://www.uniprot.org/uploadlists/. A ferramenta mostra em quais processos biológicos, funções moleculares ou componentes celulares cada gene se encaixa.

2.3.4. qRT-PCR dos genes selecionados

Os genes diferencialmente expressos que se destacaram por fazer parte do processo de resistência a antifúngicos foram selecionados para a realização da validação dos resultados de RNA-Seq via qRT-PCR. Para isso, as etapas de cultivo do fungo, extração de RNA e tratamento com DNAse seguiram os mesmos passos da preparação do RNA-Seq. Para a produção de cDNA a partir do RNA total de cada amostra, utilizou-se o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems, Foster City, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Foster City, USA) foi utilizado como molécula intercalante de DNA para quantificar as amplificações gênicas. O termociclador utilidazo foi “7500 ABI Prism Sequence Detection System” (Applied Biosystems, Foster City, USA). O desenho dos *primers* foi baseado nos critérios de cada par gerar um amplicon de aproximadamente 150 pb, apresentar temperatura de *melting* de 60 °C e conteúdo de GC de até 50% (Tabela 2).

Tabela 2: Sequência dos *primers* utilizados nos experimentos de qRT-PCR

Nome do *primer*	Sequência do *primer* (5' – 3')
β_tubulin_F	ACGCTGCTCATCTCCAAGAT
β_tubulin _R	TCAATGCAGAAGGTCTCGTC
GAPDH_F	AAGAAGGTCATCATCTCCGC
GAPDH_R	ACTTGTCGTGGATGACCTTG
VFPFJ_09486_F	GGTCTATCTTCTGGTTGCAG
VFPFJ_09486_R	TGATCATGCTTAGCAACGCC
VFPFJ_03164_F	TTCATCCTCAACGGCAAGCA
VFPFJ_03164_R	TTGCGTGAGCCCAAACTTGA
VFPFJ_03671_F	AGCACCATCACGTATGGCAT
VFPFJ_03671_R	AGCTTGCCGTTGAGGATGAA

Fonte: Autor

Os genes da Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e da β-tubulina foram utilizados como controles endógenos de expressão, isto é, esses genes teoricamente não variam os níveis de expressão com a variação das condições testadas. Sendo assim, eles serviram como calibrantes para se avaliar a variação da expressão dos outros genes. O cálculo dos números de unidades de expressão em cada gene e em cada condição foi realizado segundo Albesiano e colaboradores, 2003. A expressão relativa, portanto, foi calculada tendo as amostras do controle como referências. Todos os cálculos e desenho de gráficos foram processados em ambiente R.

2.4. Estudos proteômicos

Os estudos proteômicos só foram possíveis com a colaboração do grupo do Prof. Dr. José Cesar Rosa, do Hemocentro de Ribeirão Preto – SP.

2.4.1. Preparo das amostras

Realizamos os bioprocessos, como descrito no item "Condições gerais de cultivo com antifúngicos". Para a lise celular, a massa micelial foi descongelada, tratada com solução de inibidores de protease "Complete Ultra" (ROCHE) e lisados por sonicação com o seguinte programa: potência 75%; 5 min. alternados de 60 s. ligado e 30 s.

desligado; em banho de gelo. Seguiu-se com centrifugação a 8.000 x *g* por 15 min a 4 °C e separação do precipitado (debris celulares) e sobrenadante (moléculas solúveis).

A solução sobrenadante passou por uma precipitação de proteínas. O protocolo de precipitação é constituído pela adição de Acetona P.A. (Synth) na proporção de 6 vezes o volume de solução; incubação a -80 °C por, pelo menos, 4 h e centrifugação a 10.000 x *g*, 15 min. a 4 °C. O precipitado formado foi ressolubilizado em solução de ureia 8 M. O material foi reduzido por adição de 5 µL de DTT 45 mM e incubação por 1 h a 37 °C; alquilado pela adição de 5 µL de iodoacetamida 100 mM e incubação por 1 h a 23 °C e diluído com 80 µL de NH_4HCO_3 0,1 M. 2 µg de tripsina de pâncreas de porco dimetilada, grau proteômico (Sigma) foram adicionados à solução e o material foi incubado a 37 °C por 36 h. A reação foi interrompida com 5 µL de ácido fórmico P.A. e a solução contendo os peptídeos trípticos foi coletada após 4 h e submetida à concentração e dessalinização em resina de fase reversa POROS® R2 (Applied Biosystems®).

A resina de fase reversa POROS® R2 foi ativada em metanol e equilibrada em solução 0,2 % (v/v) de ácido fórmico. A solução contendo os peptídeos trípticos foi então aplicada na resina. O material que não aderiu à resina foi removido pela lavagem com solução 0,2 % (v/v) de ácido fórmico e, por fim os peptídeos que interagiram com a resina foram obtidos em solução de eluição (60 % (v/v) ACN; 5 % (v/v) ácido fórmico). A solução com os peptídeos eluídos foi seca em concentrador a vácuo rotacional 2-18 CDplus (Martin Christ) 1200 rpm, 35 °C por 90 min.

2.4.2. Espectrometria de massas

O material preparado foi ressolubilizado em 30 µL de tampão (ácido acético 35%); centrifugado por 5 min. em centrífuga do tipo spin (3.000 x *g* temperatura ambiente) e então transferido para o frasco adequado ao equipamento UPLC-nanoAcquity acoplado ao ESI-Q-TOF (Ultima, Waters, UK).

2.4.3. Análise dos resultados

O software MASCOT version 2.2 (Matrix Science, London, UK) foi configurado para identificar os peptídeos gerados por espectrometria de massas no arquivo de

banco de dados local, referente à anotação gênica gerada pelo transcriptoma. Os parâmetros de busca para o MASCOT foram clivagem por tripsina e permissão para até duas clivagens; modificação fixa da cisteína – carbamidometil; modificação variável da metionina – oxidação; tolerância do peptídeo: 1,2 Daltons e ionização ESI-QUAD-TOF. Os resultados foram considerados significantes para um *p* valor < 0,05 que representa identidade ou homologia de acordo com o escore estabelecido pelo MASCOT.

O *software* “Scaffold” 4 também foi utilizado para uma visualização gráfica dos resultados obtidos pelo MASCOT. Foi possível observar as proteínas expressas em apenas uma condição; duas condições ou nas três condições experimentadas utilizando um diagrama de Venn.

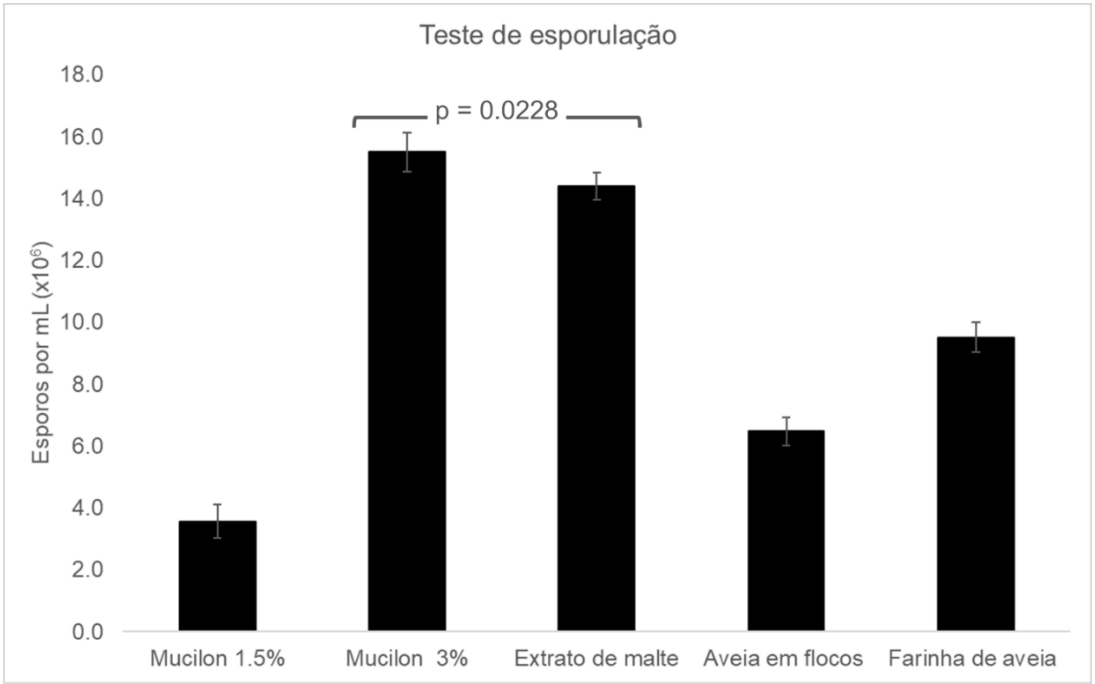
3. Resultados e discussão

O fenômeno de resistência a antifúngicos tem sido alvo de estudo de grupos de pesquisa, pois dificulta muito o tratamento de doenças fúngicas. O fato desses organismos serem eucariotos dificulta a ação dos fármacos e pode gerar efeitos colaterais, dado que a molécula deve atacar um processo metabólico no fungo que não seja conservado em humanos. Este trabalho identifica mecanismos moleculares em *P. lilacinum* capazes de gerar resistência a antifúngicos do tipo azol.

3.1. Teste de esporulação

Com o objetivo de viabilizar e otimizar o bioprocesso com *P. lilacinum*, foi desenvolvido um teste com diferentes meios de cultivo capazes de estimular a esporulação fúngica após 10 dias de incubação a 30 °C. Os resultados foram, portanto, plotados em gráfico de barras que mostra a quantidade de esporos gerados por cada mililitro de extrato extraído (Figura 2).

Figura 2: Teste de esporulação. Representação gráfica dos rendimentos de esporos gerados em cada meio de cultivo. As culturas foram mantidas por 10 dias a 30 °C. O teste T de student entre Mucilon 3% e extrato de malte mostra que a diferença de produção é significativa.



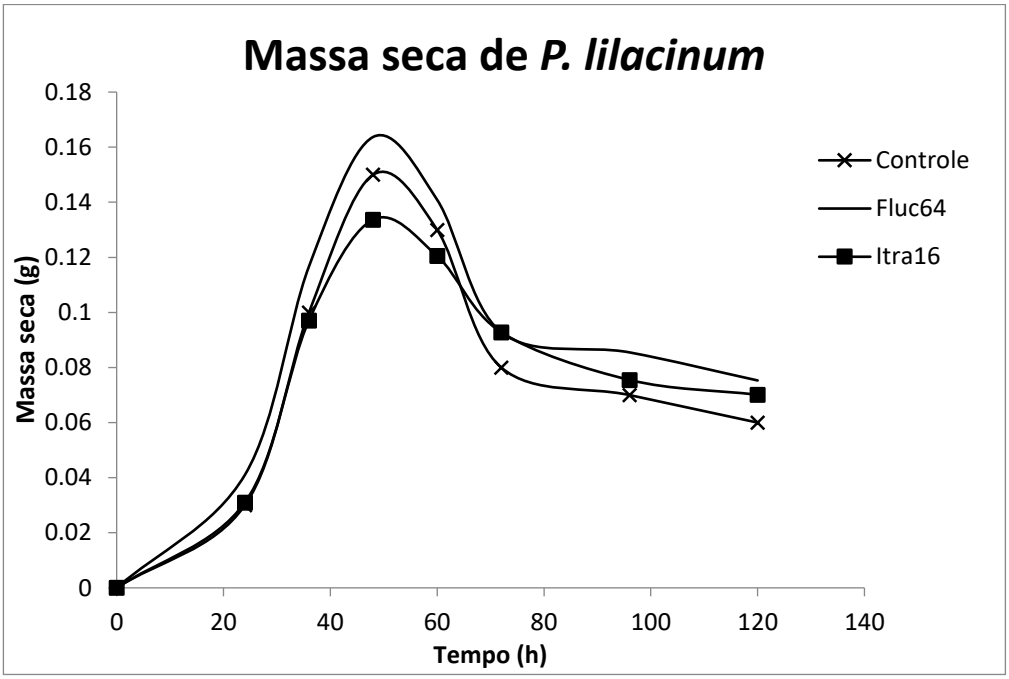
Fonte: Autor

Observou-se, que o meio de cultivo capaz de induzir o fungo a produzir a maior quantidade de esporos foi o “Mucilon 3%”. Nesta condição, foram produzidos 15,5 x10^6 esporos/mL. Sendo assim, este foi o meio selecionado para ser empregado no cultivo do fungo para a produção de esporos.

3.2. Parâmetros dos cultivos com antifúngicos

Após o início do bioprocesso, parâmetros de crescimento foram observados para inferir se houve ou não influência dos antifúngicos sobre o crescimento de massa micelial de *P. lilacinum*. O acompanhamento do crescimento da biomassa de *P. lilacinum* foi realizado pela pesagem do material desidratado. Esse procedimento foi realizado para os três tratamentos e então plotados em dispersões que correlacionam o ganho de massa seca com o tempo de bioprocesso (Figura 3).

Figura 3: Acompanhamento da massa seca de *P. lilacinum*: Gráfico da massa seca pelo tempo de cultivo do fungo *P. lilacinum*, experimentado sob a ação de fluconazol, itraconazol e solução aquosa de DMSO (Controle). Observa-se o mesmo padrão de crescimento entre os três tratamentos. As condições de cultivo foram 30 °C e agitação de 120 rpm.

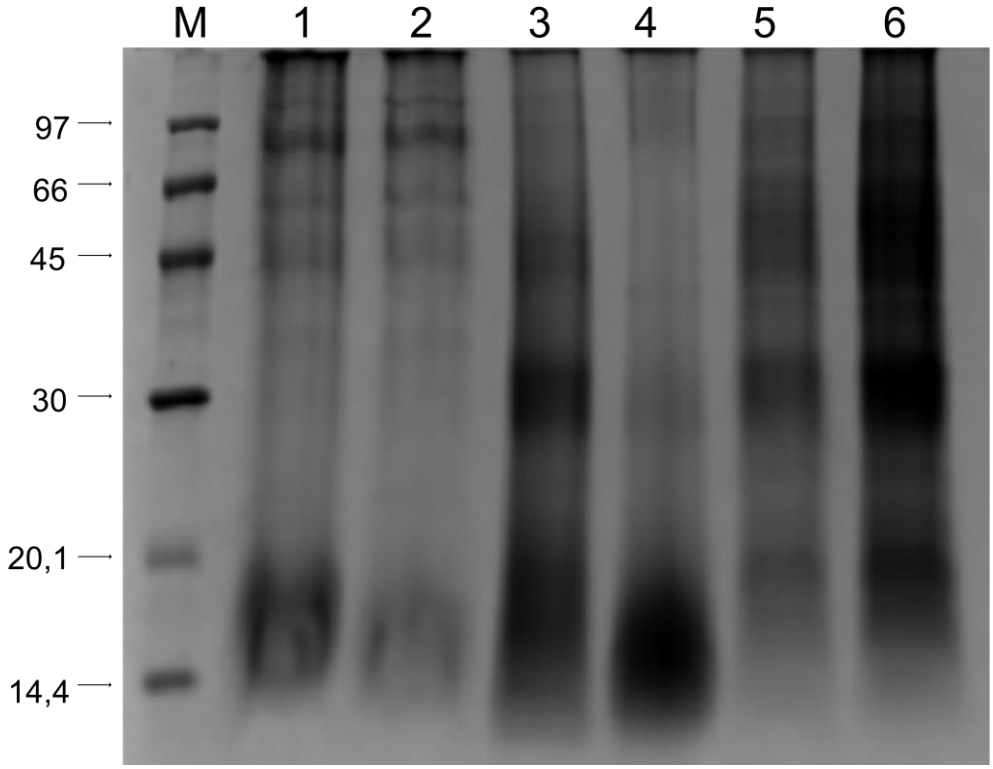


Fonte: Autor

Como pode se observar no gráfico, os antifúngicos não exerceram grande influência no ganho de biomassa quando comparados ao controle, dado que a tendência de crescimento se manteve para todos os tratamentos. A adição de antifúngicos foi realizada no tempo 24 h de cultivo e, a partir desse ponto, houve uma grande velocidade de ganho de massa em todos os tratamentos. Esse resultado mostra que a concentração de antifúngico utilizada foi menor do que a necessária para afetar o crescimento do fungo de maneira significativa. Esse fato não necessariamente revela que a concentração de antifúngicos utilizada foi muito baixa, visto que em trabalho anterior que relatou estudos de MIC, 64 µg/mL para fluconazol e 16 µg/mL para itraconazol são concentrações que podem gerar inibição total de outros fungos do mesmo gênero (Aguilar et. al, 1998). Para o experimento, esse fato é positivo, dado que o objetivo é verificar os mecanismos de resistência a esses antifúngicos e, para isso, é necessário que o organismo esteja viável, mas que tenha sido estimulado a responder contra os antifúngicos.

A diferença no perfil de produção de proteínas entre os tratamentos ao longo do tempo de cultivo vai indicar em que ponto, após a adição de antifúngicos, as respostas fisiológicas do fungo começaram a ser expressas. Esses indicativos são interessantes para que se consiga aplicar as análises proteômicas exatamente nos pontos em que há diferenças no perfil de expressão gênica. O SDS-PAGE realizado permite a visualização da diferença de expressão entre os tratamentos já nas amostras de 12 h (figura 4).

Figura 4 Análise do padrão de expressão entre os tratamentos: SDS-PAGE 12 % do extrato proteico das três condições experimentadas no cultivo de *P. lilacinum*. M: Marcador de massa molecular LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare); 1 e 2: duplicata da amostra "controle" com 12 h de indução; 3 e 4: duplicata da amostra FLC64 com 12 h de indução. A amostra 4 apresentou artefatos de degradação e, portanto, deve ser desconsiderada desta análise; 5 e 6: duplicata da amostra ITR16 com 12 h de indução. Observam-se proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos.



Fonte: Autor

É possível observar, apesar da baixa resolução da imagem, que existem diferenças substanciais no padrão de bandas de cada tratamento, já com 12 horas após aplicação dos antifúngicos. Essa diferença reflete, principalmente, que houve resposta adaptativa às condições impostas. Além disso, as adaptações atingiram a expressão em seu último nível, o de proteínas. As diferenças ocorreram tanto entre controle e antifúngicos quanto

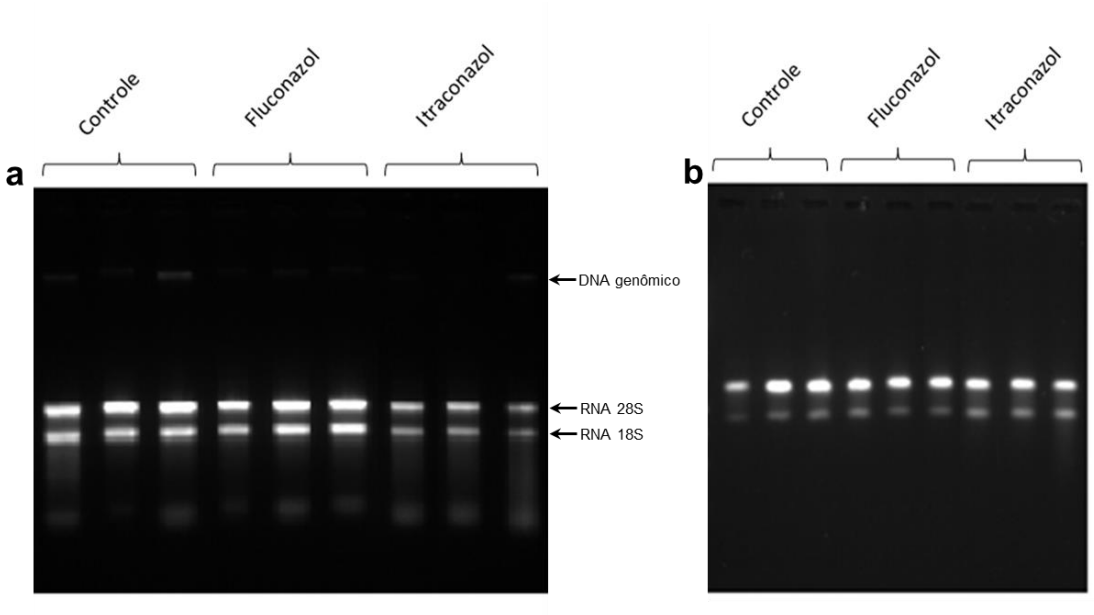
entre os tratamentos com fluconazol e itraconazol. Essa resposta adaptativa conseguida nas condições experimentadas é importante para que os estudos, transcriptômico ou proteômico, reflitam com fidelidade quais mecanismos moleculares de resistência foram ativados.

3.3. Estudos transcriptômicos

3.3.1. RNA, cDNA e qualidade das amostras

Os estudos transcriptômicos se iniciaram com a extração de RNA total do fungo em 12 h de tratamento com os antifúngicos. A extração de RNA total teve sua qualidade verificada por eletroforese em gel de agarose 1 % (Figura 5a). Observou-se que o material apresentou boa qualidade, mediante análise dos RNAs ribossomais íntegros e sem sinais significativos de degradação. Entretanto, foi observado que houve contaminação com DNA genômico e, por isso, o tratamento com DNase se fez necessário para degradar o DNA genômico residual da amostra. O resultado foi analisado por um outro gel de agarose 1% (Figura 5b).

Figura 5 Extração de RNA total de *P. lilacinum*: Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (ThermoFisher). **a)** As extrações foram realizadas em triplicatas e cada amostra está representada no gel. As setas pretas à direita mostram bandas referentes ao DNA genômico e RNAs ribossomais 18S e 28S. **b)** Tratamento do RNA total com DNase: as amostras estão representadas no gel. Observa-se que após o tratamento as bandas de DNA genômico deixaram de existir. O material foi considerado adequado para as análises seguintes.

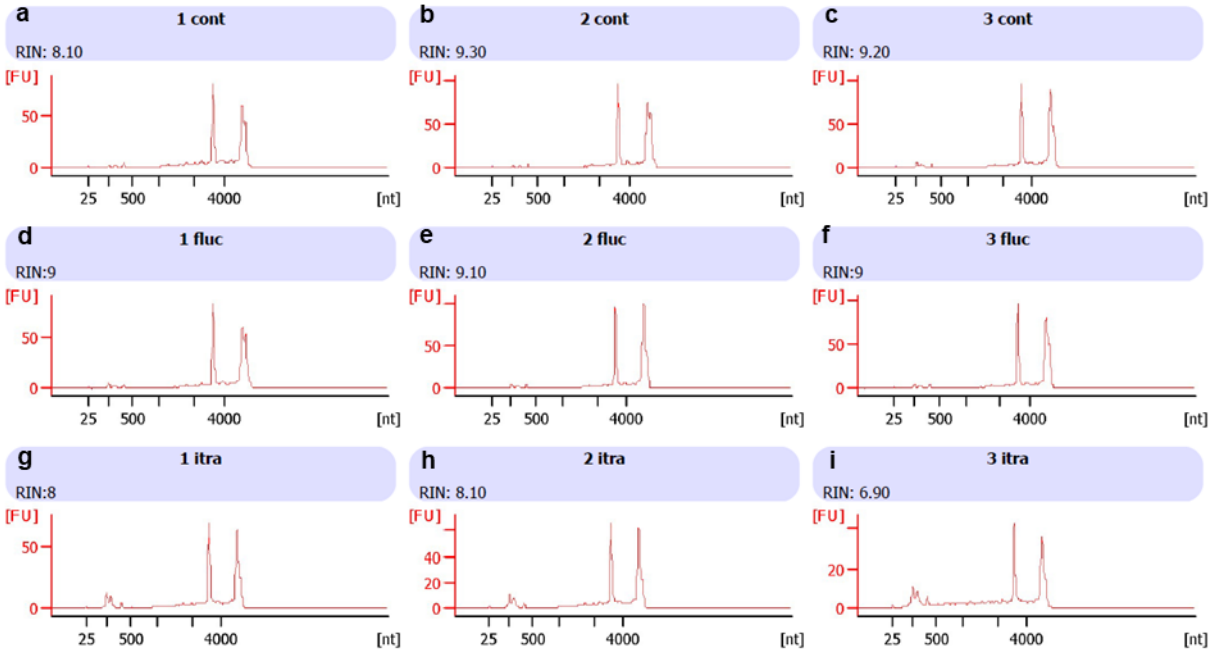


Fonte: Autor

Foi possível observar que após o tratamento com DNAse, a banda referente ao DNA genômico foi adequadamente degradada. Esse fato é importante para que não haja interferência nas etapas de preparo de amostra para o sequenciamento.

A análise com o equipamento Bioanalyser também foi realizada, dado que se trata de um equipamento altamente sensível à qualidade do RNA. A análise resultou em espectros de qualidade, cuja seleção foi realizada de acordo com os "*scores*" e os gráficos emitidos pelo equipamento (Figura 6).

Figura 6: Representação gráfica da qualidade dos RNAs. a – c) triplicata do controle; **d – f)** triplicata do tratamento FLC64 **g – i)** triplicata do tratamento ITR16. O pico anterior e posterior a 4000 pb representam, respectivamente, os RNAs ribossomais 18S e 28S. O valor de *score* de cada amostra está representado nas caixas azuis como RIN.

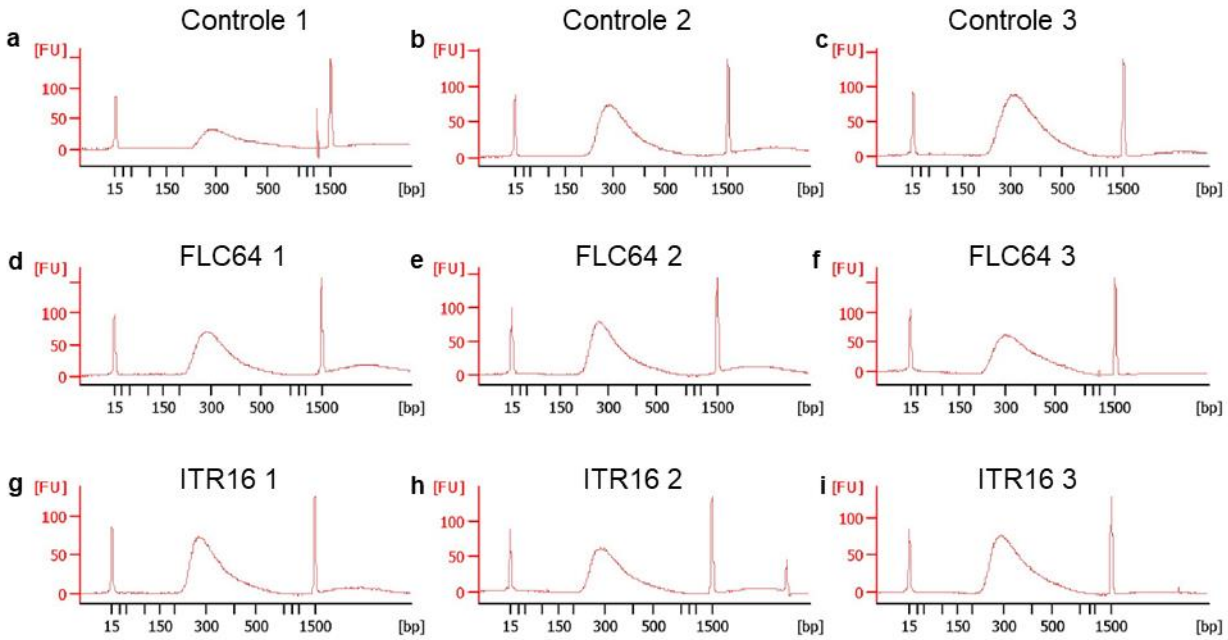


Fonte: Autor

Considerando o *score* mínimo aceitável sendo 7, todas as amostras foram aceitas, inclusive Itra16 III, gráfico “i”, pois 6,9 está muito próximo de 7 e o espectrograma dessa amostra ficou de boa qualidade.

Tendo as amostras aptas ao prosseguimento da experimentação de sequenciamento de ácidos nucleicos, seguiu-se com a montagem da biblioteca de cDNA. Após todas as etapas do preparo serem cumpridas, faz-se um novo teste no equipamento Bioanalyser. Neste caso, a avaliação realizada é com a distribuição de tamanhos das moléculas de cDNA produzidas (Figura 7).

Figura 7: Representação gráfica da distribuição de tamanhos de cDNA em cada amostra. a – c) triplicata do controle; **d – f)** triplicata do tratamento FLC64 **g – i)** triplicata do tratamento ITR16. Os picos em 15 e 1500 pb são marcadores de massa molecular. A distribuição dos tamanhos das moléculas apresenta ponto central próximo de 300 pb em todas as amostras



Fonte: Autor

A avaliação da qualidade da biblioteca mostra que a média de tamanho das moléculas foi de 300 pb. Houve homogeneidade entre as amostras e a variação da intensidade dos picos foi compensada com o volume aplicado para o sequenciamento. A quantificação exata das moléculas foi realizada por qRT-PCR, o que possibilitou maior precisão na aplicação das amostras no sequenciador.

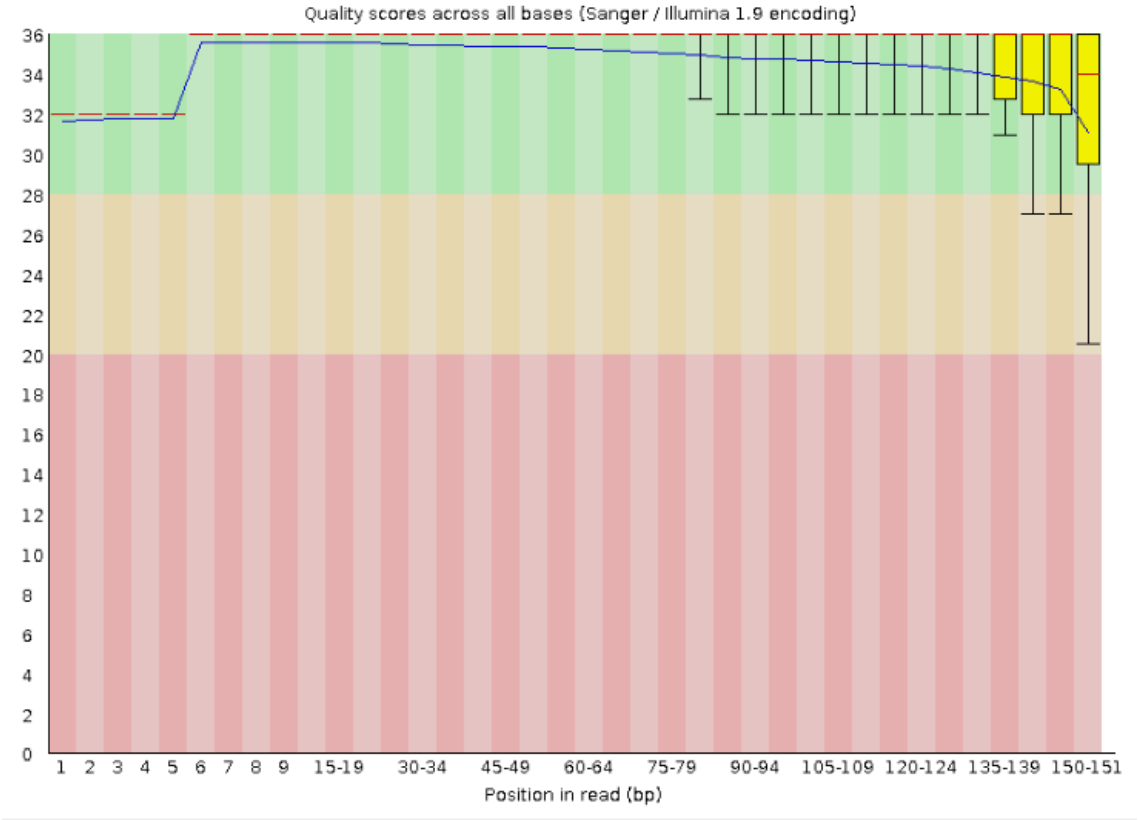
Tendo todos os parâmetros de qualidade favoráveis, seguiu-se com o sequenciamento.

3.3.2. Análises de bioinformática

Após o sequenciamento, iniciou-se as análises bioinformáticas. O primeiro passo realizado foi a análise de qualidade do sequenciamento. A configuração de sequenciamento foi *paired-ends* e foram sequenciadas quatro vezes cada fita (+ e -). Sendo assim, foram gerados 72 arquivos de sequenciamento, considerando as triplicatas biológicas das três condições. Os resultados de qualidade de sequenciamento foram

acessados pelo software fastQC (Andrews, 2018), que gera um relatório gráfico para cada amostra (Figura 8).

Figura 8: Gráfico de qualidade das sequências por base sequenciada: eixo X: regiões das sequências, da posição 1 a 151; eixo Y: quantificação da qualidade de sequenciamento, de 0 a 36. Os diagramas de caixas mostram que as médias de qualidade não foram inferiores a 30. As cores do gráfico indicam pontos de corte para a análise de qualidade: verde são amostras com qualidade boa; amarelo e vermelho são amostras que precisam ser tratadas. Obs: Esta é a análise de qualidade de apenas uma amostra, utilizada aqui para ilustrar os resultados



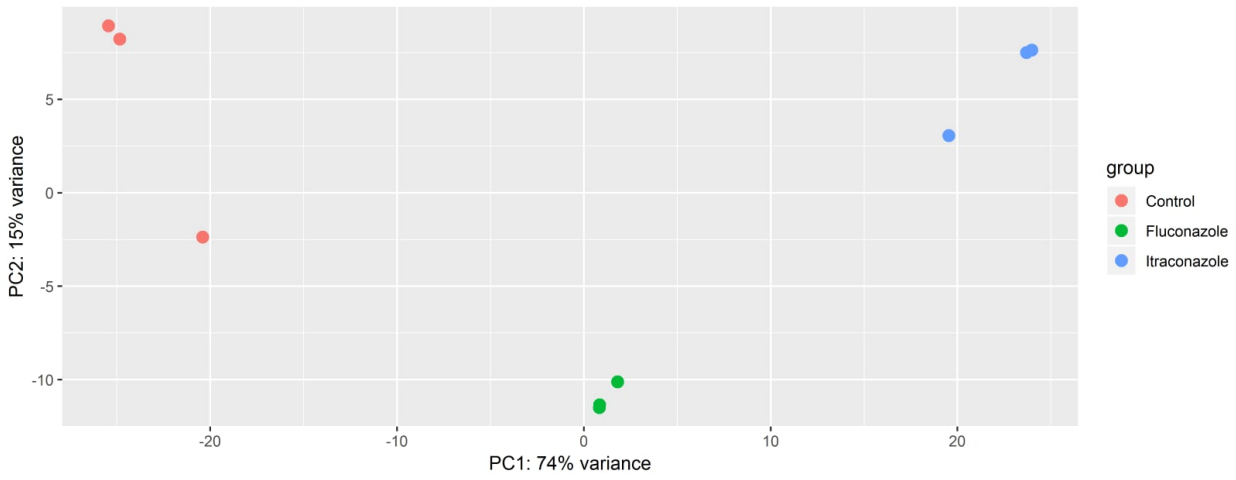
Fonte: Autor

O gráfico mostra a qualidade do sequenciamento em várias regiões das sequências. O eixo Y corresponde aos valores de qualidade, que vão de 0 a 36 e são gerados a partir de algoritmos que calculam a probabilidade de a base sequenciada ser exatamente aquela que o equipamento identificou. O eixo X mostra determinadas regiões das sequências. Os dados de qualidade são estatisticamente representados por diagramas de caixas. Observa-se que à medida que as bases sequenciadas vão ficando em posições mais próximas de 150 pb, a qualidade do sequenciamento tende a cair. Os

dados do gráfico representam o que ocorreu em todas as amostras sequenciadas. Em todos os arquivos de sequenciamento (dos 72 gerados), os números de qualidade não caíram a baixo de 30, o que é considerado um resultado positivo e que não exige a utilização de softwares de “trimagem”, que teriam a função de eliminar regiões do sequenciamento com baixa qualidade.

O software STAR foi utilizado e o alinhamento apresentou similaridade entre as *reads* e o genoma referência de *P. lilacinum* maior que 97,3% em todas as amostras. Esse parâmetro é importante, pois revela que o arquivo referência é adequado para as análises. Depois disso, fez-se a contagem dos transcritos com o software RSEM, que gerou arquivos tabulares relacionando os códigos dos genes aos níveis de expressão de cada um, em cada amostra. Os níveis de expressão foram calculados em TPM (Transcritos Por Milhão). Essas tabelas foram carregadas em ambiente R para se extrair as informações necessárias. O pacote utilizado para a análise de expressão diferencial foi o Deseq2, que foi aplicado às amostras e o primeiro gráfico gerado foi o de PCA (Análise do Componente Principal) (Figura 9).

Figura 9: Gráfico PCA. Eixo X representa a variação PC1, que pode atingir 74% de variância e eixo Y representa a variação PC2, que pode atingir 15% de variância.

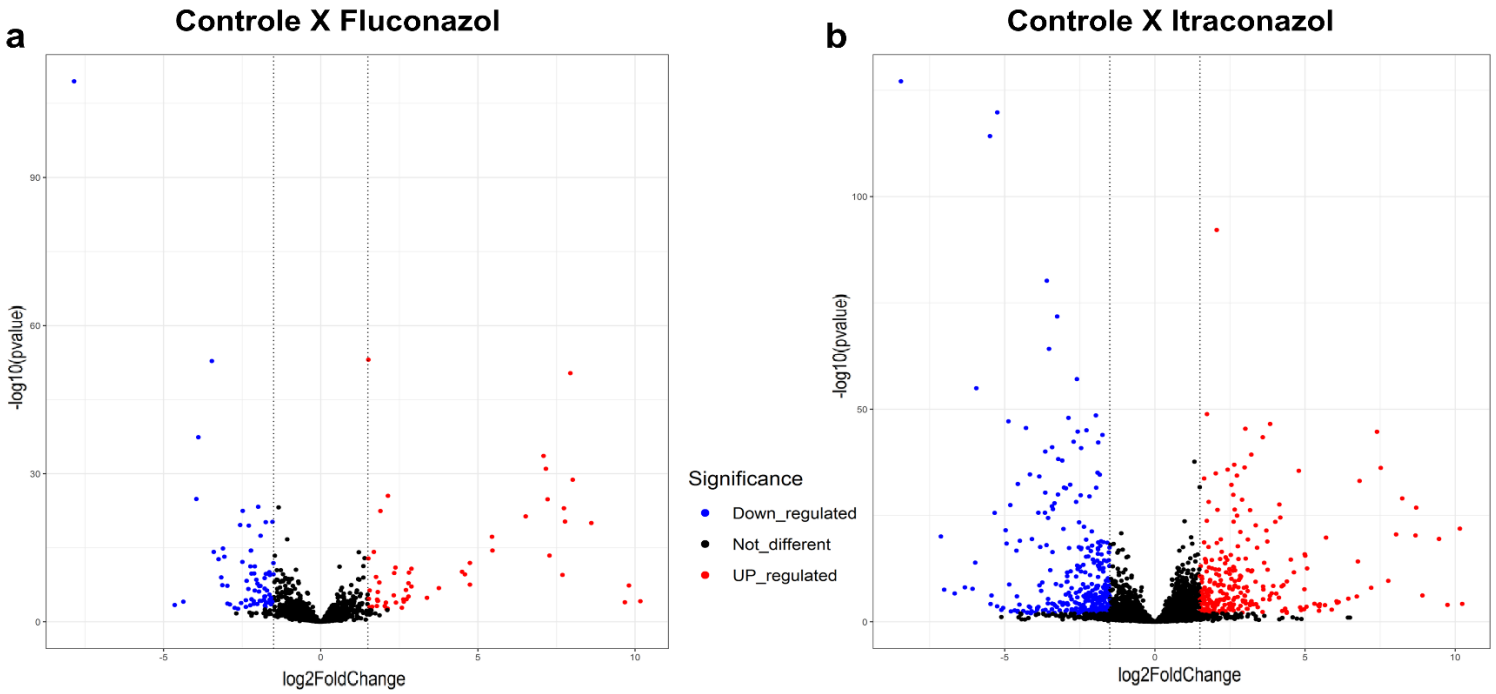


Fonte: Autor

Este gráfico tem como principal função mostrar o agrupamento entre as amostras, tendo como parâmetro os níveis de expressão de cada gene. O PCA contabiliza mais de 98% da variância do experimento. Observa-se, no gráfico, um agrupamento adequado entre as triplicatas de cada tratamento. A maior variação encontrada foi de uma amostra controle, que apresentou variação de 10% em PC2. Este valor ainda é baixo, dado que todas as outras amostras se agruparam de maneira homogênea e estão distantes do ponto em questão.

A análise de expressão diferencial é um recurso para descobrir em qual via as condições de cultivo atuaram. O gráfico do "*volcano plot*" é útil para mostrar de forma abrangente se o tratamento resultou em diferenças de expressão. A comparação entre os antifúngicos e o controle resultou em dois gráficos (Figura 10).

Figura 10: Visão geral da expressão gênica. a) volcano plot da comparação entre controle e fluconazol. A linha de threshold considerada fold change maior ou igual a 1,5 e P valor ajustado menor ou igual que 0,05. Pontos pretos mostram genes não diferencialmente expressos. Pontos vermelhos e azuis representam genes "up" e "down" regulados, respectivamente. **b)** volcano plot da comparação entre controle e itraconazol. A linha de threshold considerada fold change maior ou igual a 1,5 e P valor ajustado menor ou igual que 0,05. Pontos pretos mostram genes não diferencialmente expressos. Pontos vermelhos e azuis representam genes "up" e "down" regulados, respectivamente. **c)** tabela mostrando em números, uma visão geral da expressão. O tratamento com itraconazol gerou mais genes diferencialmente expressos que o tratamento com fluconazol.



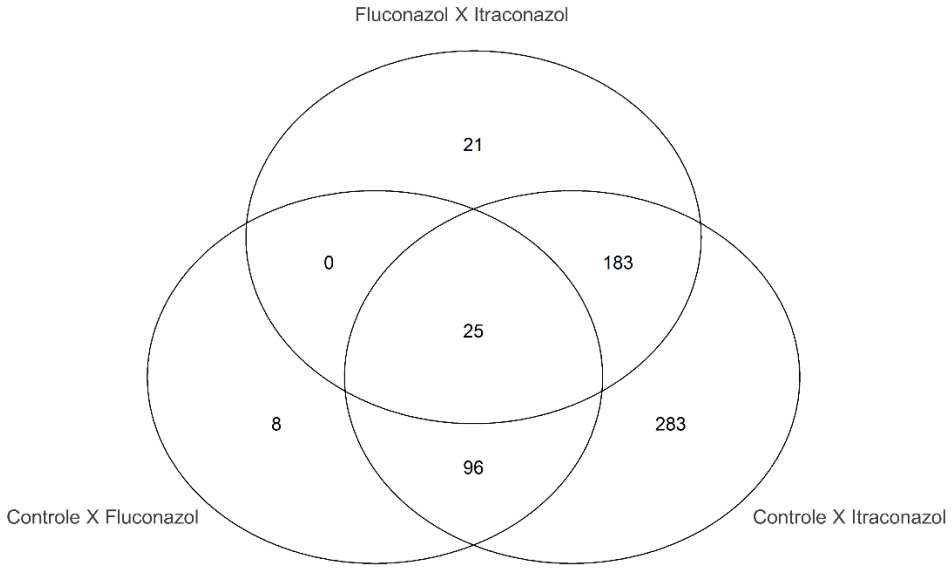
c

Tratamento	Genes Diferencialmente Expressos	Up	Down
ControlexFLC64	129	72	57
ControlexITR16	587	312	275

Fonte: Autor

É possível observar que ambos os tratamentos induziram expressão diferencial e houve mais genes diferencialmente expressos com a comparação controle versus ITR16 do que controle versus FLC64. Em números, houve 587 genes diferencialmente expressos em Controle versus ITR16 e 129 em comparações de Controle versus FLC64. O diagrama de Venn mostra a distribuição de genes diferencialmente expressos, considerando as três possíveis comparações de pares (Figura 11).

Figura 11: Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos. Apresneta as três possíveis comparações entre as amostras. É possível observar que os tratamentos com fluconazol e itraconazol juntos modularam 121 genes, quandos comparados ao controle. 283 genes foram modulados exclusivamente com itraconazol e apenas 8 foram exclusivos do fluconazol, quando comparados ao controle.



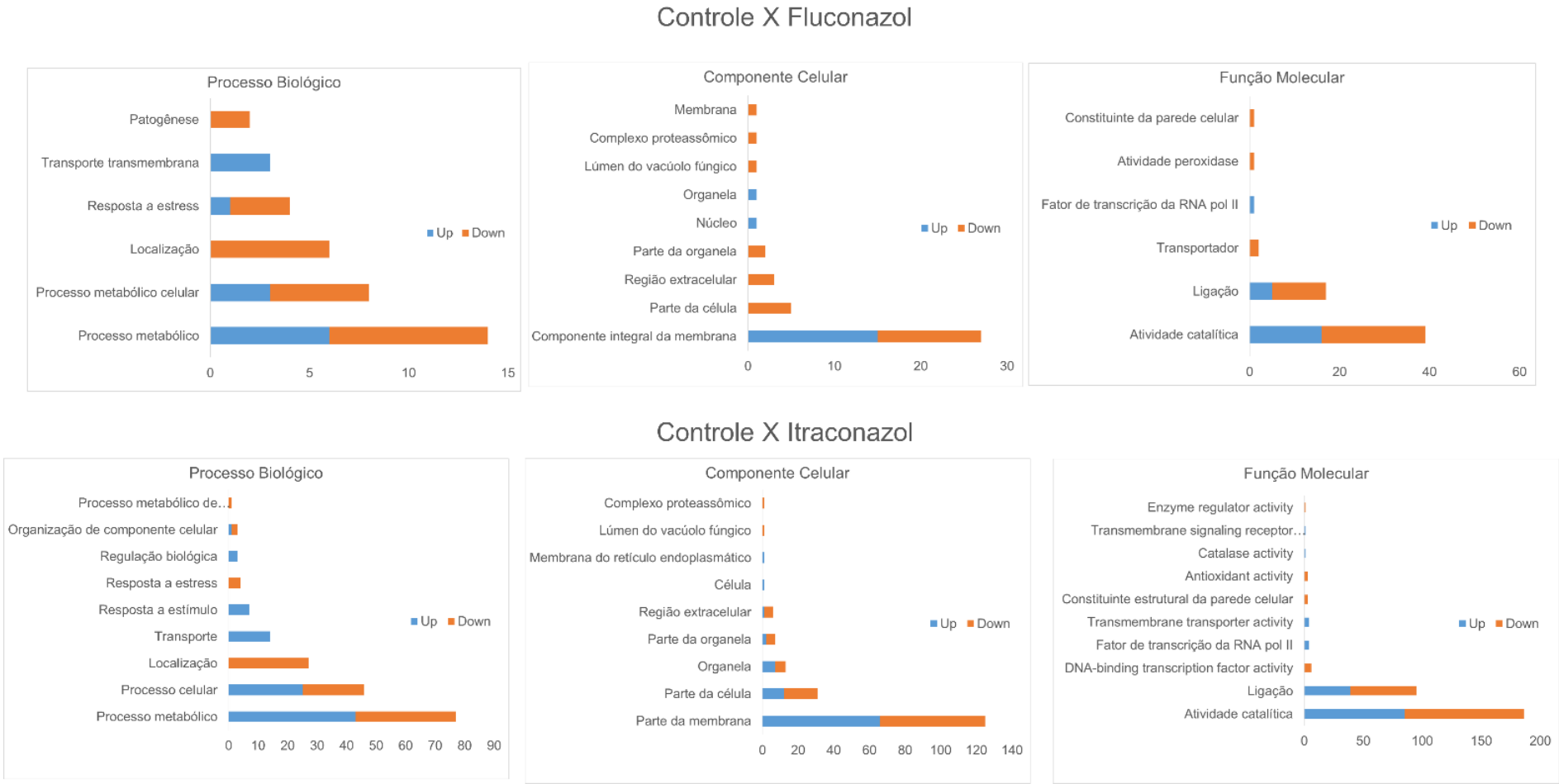
Fonte: Autor

121 genes foram diferencialmente expressos exclusivamente nas comparações controle versus FLC64 e controle versus ITR16, o que significa que os tratamentos FLC64 e ITR16 foram capazes de compartilhar a modulação desses genes. Entre estes, 96 genes foram compartilhados com as mesmas taxas de expressão para os tratamentos FLC64 e ITR16. Somente 8 genes foram expressos diferencialmente exclusivamente em FLC64 versus controle e 466 em ITR16 versus controle, o que significa que o tratamento

com itraconazol pôde modular a expressão de consideravelmente mais genes do que o fluconazol em *P. lilacinum*.

Entre os genes diferencialmente expressos, existem regulações “*up*” e “down” pelo metabolismo celular. Considerando as amostras controle como padrão para o perfil de expressão gênica, o estímulo de cada antifúngico pode promover a adaptação do metabolismo de *P. lilacinum* para ativar a via de resistência. A análise de *Gene Ontology*, realizada no site da Uniprot, é uma ferramenta para reconhecer essas modulações de expressão gênica. Esta ferramenta foi aplicada para detectar as categorias dos genes diferencialmente expressos nas amostras de tratamento (Figura 12).

Figura 12: Análise de *Gene Onthology*. Gráficos mostrando as categorias de processo biológico, componente celular e função molecular para os tratamentos com itraconazol e fluconazol. Em azul estão os genes “up” regulados e em laranja os genes “down”.



Fonte: Autor

É possível observar que, na categoria do Processo Biológico, as proteínas de transporte foram “*up*” reguladas em ambos os tratamentos, fluconazol e itraconazol. Além disso, ainda nos dois tratamentos antifúngicos, detectamos vários transcritos do citocromo P450, tanto em genes “*up*” quanto em “*down*” regulados. Especificamente, o gene citocromo P450 51 (CYP51), foi encontrado “*up*” regulado. Este gene codifica a enzima lanosterol – 1,4 – alfademetilase, alvo direto da ação dos antifúngicos “azóis”. As implicações desse gene se encontrar “*up*” regulado serão discutidas em mais detalhes posteriormente.

A análise de *Gene Ontology* revelou sete (4 “*up*” e 3 “*down*”) genes de transporte de membrana relacionados a bombas de efluxo diferencialmente expressos no tratamento com fluconazol enquanto que para itraconazol havia 23 (9 “*up*” e 14 “*down*”). Entre esses genes, os encontrados na análise de fluconazol também foram encontrados em itraconazol, com as mesmas taxas de expressão. Os genes encontrados “*up*” regulados passaram por mais análises, que serão discutidos posteriormente.

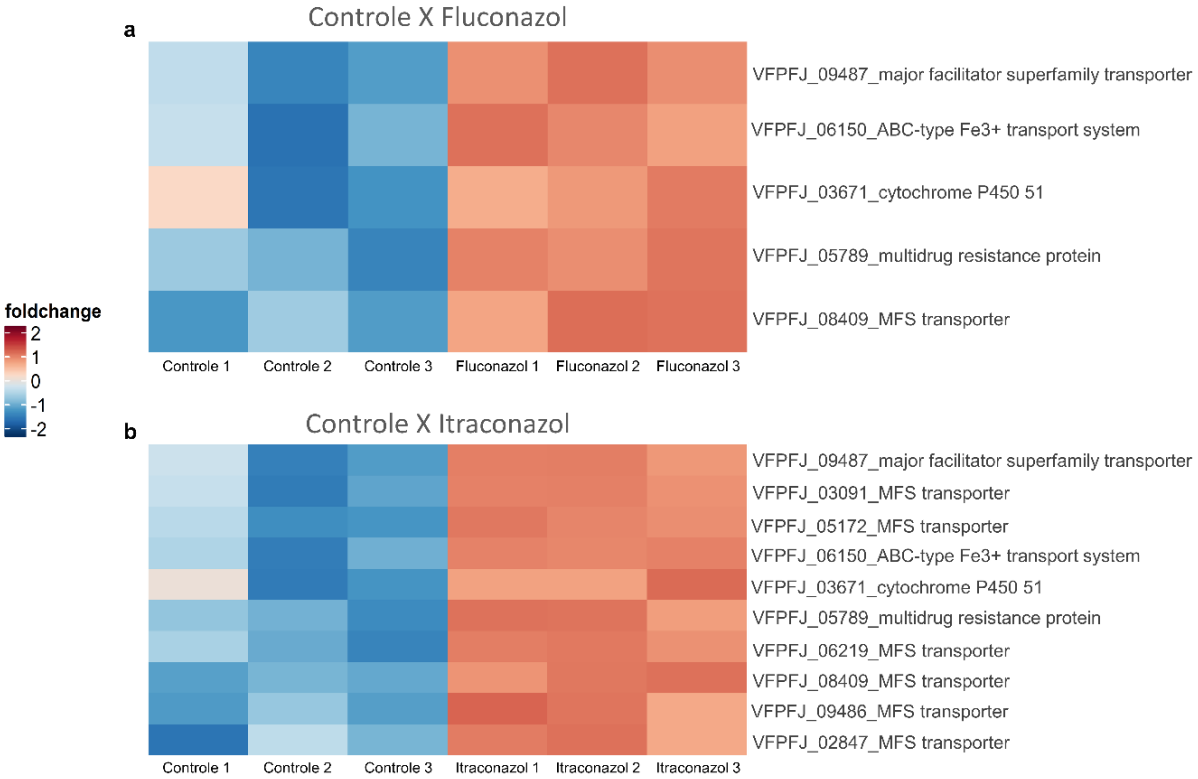
O perfil de expressão de RTA 1 também chamou nossa atenção. Houve três variantes do gene RTA 1 “*up*” reguladas no fluconazol e cinco no tratamento com itraconazol. Esse gene codifica uma proteína de membrana com 7 sítios transmembrana e está relacionada à resistência ao 7-aminocolesterol, mas parece não atuar como uma bomba de efluxo (Hokken et al., 2019 e Manente et al., 2009). Verificamos que os genes da RTA 1 são regulados nos tratamentos com fluconazol e itraconazol, e esse fenômeno parece ser uma adaptação do desequilíbrio de ferro causado pela deficiência na produção de ergosterol, típica do ataque antifúngico aos “azóis” (Hokken et al., 2019 e Manente et al., 2009). A regulação positiva dos genes RTA1 também foi observada em *A. fumigatus* desafiado com itraconazol (Hokken et al., 2019). Não está claro se as proteínas RTA 1 têm um papel direto na resistência antifúngica aos “azóis”, portanto, mais estudos seriam necessários para esclarecer esse fenômeno.

Além disso, o tratamento com itraconazol induziu genes combativos de estresse oxidativo, que não foram diferencialmente expressos no tratamento com fluconazol. Foram encontrados três genes relacionados ao mecanismo de reparo do DNA e um gene precursor da catalase. De maneira geral, como já visto anteriormente, o tratamento com

itraconazol estimulou a expressão diferencial de muito mais genes do que com fluconazol. Trabalhos anteriores com *A. fumigatus* tiveram insights sobre o potencial do itraconazol para modular os genes de expressão mais drasticamente do que outros agentes antifúngicos azólicos ou de estresse, como estresse osmótico, estresse superóxido e choque térmico (Hokken et al., 2019). É possível que as moléculas de itraconazol possam causar danos indiretos à célula, além do ataque da biossíntese do ergosterol, e o fungo resistente precise modular o padrão de expressão para restabelecer a homeostase. Apoiando essa hipótese, genes de estresse oxidativo foram encontrados mais representados no tratamento com itraconazol. O gene precursor da catalase B em itraconazol foi observado 1,76 vezes mais expresso que o controle. Os genes da catalase são descritos como uma ferramenta para superar situações de estresse oxidativo em células fúngicas (Pradhan et al., 2017). Os três genes relacionados ao reparo do DNA apareceram "*up*" regulados. Estudos anteriores relataram máquinas de reparo de DNA recrutadas em situações de estresse oxidativo alto o suficiente para causar danos ao DNA em *S. cereviseae* (Chalissery et al., 2017).

A análise de *Gene Onthology* resultou em duas categorias destacadas de genes diferencialmente expressos: a via de biossíntese de ergosterol e genes de transporte de membrana. Para entender melhor o quão dramáticas foram essas modulações, construímos heatmaps a partir de dados de expressão normalizados obtidos no pacote DESeq2 (Figura 13).

Figura 13: Heatmaps dos genes relacionados com resistência a antifúngicos. A escala de cores representa os números de fold change. **a)** comparação entre controle e fluconazol. **b)** comparação entre controle e itraconazol



Fonte: Autor

Considerando as amostras controle como referência, o gene VFPFJ_03671 (ID do banco de dados EnsemblFungi: https://fungi.ensembl.org) anotado como Citocromo P450 51 (aqui chamado CYP51) mostrou-se regulado em ambos os tratamentos, com os valores de *Fold change* 1,52 e 1,6 para fluconazol e itraconazol respectivamente . Este gene foi selecionado para quantificar a expressão por RT-qPCR para validação de resultados RNAseq.

Baseados no conhecimento genético de outros fungos, como *A. fumigatus*, que possui dois genes do tipo CYP51, procuramos outro gene homólogo do CYP51 no genoma de *P. lilacinum* e encontramos a variante VFPFJ_03164. Verificamos o seu perfil de expressão e concluímos que não estava na lista de genes diferencialmente expressos devido ao seu valor de *P* ajustado, que era maior que 0,05. O valor de Transcritos por Milhão (TPM) de cada amostra é representado pela Tabela 3.

Tabela 3: valores de expressão do gene VFPFJ_03164 em cada amostra.

Amostra	Valor TPM
Controle 1	954,37
Controle 2	42,62
Controle 3	121,04
Fluconazol 1	2.298,49
Fluconazol 2	2.138,86
Fluconazol 3	2.202,8
Itraconazol 1	2.582,6
Itraconazol 2	2.553,79
Itraconazol 3	2.935,65

Fonte: Autor

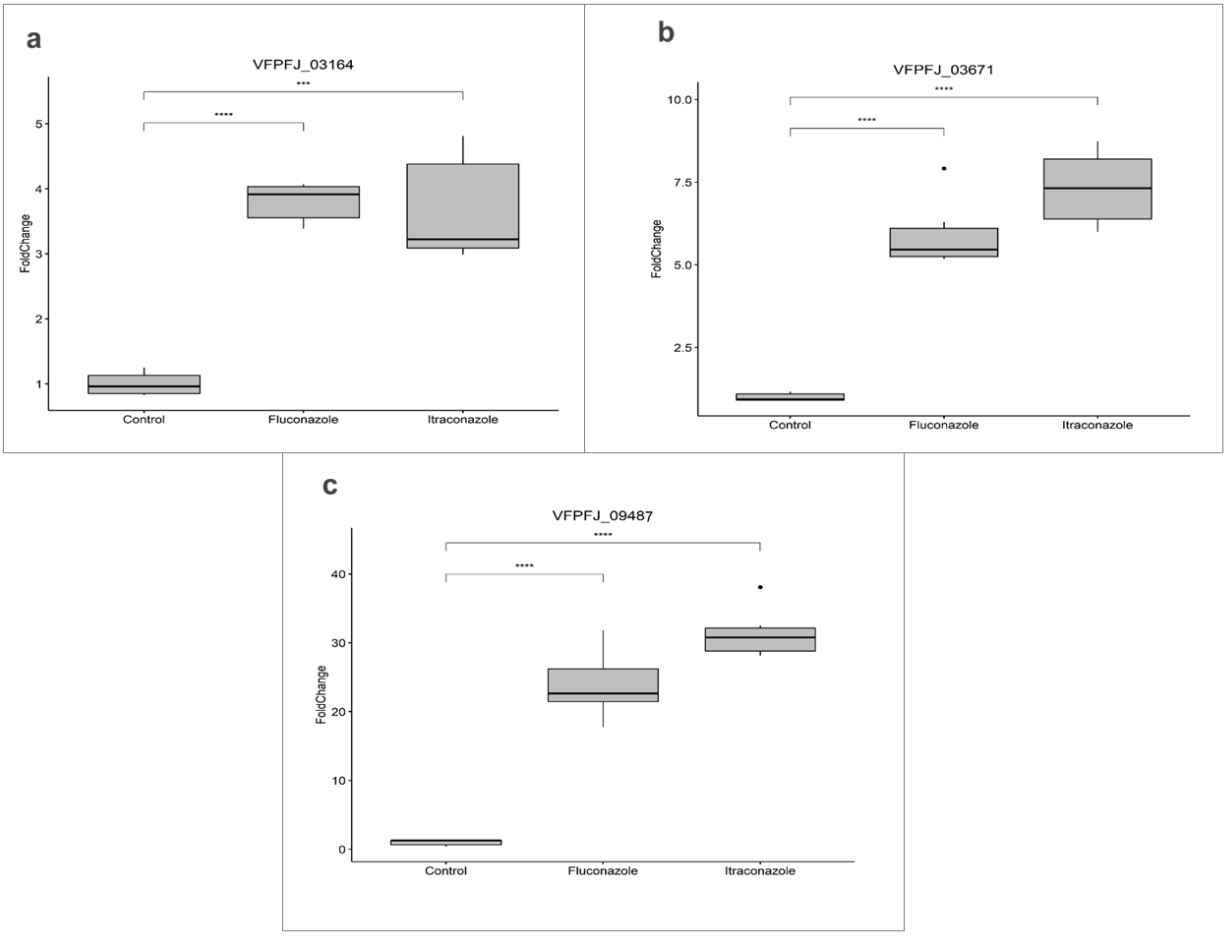
Fazendo uma análise específica para este gene, porém, observa-se que a grande variação dentro da triplicata das amostras de controle afetou a análise, ou seja, os valores 954,37, 42,62 e 121,04 variam muito entre si, o que reflete em um agrupamento estatisticamente pobre. Quando se observam os resultados dos tratamentos, é possível inferir que houve um considerável aumento da expressão de VFPFJ_03164 tanto no tratamento com fluconazol quanto no itraconazol. Considerando essas situações, selecionamos a variante VFPFJ_03164 para a quantificação da expressão por RT-qPCR para uma validação da tendência observada.

O gene VFPFJ_09487, anotado como um importante transportador de membrana "*Major Facilitator Superfamily transporter*" (MFS), apareceu regulado em ambas as amostras de tratamento. Neste caso, os valores de *Fold Change* foram de 1,74 e 1,78 para fluconazol e itraconazol, respectivamente. Outros genes para o transporte de membranas também foram encontrados regulados, como proteína *Multidrug Resistant* (MDR) e sistema de transporte do tipo ABC Fe^{3+} (ABC), mas apresentaram diferenças de *Fold Change* mais modestas. Dentre os genes codificadores de proteínas de efluxo, escolhemos o gene VFPFJ_09487 como representante das bombas de efluxo para a validação da expressão RT-qPCR.

3.3.3. qRT-PCR dos genes selecionados

Os resultados de RNAseq culminaram na hipótese de aumento da expressão gênica no CYP51 e nas proteínas transportadoras de membrana. Realizamos um experimento RT-qPCR para validar alguns genes selecionados, descritos acima (Figura 13).

Figura 14: Análises de RT-qPCR. Box plots dos genes selecionados VFPFJ_03164, VFPFJ_03671 and VFPFJ_09487. O eixo Y mostra os valores de fold change, tendo a amostra controle como referência dos níveis de expressão. Cada asterisco representa a multiplicação de 0,5x10-1 aos P valores encontrados. **a)** expressão do gene VFPFJ_03164 (CYP51) nas amostras controle, fluconazol e itraconazol. **b)** expressão do gene VFPFJ_03671 (CYP51b) nas amostras controle, fluconazol e itraconazol. **c)** expressão do gene VFPFJ_09487 (major facilitator superfamily transporter gene) nas amostras controle, fluconazol e itraconazol. Todas as comparações com o controle mostraram expressão diferencial com respaldo estatístico. As reações foram detectadas pelo reagente "SYBR® Green PCR Master Mix.



Fonte: Autor

É possível confirmar que VFPFJ_03671, VFPFJ_03164 e VFPFJ_09487 foram regulados após 12 horas da adição de antifúngicos. O *Fold Change* calculado para VFPFJ_03671 foi de 6,0 contra fluconazol e de 7,3 contra itraconazol; para VFPFJ_03164 foram 23,9 contra fluconazol e 31,5 contra itraconazol e para VFPFJ_09487 os valores foram 3,8 contra fluconazol e 3,7 contra itraconazol. O valor de P calculado em todas as comparações foi menor que 0,0005, o que significa confiança estatística. Sendo assim, as validações realizadas com os três genes selecionados corroboraram os dados transcriptômicos. Ficou evidente que, nas condições testadas, o fungo aumentou a expressão tanto da enzima alvo de ação dos antifúngicos quanto de proteínas de membrana que podem trabalhar como bombas de efluxo dessas moléculas antifúngicas.

Como uma análise de amplo espectro, o estudo transcriptômico de *P. lilacinum*, expressando resistência a antifúngicos após 12 horas de adição de antifúngicos, mostrou que o fungo ativou mecanismos de resistência para se manter vivo. A superexpressão da enzima alvo dos antifúngicos “azóis”, CYP51, é uma estratégia descrita em *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus fumigatus* (Sanglard et al., 1998; Kontoyiannis et al., 1999 e Srinivasan et al., 2014). Organismos capazes de aumentar seu nível de expressão de CYP51 podem se tornar resistentes a um amplo espectro de antifúngicos “azóis” (Chamilos et al., 2005). Por uma razão estequiométrica, com mais enzima sendo produzida, seriam necessárias maiores concentrações intracelulares de antifúngico para causar morbidade ou mortalidade do fungos (Scorzoni et al., 2017). Somando-se ao fato de que a dose máxima de fármacos destes antifúngicos “azóis” para administração em humanos é limitada, explica-se a falta de respostas clínicas em alguns casos relatados de infecção por *P. lilacinum* (Pastor e Guarro, 2006).

Nossos resultados mostraram o aumento da expressão de genes codificadores de bombas de efluxo. Sabe-se que a expressão de proteínas de transporte transmembrana pode ser uma arma contra moléculas antifúngicas. Existem diferentes tipos de proteínas de bomba de efluxo capazes de detectar a molécula antifúngica e expulsá-la para o ambiente extracelular (Prasad e Rawal, 2014). As proteínas cassete de ligação ao ATP (ABC) e MFS são amplamente descritas como parte do mecanismo

de resistência antifúngica para *C. albicans*, *A. fumigatus*, *Trichophyton rubrum* e *Cryptococcus neoformans* (Srinivasan et al., 2014; Scorzoni et al., 2017; Prasad e Rawal, 2014). Assim, sugerimos que a *P. lilacinum* pode modular seu metabolismo para aumentar o número de bombas de efluxo, o que poderia ajudar a resistência antifúngica.

Uma consideração importante é que este estudo foi realizado em situações específicas, isto é, após 12 horas de injeção de fluconazol (64 µg / mL) e de itraconazol (16 µg / mL). Outras condições, principalmente outros tempos de exposição aos antifúngicos, poderiam revelar perfis metabólicos distintos. É possível, e esperado, que outros genes relacionados à resistência antifúngica sejam ativados ou silenciados. Por exemplo, encontramos 210 MFS, 47 transportadores ABC e 20 genes MDR expressos nas condições testadas. Espera-se que seu perfil de expressão varie constantemente, dependendo do tempo do bioprocesso. Assim, embora esses achados mostrem uma explicação razoável para o fenômeno da resistência a *P. lilacinum*, mais estudos são necessários para descrever o completo arsenal de mecanismos moleculares que fornecem resistência antifúngica ao longo do tempo.

Quando há um aumento na concentração celular de CYP51 e bombas de efluxo, as células de *P. lilacinum* melhoram a capacidade de superar os danos dos antifúngicos. O conhecimento deste mecanismo é importante para elaborar novas estratégias terapêuticas. Por exemplo, quando é possível desenvolver um tratamento local, com concentrações antifúngicas mais elevadas, há relatos de sucesso no tratamento de infecções causadar por *P. lilacinum* aplicando antifúngicos convencionais, como o itraconazol (Pastor e Garro, 2006). Esses casos sugerem que as concentrações de antifúngicos superaram a capacidade fúngica de expelir a droga, que atinge uma concentração intracelular letal, culminando no sucesso do tratamento. Esta informação será importante em situações futuras de infecção por *P. lilacinum*, por exemplo, para apoiar o poder de decisão sobre estratégias de tratamento.

3.4. Estudos proteômicos

O transcriptoma anotado de *P. lilacinum*, analisado *de novo* (descrito no capítulo 2), foi útil para a produção de um banco de dados local, aplicado ao software MASCOT,

para análise dos dados proteômicos. Os resultados de análise do proteoma intracelular foram então gerados.

Os experimentos realizados no equipamento ESI-QUAD-TOF têm teor qualitativo e quantitativo. O número de peptídeos gerados foi de 1280 para o controle, 1051 para fluconazol e 1231 para itraconazol. Os arquivos contendo esses peptídeos passaram por análise no MASCOT, que fez a associação com o banco de dados local e identificou as proteínas das amostras. Os resultados desta análise estão representados na Tabela 1; contendo o nome da proteína identificada e seu código no Uniprot. O código Uniprot é referente ao que foi anotado com as sequências do transcriptoma.

Tabela 4: Tabela Proteoma: Tabela resultado das análises proteômicas contendo nome da proteína identificada e seu código no Uniprot.

Proteína anotada	Código Uniprot
Probable 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	METE_SCHPO
Elongation factor 2	EF2_NEUCR
14-3-3 protein homolog	1433_TRIHA
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2	6PGD2_YEAST
Acryloyl-coenzyme A reductase	ACAR_METS5
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	6PGD_SCHPO
Probable ATP-citrate synthase subunit 2	ACL2_SCHPO
Chromatin modification-related protein EAF1	AEF1_GIBZE
ADP,ATP carrier protein	ADT_NEUCR
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPA_NEUCR
Acyl-CoA-binding domain-containing protein 6	ACBP
Probable ATP-citrate synthase subunit 1	ACL1_NEUCR
Major allergen Asp f 2	ALL2_ASPFU
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_NEUCR
Separin	BIMB_EMENI
E3 ubiquitin-protein ligase BRE1	BRE1_GIBZE
Calnexin homolog ARB_00147	CALX_ARTBC
Cytochrome P450 76C3	C76C3_ARATH

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, mitochondrial	CYPH_NEUCR
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH10_SCHPO
Uncharacterized protein C29B12.08	Clr5
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	CYPH_SCHPO
Diaminopropionate ammonia-lyase	DPAL_ECOLI
Uncharacterized nucleolar protein C630.06c	DUF2011
Leucoanthocyanidin dioxygenase	DIOX_N
Ribonuclease P protein component	DUF2285
Elongation factor 1-alpha	EF1A_HELZE
Elongation factor 1-alpha 1	EF1A1_RABIT
Elongation factor 1-alpha	EF1A_PODAS
Sterol 24-C-methyltransferase erg-4	ERG6_NEUCR
Elongation factor 3	EF3_SCHPO
Elongation factor 1-gamma 1	EF1G1_YEAST
Enolase	ENO_NEUCR
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_CLAP2
Histone H2A	H2A_BOTFB
Fatty acid synthase subunit alpha	FAS2_PENPA
Histone H3	H3_NEUCR
Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 2	FMO2_RABIT
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_NEUCR
Glycophorin-A	Glycophorin_A
Histone H4.2	H42_TALFU
Vegetative incompatibility protein HET-E-1	HETE1_PODAS
Histone H2A	H2A_BOTFB
Histone H4	H4_ASPOR
Histone H4	H4_NEUCR
Histone H4.2	H42_TALFU
Heat shock 70 kDa protein	HSP70_NEUCR
Major heat shock 70 kDa protein Ab	HSP71_DROME
Heat shock protein 90 homolog	HSP90_PODAS

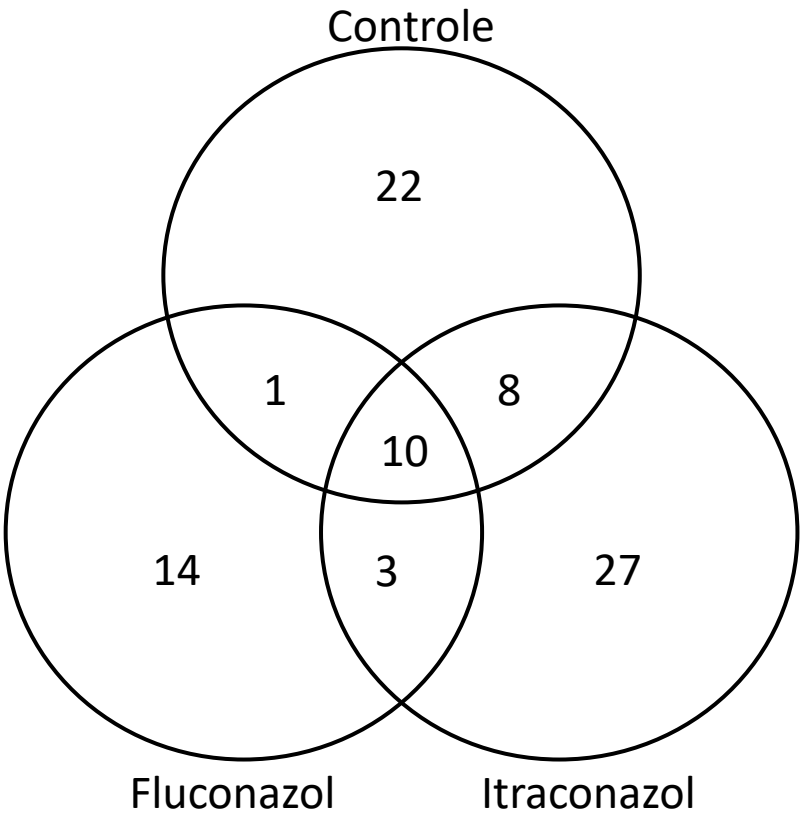
ATP-dependent RNA helicase eIF4A	IF4A_MAGO7
DNA replication licensing factor mcm3	MCM3_SCHPO
Midasin	MDN1_YEAST
Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDHM_SCHPO
Myosin type-2 heavy chain 1	MYO2_SCHPO
Nucleoside diphosphate kinase	NDK_ASPFU
Endonuclease III homolog	NTH_EMENI
Protein disulfide-isomerase	PDI_HUMIN
Phosphate-repressible phosphate permease pho-4	PHO4_NEUCR
Phosphoglycerate kinase	PGK_HYPJE
Putative peroxiredoxin prxA	PMP20_EMENI
60S ribosomal protein L14-A	RL14A_YEAST
60S ribosomal protein L19-2	RL192_ARATH
60S ribosomal protein L25	RL25_PUCGR
60S ribosomal protein L5	RL5_NEUCR
60S ribosomal protein L7	RL7_NEUCR
40S ribosomal protein S18-B	RS18B_YEAST
40S ribosomal protein S2	RS2_YEAST
40S ribosomal protein S1	RS3A_NECH7
40S ribosomal protein S3	RS3_SCHPO
40S ribosomal protein S5	RS5_NEUCR
40S ribosomal protein S6	RS6_DEBHA
Adenosylhomocysteinase	SAHH_CANAL
Helicase SEN1	SEN1_YEAST
Phosphatidylinositol transfer protein sfh5	SFH5_SCLS1
Protein sly1	SLY1_SCHPO
Phospholipase D1	SPO14_YEAST
Serine/threonine-protein kinase srk1	SRK1_SCHPO
Transaldolase	TAL1_FUSO4
Tubulin beta chain	TBB_METAN
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim54	TIM54_NEUCR

Transketolase	TKT1_KLULA
Relaxosome protein TraY	TraY
Uncharacterized aminotransferase C1771.03c	YGD3_SCHPO
Uncharacterized protein YJR142W	YJ9J_YEAST
Uncharacterized peptidase C18A7.01	YOD1_SCHPO

Fonte: Autor

Foram identificadas 85 proteínas diferentes. Pela análise, é possível observar que há expressão diferencial entre os tratamentos (Figura 15).

Figura 15: Diagrama de Venn dos dados proteômicos: Observa-se um total de 41 proteínas diferentes expressas em controle, 28 em fluconazol e 48 em itraconazol. Observa-se que apenas 3 proteínas foram expressas exclusivamente nas condições com antifúngico.



Fonte: Autor

Pode-se observar que a maioria das proteínas são específicas de cada condição e que apenas 3 proteínas foram exclusivamente expressas nos cultivos com antifúngicos.

O número geral de proteínas identificadas é consideravelmente baixo quando comparado aos dados de transcriptoma. As 85 proteínas identificadas representam menos de 0,2 % dos 44.808 genes identificados no transcriptoma. A divergência entre os resultados é muito grande e aparentemente os experimentos proteômicos sofreram com algum artefato de técnica. O número de peptídeos gerado por amostra é consideravelmente baixo, pois trata-se de uma amostra complexa, carregada com 150 µg de proteínas digeridas.

Os cultivos e pontos de coleta de amostra foram exatamente os mesmos para transcriptoma e proteoma, portanto, poderia estar acontecendo algum problema no proteoma, visto que o equipamento, apesar de possuir sensibilidade, não mostrou resultados satisfatórios. Na mesma época de nossas análises, recebemos a informação que o equipamento utilizado apresentava problemas de sensibilidade. Estes experimentos serão, portanto, revisados para que se proponha uma solução capaz de viabilizar estudos proteômicos de maior qualidade e confiança.

Desconsiderando os dados de expressão diferencial do proteoma, algumas proteínas identificadas chamaram a atenção, por participarem de vias que podem estar sendo afetadas pelos tratamentos com antifúngicos. Elas aparecem na tabela 1 em cinza. ACBP e ERG6_NEUCR são proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos, que deve ser afetado com a presença de antifúngicos. Mais especificamente, ERG6_NEUCR participa da via de ergosterol e sua expressão diferencial na presença de antifúngicos pode estar atrelada ao desenvolvimento de resistência (Alcazar-Fuoli e Mellado, 2012). ALL2_ASPFU é uma proteína caracterizada em *A. fumigatus* que exerce papel de indutor de alergia em doenças humanas e pode desencadear um papel importante na patogenicidade também em *P. lilacinum* (Banerjee *et.* al, 1998).

Com o ajuste das técnicas envolvidas no estudo proteômico, será possível estabelecer muitas outras conexões entre a expressão diferencial de proteínas que participam ativamente e indiretamente do processo de resistência aos antifúngicos fluconazol e itraconazol, assim como foi feito com os estudos transcriptômicos.

4. Conclusões

O presente trabalho mostra como *P. lilacinum* apresenta mecanismos de resistência contra fluconazol e itraconazol. Os achados expandem esses conhecimentos para patógenos emergentes, além do que se sabe para *Aspergillus*, *Cryptococcus* e *Candida*. Mais estudos são necessários para melhor entender o processo de resistência. A associação com os dados de proteômica que serão gerados será importante para corroborar os dados transcriptômicos.

Apesar disso, um alerta deve ser feito, afinal, o aumento de espécies resistentes a antifúngicos parece estar intimamente correlacionado com o aumento do uso de antifúngicos na agricultura (Chowdhary et al., 2013). Sendo assim, uma reflexão sobre como reduzir a geração dessas espécies resistentes parece ser tão importante quanto como lutar contra as espécies que já apresentam essa resistência.

Capítulo 2

P. lilacinum e suas peptidases

Lista de figuras

Figura 16: Mapa e região de múltipla clonagem do vetor pPICZα-A.. 66
Figura 17: Gel SDS-PAGE 12 % corado com nitrato de prata:. 74
Figura 18: Panorama de peptidases produzidas por *P. lilacinum*. 77
Figura 19: Sequência de aminoácidos e domínios conservados da serino peptidase. 78
Figura 20: Domínios conservados da metalo peptidase. 79
Figura 21: Caracterização do gene *Pl*_SerPep e sua tradução *in silico*...... 80
Figura 22: Colônias de *P. pastoris* transformadas com pPICZα-*Pl*_SerPep...... 81
Figura 23: *Screening* de colônias produtoras da r*Pl*_SerPep...... 82
Figura 24: Curva de expressão da colônia 11. 83
Figura 25: Curva cromatográfica da r*Pl*_SerPep...... 84
Figura 26: Teste de pureza da r*Pl*_SerPep...... 84
Figura 27: Curva de pH...... 86
Figura 28: Curva de temperatura...... 87
Figura 29: Curva de estabilidade ao pH. 91
Figura 30: Curva de estabilidade à temperatura.. 92
Figura 31: Representações gráficas dos resultados de SAXS. 94
Figura 32: Representação espacial do modelo gerado por SAXS..... 95
Figura 33: Caracterização do gene *Pl*_MetPep e sua tradução *in silico*.. 97
Figura 34: Colônias de *P. pastoris* transformadas com pPICZα-*Pl*_MetPep. 98
Figura 35: *Screening* de colônias produtoras da r*Pl*_MetPep. 99
Figura 36: Curva de expressão da colônia 12. 100
Figura 37: Curva cromatográfica da r*Pl*_MetPep. 101
Figura 38: Teste de pureza da r*Pl*_MetPep. 101
Figura 39: Curva de pH...... 102
Figura 40: Curva de temperatura...... 103

Lista de tabelas

Tabela 5: Teste de interferência de íons.. 88
Tabela 6: Influência de surfactantes. 89
Tabela 7: Influência de agentes caotrópicos..... 90
Tabela 8: Dados de SAXS sumarizados..... 93

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

EB	Extrato Bruto
EBC	Extrato Bruto Concentrado
TFA	Ácido trifluoroacético
ORF	Open Read Frame
AOX1	Gene da álcool oxidase 1
AOX2	Gene da ácool oxidase 2
His	Histidina
pPICZα-A	Plasmídeo de expressão em *Pichia pastoris*
TGA	Códon de terminação da tradução
YPD	Yeast Peptone Dextrose
YPDS	Yeast Peptone Dextrose Sorbitol
BMGY	Buffered Medium Glycerol Yeast
BMMY	Buffered Medium Methanol Yeast
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
DTT	ditiotreitol
SAXS	Small Angle X-ray Scattering
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
FRET	peptídicos sintéticos com supressão intramolecular de fluorescência
mAU	Mili Absorbance Unit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PFAM	Protein Family Database
DSD-PAGE	Eletroforese em Gel de Poli Acrilamida napresença de SDS
α	Alfa
μ	Micro
λ	Comprimento de onda
θ	Teta

Resumo

O mercado de enzimas se encontra em plena expansão e apresenta grande potencial de agregar valor às soluções de problemas encontrados pela sociedade atualmente. Para que essa expansão de mercado se concretize, muito tem se investido em pesquisa e desenvolvimento dessa área. Hoje, o foco da pesquisa está em encontrar ou desenvolver enzimas cada vez mais eficientes para os processos industriais. As peptidases são as enzimas mais aplicadas na indústria na atualidade. *Purpureocillium lilacinum* produz peptidases como parte de seu arsenal de virulência contra nematoides. Estudos preliminares em nosso grupo identificaram duas peptidases nativas do fungo com capacidade de degradação de colágeno. Os estudos transcriptômicos realizados foram analisados *de novo* para prospecção de peptidases com potencial de aplicação biotecnológico. Duas peptidases foram selecionadas para expressão recombinante, uma serino peptidase (r*Pl*_SerPep) e uma metalo peptidase (r*Pl*_MetPep). A serino peptidase se apresentou como peptidase básica e com resistência a um amplo espectro de pHs e temperaturas. Um estudo de resolução do envelope molecular foi realizado e mostrou que a enzima é globular e apresenta um prolongamento, referente ao inibidor I9. Foi visto que ureia a 100 mM promove ativação substancial na enzima. A metalo peptidase se apresentou como neutra e com temperatura ótima aparente de 40 °C. Essas enzimas mostraram potencial de aplicação biotecnológica e passarão por mais caracterizações e testes de aplicação futuramente.

Abstract

The enzyme market is in full expansion and presents great potential to add value to solutions to problems encountered by society today. For this market expansion to take place, much research and development has been invested in this area. Today, the focus of the research is on finding or developing enzymes that are increasingly efficient for industrial processes. Peptidases are the most applied enzymes in the industry today. *Purpureocillium lilacinum* produces peptidases as part of its arsenal of virulence against nematodes. Preliminary studies in our group showed two peptidases among the native secreted enzymes. The transcriptomic studies performed were again analyzed for the prospection of peptidases with potential for biotechnological application. Two peptidases were selected for recombinant expression, a serine peptidase (r*Pl*_SerPep) and a metal peptidase (r*Pl*_MetPep). Serine peptidase was presented as basic peptidase and with resistance to a broad spectrum of pHs and temperatures. A molecular envelope resolution study was performed and showed that the enzyme is globular and has an extension, related to inhibitor I9. It has been found that urea at 100 mM promotes substantial activation in the enzyme. The metal peptidase was presented as neutral and with an apparent optimum temperature of 40 ° C. These enzymes showed potential for biotechnology application and will undergo further characterization and application testing in the future.

1. Introdução

O avanço da biotecnologia tem gerado muito valor à sociedade. Hoje, este é um mercado que capitaliza anualmente em torno de 700 bilhões de dólares (Statista, 2019). Mais do que gerar riqueza, as soluções biotecnológicas têm se desenvolvido para a melhoria da qualidade de vida da população, em geral. Os avanços passam pelas áreas da saúde humana e animal, melhorias de processos agrícolas, desenvolvimento de bebidas e alimentos, produção de energia, tratamento de poluição e outros. Em todos esses ramos, de maneira direta ou indireta, as enzimas são fundamentais para o desenvolvimento de tecnologia.

O mercado mundial de enzimas industriais já é bem estabelecido e projeta crescimento de 6,83% até 2024 (Mordor Intelligence, 2019). Embasando este crescimento, está o grande investimento em pesquisa e desenvolvimento, tanto para encontrar novas enzimas, como para melhorar a eficiência das já existentes. Um exemplo da importância desse tema é o prêmio Nobel de química de 2018, que foi dado aos pesquisadores Sir Gregory P. Winter, Frances H. Arnold e George P. Smith, cujas pesquisas englobam desenvolvimento de enzimas aplicadas à química verde e processos de produção de peptídeos (Lopes, 2018).

A aplicação de enzimas como agentes de processos, ou mesmo como produto final, já é abrangente e tende a crescer. As enzimas têm sido aplicadas nos diversos processos, como: indústria de papel e celulose, couro, têxtil, química fina, farmacêutica, detergentes, cosméticos, alimentícia, de bebidas, alimentação animal, de biocombustível e de biodiesel (Sharma et al., 2019). As peptidases, mais especificamente, estão inseridas nas indústrias de detergentes e cosméticos; alimentícia e de bebidas; alimentação animal e beneficiamento de couro (Sharma et al., 2019).

A indústria de enzimas se estruturou e desenvolveu com a produção hegemônica de enzimas microbianas. Nesse contexto, as enzimas fúngicas apresentam elevado potencial de aplicação, dado que os fungos conseguem habitar ambientes que os desafiam a desenvolver enzimas robustas (Visser et al., 2011). O processo de

decomposição de matéria orgânica, por exemplo, atingir altas temperaturas naturalmente e exige enzimas termotolerantes (Sharma et al., 2019).

Purpureocilium lilacinum tem sido relatado como produtor de enzimas robustas e eficientes como fatores de virulência. Essas enzimas desestruturam membranas de defesa, como o ovo de nematoides, e viabilizam a infecção fúngica (Wang et al., 2010). Associando-se esses fatos com alta adaptabilidade de *P. lilacinum* aos mais diversos ambientes, vislumbra-se um potencial de exploração biotecnológica dessas enzimas.

Estudos preliminares em nosso grupo de pesquisa mostraram que, ao ser cultivado em meio mínimo suplementado com farinha de pena, *P. lilacinum* foi capaz de expressar e secretar peptidases. O trabalho descreveu, mais especificamente, duas peptidases, sendo uma serino e uma metalo peptidase (Giovanini, 2014). As enzimas apresentaram potencial de aplicação biotecnológico. O gargalo do trabalho foi obter um rendimento de purificação adequado para as enzimas estudadas, deixando claro que a expressão recombinante dessas enzimas poderia superar esta dificuldade.

O presente capítulo se dedica ao estudo molecular de *P. lilacinum* com o objetivo de prospecção destas proteases e posterior expressão recombinante, para avaliação do real potencial de aplicação industrial dessas enzimas.

2. Material e métodos

2.1. Estudo de peptidases nativas

Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa identificou a atividade de duas peptidases produzidas por *P. lilacinum*, uma serino e uma metalo peptidase. Com o objetivo de se identificar as sequências dessas peptidases e então produzi-las de maneira recombinante nos propomos a realizar o bioprocesso indutivo de expressão, a purificação e a espectrometria de massas delas. O resultado dessas análises serviu para direcionar a prospecção de sequências no banco de dados genético criado para *P. lilacinum*.

2.1.1. Cultivo de *P. lilacinum*

Todo o bioprocesso indutor da produção de peptidases foi otimizado por um membro do laboratório em seu mestrado (Giovanini, 2014). A primeira etapa do processo consiste em preparar cultivos sólidos para expansão e esporulação do fungo, como descrito em “Meio de esporulação” do capítulo 1. De acordo com o rendimento desse teste foram necessárias 21 placas de esporulação. Elas foram preparadas e incubadas por 10 dias a 30 °C. A extração e quantificação de esporos foram realizadas, como também descrito no mesmo item, e a solução de esporos foi diluída para a concentração de $5x10^5$ esporos/mL de solução.

O meio de cultura utilizado líquido é constituído de 0,7% de K_2HPO_4; 0,2% de KH_2PO_4; 0,01% de $MgSO_4.7H_2O$; 0,01% de $CaCl_2.2H_2O$; 0,05% de citrato.$2H_2O$; 1% de peptona e 0,4% de Farinha de Pena; ajustado para o pH 6,0. Os componentes foram homogeneizados (a farinha de pena fica em suspensão) e o meio foi esterelizado por 15 min, 121 °C ou 1,5 atm. Foram produzidos 1,5 L de meio de cultivo, distribuídos por 30 Erlenmeyers de 250 mL (50 mL por Erlenmeyer).

O inóculo foi realizado com a adição de 1 mL de solução de esporos (concentração de $5x10^5$ esporos/mL) por frasco. O bioprocesso foi mantido a 30 °C, agitado a 120 rpm por 72h, pois esse é o pico de produção das peptidases de interesse, como descrito por Giovanini, 2014. Após esse período, a purificação das peptidases foi iniciada.

2.1.2. Purificação de peptidases selvagens

O primeiro passo, portanto, foi a filtração do material em papel qualitativo (Unifil) para separação entre massa micelial e meio de cultivo, aqui chamado de Extrato Bruto (EB). A fração de nosso interesse está no EB, pois as enzimas são secretadas por *P. lilacinum*. O EB foi centrifugado a 20000 x *g* por 10 min. e 4 °C para maior clarificação do meio.

Considerando que o volume total de produção foi 1,5 L, optou-se por uma etapa de concentração do EB para diminuição do volume de trabalho. O equipamento utilizado foi o Easy Load Masterflex VP, em coluna Hollow Fiber Cartridge de 10000 NMWC (GE

life science). O processo de concentração de amostra seguiu até que atingisse a taxa de aproximadamente 4 vezes de concentração. Essa amostra foi denominada Extrato Bruto Concentrado (EBC).

Giovanini, 2014 detectou a presença de duas peptidases de diferentes subclasses nesse tipo de produção; uma serino peptidase e uma metalo peptidase. Sendo assim, foram traçadas duas estratégias distintas de purificação. Para a obtenção da serino peptidase, foram realizadas cromatografias de gel filtração de fase reversa. Já para a purificação da metalo peptidase, foram aplicadas trocas iônicas com colunas catiônicas e aniônicas.

O EBC passou por uma filtração em filtro de 0,22 µM e posteriormente foi aplicado em coluna Hiprep 26/60 Sephacryl S-200 HR com auxílio de bomba peristáltica “Econo Pump” (Bio Rad). As frações eluídas foram coletadas pelo coletor de frações “model 2110” (Bio Rad). A coluna estava previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM e NaCl 150 mM, pH 5,0. Foram aplicados 2 mL do EBC e em seguida foram passados 80 mL de tampão acetato pela coluna, em uma vazão de 0,75 mL/min. As frações coletadas ficaram com cerca de 6 mL.

As amostras selecionadas passaram por diálise contra água ultrapura, com duas trocas e duração de 24 h. O material dialisado foi congelado em freezer -80 °C e então liofilizado. Esse material foi ressolubilizado em ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 % e centrigufado a 9300 x *g* por 10 min. à temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em filtro 0,22 µm (Millipore) e foi aplicado na cromatografia de fase reversa em resina ACE 5 C18 300 com o equipamento Äkta purifier 900 (GE Healthcare). O tampão de eluição utilizado é constituído de Acetonitrila 80 % e TFA 0,1 %. O gradiente de eluíção utilizado foi: 0-20% de B, 2 volumes de coluna (CV); 20-40% de B, 10 CV; 40-100% de B, 1 CV e 100% de B, 5 CV.

A metalo peptidase foi purificada por cromatografias realizadas no equipamento Äkta Purifier 900 (GE Healthcare). A primeira etapa consistiu na filtração do EBC em filtro de 0,22 µM. Posteriormente, a amostra foi aplicada em coluna Tricorn 10/50 com 5 mL de Source 15Q (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e então foram aplicados 2 mL de amostra (1 mL de EBC mais 1 mL de

tampão citrato). O tampão de eluição foi acetato de sódio 50 mM e NaCl 1M. O gradiente de eluição foi realizado de 0 a 100 % deste tampão para eluição das proteínas. Foi verificado que a enzima não interagiu com a resina, sendo eluída na fração não ligada. Sendo assim, empacotou-se uma coluna Tricorn 10/50 com 5 mL de Source 15S (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e então foram aplicados 15 mL de amostra (fração não ligada da cromatografia anterior). O gradiente de eluição proposto foi de 0-250 mM de NaCl em tampão acetato 50 mM pH 5,0.

Com o intuito de verificar em quais frações as peptidases estavam presentes foram feitos ensaios de atividade enzimática. O substrato da reação foi caseína bovina a 1% (m/v) preparada em tampão fosfato monobásico de sódio, 50 mM e pH 6,5. O ensaio foi preparado de acordo Sarath e colaboradores, 1996; com modificações. Para a reação, 100 µL de amostra foram incubados com 500 µL do substrato. O tempo de reação variou com cada experimento. A reação foi parade com a adição de 300 µL de ácido tricloroacético 10% (m/v). Após isso, realizou-se uma centrifugação a 10.000 x *g* a 20 °C por 15 min. A leitura do resultado foi realizada em espectrofotômetro Genesys 10s (Thermo). Os valores de atividade foram apresentados de maneira relativa â amostra com maior atividade.

2.1.3. Espectrometria de massas

Tendo a serino peptidase purificada, propôs-se identificar seus peptídeos para se obter mais informações da sequência peptídica da enzima estudada. A primeira etapa foi a realização de SDS-PAGE 12 % da fração purificada. A amostra passou por processo em concentrador a vácuo (2-18 CDplus - Martin Christ) 1200 rpm, 45 °C por 30 min. O material seco foi ressuspendido em tampão de amostra para SDS-PAGE, incubado a 100 °C por 10 min. O gel foi corado com Comassie blue G-250 coloidal e descorado com água ultrapura. A banda referente à proteína purificada foi recortada com bisturi e inserida em um microtubo de 1,5 mL. A solução de acetonitrila 50 % e bicarbonato de amônio 0,1 M foi adicionada ao gel para finalizar a descoloração da banda e remoção de SDS. A banda foi intumescida com 20 ng de tripsina de pâncreas de porco dimetilada,

grau proteômico (Sigma) com posterior adição de 100 µL de solução de bicarbonato de amônio 0,1 M. O material foi incubado a 37 °C, por 24 horas. Após esse período, a reação foi interrompida com 5 µL de ácido fórmico (P.A.) e a solução contendo os peptídeos trípticos foi coletada após 4 h e submetida à concentração e dessalinização em resina POROS® R2 (Applied Biosystems®).

A resina de fase reversa POROS® R2 foi ativada em metanol e equilibrada em solução 0,2 % (v/v) de ácido fórmico. A solução contendo os peptídeos trípticos foi então aplicada na resina. O material que não interagiu com a resina foi removido pela lavagem com solução 0,2 % (v/v) de ácido fórmico e, por fim os peptídeos que interagiram com a resina foram obtidos em solução de eluição (60 % (v/v) ACN; 5 % (v/v) ácido fórmico). A solução com os peptídeos eluídos foi seca em concentrador a vácuo rotacional (2-18 CDplus - Martin Christ) 1200 rpm, 35 °C por 90 min.

As amostras foram misturadas e ressuspendidas em uma solução de matriz de ácido-α-ciano-4-hidroxicinamínico, em seguida foram aplicadas em duplicata em placas de inox, compatível com o equipamento. Os espectros Maldi ms/ms foram obtidos pelo uso do equipamento MALDI-TOF/TOF (Axima Performance, UK). As análises dos espectros foram realizadas com uso do software MASCOT version 2.2 (Matrix Science, London, UK). Os resultados desta análise foram úteis para pesquisa pelo gene que codifica esta enzima no transcriptoma anotado de *P. lilacinum*.

2.2. Análise de transcriptoma

2.2.1. Montagem de transcriptoma *de novo* e seleção de genes para expressão heteróloga

Tendo a análise de qualidade das sequências, seguiu-se com a montagem dos transcritos. Optou-se para a montagem *De Novo* dos transcritos para que houvesse a possibilidade de uma nova etapa de anotação, que poderia revelar sequências ainda não descritas ou mal anotadas no genoma de *P. lilacinum*. O *pipeline* Trinity (Haas *et* al, 2013) foi utilizado para um sequenciamento estruturado em *paired-ends*, em 10 núcleos de processamento e memória de 100 Gb. O processo gera estatísticas de cobertura e qualidade da montagem, que são checadas para a continuidade do processo.

O resultado do Trinity é um arquivo fasta com as montagens gênicas. Esse processo, entretanto, é passível de gerar muitas sequências redundantes, ou seja, um mesmo gene é designado com códigos diferentes por um erro de processamento. Esse fato afeta uma posterior contagem dos transcritos. Para minimizar essa situação, foi utilizado o software CD-HIT-EST (Li e Godzik, 2006), que detecta redundância e elimina do arquivo de análise. O arquivo com as sequências montadas e filtradas servirá de entrada para os *pipelines* de anotação gênica.

O processo de anotação gênica envolve a busca por similaridade de sequência de cada transcrito montado em bancos de dados do NCBI e Pfam (Finn *et.* al, 2011). São atribuídos graus de identidade e parâmetros de cobertura dos pares de sequências alinhadas. O processo de anotação gênica foi realizado em um *pipeline* chamado Trinotate (https://trinotate.github.io/), que abrange preditor de ORFs, BLASTx, BLASTP (Altschul *et*. Al, 1990), hmmscan (Finn *et.* al, 2011), SignalP (Petersen et. al, 2011) e TMHMM (Krogh *et*. Al, 2001). O Trinotate associa todos os arquivos resposta em uma plataforma web de fácil acesso e navegação.

O arquivo de saída do Trinity serve como entrada para o Transdecoder (Haas *et* al, 2013), que processa a probabilidade de cada sequência gerada ser uma Fase Aberta de Leitura (ORF) e codificar uma proteína. O transdecoder libera arquivos de saída no formato fasta com as fases abertas de leitura tanto em nucleotídeos, quanto em aminoácidos (tradução *in silico*). Tendo os arquivos de nucleotídeos e aminoácidos foi possível realizar uma busca nos bancos de dados do NCBI, via BLASTX e BLASTP, respectivamente. O banco de dados do Pfam também foi pesquisado via hmmscan. O processo de anotação se completou com a busca por peptídeo sinal com o SignalP

Para se obter um arquivo fasta com as sequências de aminoácidos identificadas pela anotação gerada pelo BLASTP e hmmscan foi necessário acessar novamente o transdecoder e adicionar os parâmetros “--retain_blastp_hits” e “--retains_pfam_hits”. O arquivo de saída possui os dados de anotação no cabeçalho e a sequência de aminoácidos em seguida. Esse arquivo foi transformado em banco de dados local para pesquisa via BLASTP.

Este banco de dados local está armazenado nos computadores do laboratório de bioinformática do Hemocentro de Ribeirão Preto, sob responsabilidade do Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior e foi utilizado para busca de genes de interesse, entre eles, o gene da serino peptidase purificada no bioprocesso com farinha de pena. As sequências dos peptídeos preditos pela espectrometria de massas foram utilizadas como partida para uma busca em todo o arquivo fasta do transcriptoma. Utilizou-se o comando "grep" para uma listagem de todas as proteínas que possuíam os peptídeos semente em suas sequências. O recurso de BLASTP não pôde ser aplicado pois os peptídeos possuíam uma sequência muito curta, o que impossibilita a análise. Outros parâmetros de escolha foram aplicados, como a presença de inibidor na porção N-terminal, geralmente Inibidor I9, e tamanho predito da proteína, que não deveria ultrapassar 450 resíduos de aminoácidos, pois, como verificado em SDS-PAGE, a enzima possui em torno de 40 kDa na sua forma ativa. Partindo das informações bioquímicas da serino peptidase purificada, selecionamos uma das sequências para expressão recombinante.

Considerando que a metalo peptidase não pôde ser purificada e sequenciada, abordamos uma estratégia diferente de seleção. Buscamos sequências de *P. lilacinum* anotadas como metalo peptidase e utilizamos a sequência de aminoácidos dessas enzimas como partida para aplicar em BLASTP contra o banco de proteínas não redundantes do NCBI. Também foi necessário selecionar os resultados gerados pelo tamanho da cadeia de aminoácidos, que foi limitada a 300 resíduos, pois, como verificado em SDS-PAGE, a enzima possui em torno de 30 kDa. A sequência selecionada foi destinada à expressão recombinante.

2.3. O organismo *Pichia pastoris* e o plasmídeo pPICzα-A

O sistema de expressão em levedura *Pichia pastoris* foi escolhido para a expressão heteróloga. A levedura é um organismo eucarioto, capaz de realizar modificações pós-traducionais. Além disso, a proximidade filogenética, por *P. lilacinum* e. *P. pastoris* sem fungos, é um fator positivo e aumenta as chances de a proteína ser expressa de maneira adequada. Quando metanol é a única fonte de carbono do meio, *P. pastoris* é capaz de metabolizá-lo devido à presença da enzima álcool oxidase (AOX),

que catalisa a oxidação de metanol a peróxido de hidrogênio e formaldeído. Por possuir baixa afinidade por oxigênio molecular, o organismo precisa conseguir uma alta taxa de expressão da mesma como estratégia compensatória. A levedura expressa dois genes homólogos, AOX1 e AOX2. O gene AOX1 possui um promotor forte e o seu silenciamento gera organismos com crescimento lento em presença de metanol - fenótipo denominado Mut^s - pois a levedura utiliza apenas AOX2, com promotor mais fraco (Pedezzi, 2015).

O vetor pPICZα-A (Invitrogen) possibilita a ligação do gene de interesse sob regulação do promotor do gene AOX1. Sendo assim, quando o vetor é integrado no genoma de uma levedura com o gene AOX1 não funcional – cepa KM71H, por exemplo - a mesma produz grande quantidade da proteína recombinante, desde que possua metanol como única fonte de carbono (Pedezzi, 2015). Este vetor possui sequência codificante de um peptídeo sinal eficiente para *P. pastoris* (fator α), que será usado na extratégia de expressão, para facilitar as etapas *downstream* da produção. Além desses fatores, *P. pastoris*, por ser eucarioto, pode realizar modificações pós traducionais, como N-glicosilação e O-glicosilação. Isto é importante, visto que algumas proteínas necessitam dessas modificações para se ativarem plenamente (Pedezzi, 2015).

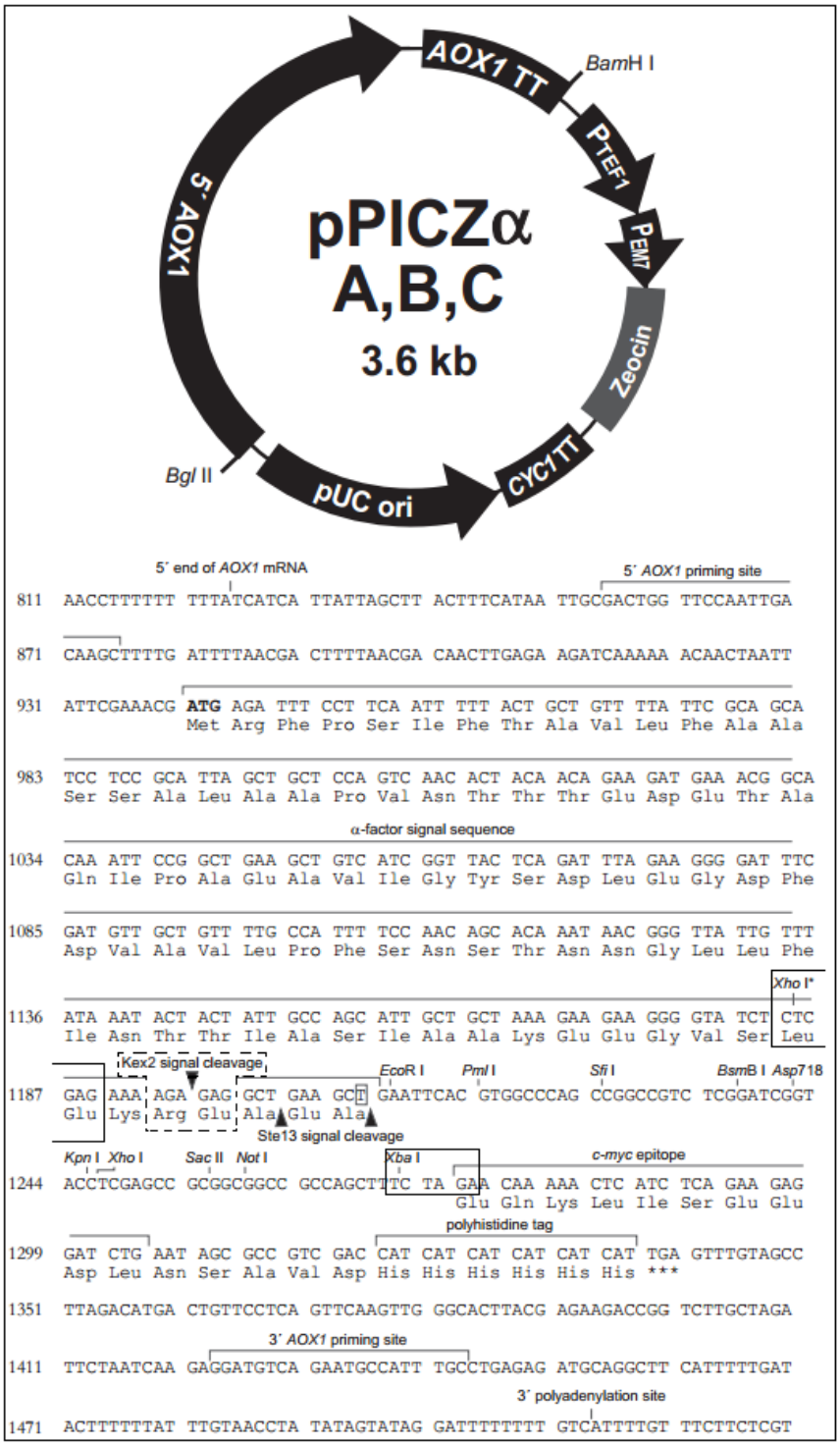
2.4. Montagem do plasmídeo de expressão

As sequências selecionadas para expressão recombinante passaram por uma análise mais completa de caracterização. Foram investigados sítios de glicosilação via NetOGlyc CBS (Steentoft et. al, 2013) e NetNglyc CBS (Gupta et. al, 2004) e peptídeo sinal via SignalP CBS (Petersen et. al, 2011). Após esta caracterização, foi estabelecida a estratégia de expressão com a seleção do vetor de expressão em *P. pastoris* pPICZα-A (Invitrogen), enzimas de restrição flanqueando os genes de interesse e presença de cauda de histidina (6xHis) para viabilizar a purificação em poucas etapas.

As enzimas escolhidas para a clonagem foram *Xho*-I e *Xba*-I para evitar ao máximo a tradução do sítio múltiplo de clonagem na porção N-terminal da proteína. Entretanto, de acordo com o mapa do pPICZα-A (figura 16), isso resultaria em uma proteína sem o sinal de clivagem para a protease *Kex*-II, que atua na clivagem do Fator-α, no retículo

endoplasmático da levedura. Isso nos levou a adicionar a sequência que codifica os aminoácidos de reconhecimento (lisina e arginina) no gene sintético. Com o objetivo de evitar a região que daria origem ao epítopo *c-myc*, foi desenhada uma sequência que codifica seis histidinas na porção 3’ do gene sintético, seguida por um códon de terminação (TGA), projetando a estratégia de purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade ao Níquel.

Figura 16: Mapa e região de múltipla clonagem do vetor pPICZα-A. Destaque em retângulos pretos para os sítios de restrição das enzimas Xho I e Xba I, utilizadas na estrutura de clonagem. Destaque em linha tracejada para o sinal de clivagem da enzima Kex2, perdido na restrição com Xho I. (Adaptado de: EasySelect™Pichia Expression Kit, Invitrogen).



Fonte: Autor

2.5. Serino peptidase

2.5.1. Caracterização do gene

Para facilitar a citação do gene da serino peptidase que foi selecionado para expressão recombinante, demos o nome de *Pl*_SerPep para o gene e r*Pl*_SerPep para a proteína recombinante. Como é característica das subtilases, o gene da *Pl*_SerPep possui uma sequência que codifica um inibidor da própria enzima, chamado de “I9”. Essa sequência tem sido relatada como auxiliar na etapa de enovelamento da enzima e, além disso, protege a célula da ação da peptidase intracelularmente, ao ocupar o sítio ativo da enzima. (Tangrea, et al., 2002). Nossa estratégia foi a de produzir a enzima com esse inibidor para que ela não possua atividade intracelularmente, o que poderia torná-la citotóxica para *P. pastoris*.

Para melhor predizer a r*Pl*_SerPep, alimentamos o software Bioedit, versão 7.0.5 (Hall, 1999) com a sequência do gene e analisamos massa molecular predita e composição de aminoácidos.

Os genes foram então sintetizados e seguiu-se com as etapas posteriores.

2.5.2. Transformação em *P. pastoris*

Com o intuito de se obter células de *P. pastoris* recombinantes para plasmídeo contendo o gene *Pl*_SerPep foram produzidas células competentes da cepa KM71H segundo o manual “EasySelect™ PichiaExpression kit” (Invitrogen). O procedimento é baseado no crescimento prévio das células até que elas atinjam a fase logarítmica de crescimento celular, posterior transferência das células em meio nutriente adicionado de HEPES, um tampão que mantém o pH fisiológico e DTT, que evita a formação de pontes de sulfeto intra e extracelularmente. Finalmente foram feitas lavagens nas células com água gelada para transferência das mesmas para uma solução de Sorbitol 1 M (Pedezzi, 2015).

A transformação das células competentes foi realizada a partir do pPICZα-*Pl*_SerPep purificado e previamente linearizado com a enzima de restrição *Pme*-I (New

England Biolabs), seguindo as recomendações do fabricante. Aproximadamente 1 µg de vetor linearizado foi adicionado em 40 µL de células competentes. Após a homogeneização, as células foram incubadas em gelo por 5 min e eletroporadas em cubetas de 0,2 cm a 1,5 Kv, 25 µF e 200 Ω. Adicionou-se 1 mL de uma solução de YPD (Extrato de levedura 1%, Peptona 2% e Dextrose 2%) diluído 1:2 com Sorbitol 1 M, e incubou-se a 30 °C por 2 h sem agitação (Pedezzi, 2015).

Posteriormente, as células crescidas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YPDS (Extrato de levedura 1%, Peptona 2%, Dextrose 2% e Sorbitol 1 M) acrescidos de 100 µg/mL ou 500 µg/mL de Zeocina. As placas foram incubadas por 72 h a 30 °C e então as colônias contendo os plasmídeos recombinantes foram selecionadas para a próxima etapa (Pedezzi, 2015).

Dentre as colônias que cresceram, 20 foram escolhidas para a realização de um *screening* em busca de uma colônia com expressão superior. Para tanto, o procedimento foi conduzido em tubos “minibiorreactor” (Corning) de 50 mL, adaptando o método descrito por Boettner *et al.* (2002). O experimento contou com dois controles negativos: o primeiro foi ausência de levedura em um dos poços, para comprovar a experimentação em condições assépticas. O segundo foi a inoculação da levedura não transformada com plasmídeo, para posterior comparação no padrão de bandas no SDS-PAGE da expressão (Pedezzi, 2015).

A primeira fase do *screening* contou com o crescimento de uma massa celular de cada colônia selecionada em 10 mL de meio complexo com glicerol tamponado, chamado BMGY, (1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona, 1,34 % YNB, 4 x10^{-5} % de Biotina, 100 mM fosfato de potássio (pH 6,0) 1 % de glicerol), por 48 h, a 30 °C e 250 rpm ($D.O_{600}$ entre 2 e 6) (Pedezzi, 2015).

Posteriormente, foi realizada a troca de meio de cultivo por 7 mL de meio complexo com metanol tamponado, chamado BMMY, (1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona, 1,34 % YNB, 4 x10-5 % de Biotina, 100 mM fosfato de potássio ph 6,0, 0,5% de metanol), incubando a 30 °C e 250 rpm. Em intervalos de 24 h, até 144 h, foi adicionado metanol absoluto a uma concentração final de 0,75 % ao mesmo tempo em que foram retiradas alíquotas da indução para avaliação da expressão. Os

sobrenadantes foram recuperados por centrifugação (1500 *g* 5 minutos.) e analisados em SDS-PAGE 12 % (Pedezzi, 2015).

Além da análise de expressão por SDS-PAGE, foram feitos ensaios de atividade enzimática para verificar em qual colônia se deu maior expressão da enzima e, consequentemente, maior atividade enzimática. As reações contaram com Caseína diluída a 1 % em tampão fosfato de sódio monobásico 50 mM pH 6,5 e amostra; foram incubadas a 45 °C por 2 h, como descrito por Sarath e colaboradores, 1996. Sendo assim, as leveduras transformadas que mostraram maior produção das proteínas recombinantes foram selecionadas para o processo de indução em maior escala.

2.5.3. Bioprocesso de expressão recombinante

O clone que apresentou maior atividade no *screening* inicial foi selecionado para a expressão em maior escala. Sendo assim, foi feito um pré-inóculo de 10 mL de BMGY com adição de uma massa celular a partir da cultura em meio sólido por 24 horas à 30 °C sob agitação de 250 rpm. Posteriormente, o pré-inóculo foi adicionado em 500 mL de BMGY e mantido sob agitação de 250 rpm a 30 °C, durante 24 horas. Em seguida, foi realizada uma centrifugação, 1500 *g* por 5 minutos, para a troca de meio de cultivo. A fração do *pellet* foi ressuspendida em 100 mL do meio BMMY para a indução da expressão proteica (Pedezzi, 2015).

Para a indução da proteína recombinante, o metanol foi adicionado para uma concentração final de 0,75 %, a cada 24 horas, durante 7 dias. Ao fim do processo, a fração celular foi separada do meio de cultivo por centrifugação a 1500 g por 5 minutos, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm (Millipore) e purificado (Pedezzi, 2015).

2.5.4. Purificação da serino peptidase

A purificação por cromatografia de afinidade foi conduzida em coluna de resina carregada com 10 mL de Níquel (Nickel sepharose, GE), previamente equilibrada com tampão de ligação (Tris 10 mM, NaH_2PO_4 50 mM e NaCl 100 mM), na qual as proteínas ficam aderidas pela cauda de histidina por afinidade química. Para a coleta das

proteínas, lavou-se a coluna com soluções do mesmo tampão, mas com concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM), que compete com as histidinas pelo Níquel, liberando a proteína recombinante na forma purificada. Todo o procedimento foi realizado em FPLC “Akta Purifier 900” (GE). Após coleta, as amostras foram analisadas em SDS PAGE 12 %, por onde se selecionou para diálise as frações que apresentaram a proteína purificada. Foram utilizadas membranas de diálise (PIERCE 3,500 MWCO) em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 em uma proporção solução proteica/ tampão de 1:1000 (V/V). O processo foi realizado sob agitação leve a 4 °C e passou por três trocas de tampão ao longo de 36 horas.

As proteínas dialisadas foram aliquotadas em microtubos de 2 mL e armazenadas a -20 °C. O conteúdo protéico das frações dialisadas foi quantificado pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

2.5.5. Caracterização bioquímica parcial

Todos os ensaios da r*Pl*_SerPep se basearam na detecção colorimétrica em λ = 410 nm de 0,8 mM do substrato N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-Pna (Sigma); 100 µg/mL da enzima purificada e tampão (que variou de acordo com o ensaio) a 50 mM em volume final de 250 µL, modificado de DelMar e colaboradores, 1979. Em geral, as reações foram mantidas por 2 horas em temperatura determinada de acordo com o experimento. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e tiveram como controle negativo reações idênticas às testadas, salvo a solução de enzima, que foi inativada previamente por incubação a 100 °C por 10 min.

O ensaio de curva de pH foi construído com os tampões: acetato de sódio para os pH 5,0 e 5,5; MES para os pH 6,0 e 6,5; HEPES para pH 7,0; 7,5 e 8,0; BICINE para os pH 8,5 e 9,0. A temperatura de reação para este ensaio foi 40 °C. Neste caso, não houve incubação prévia. A enzima entra em contato com o pH testado somente na hora da reação.

O ensaio de curva de temperatura foi realizado em pH 8,0 (HEPES), pois este foi o pH de maior atividade no ensaio anterior. As temperaturas de reação variaram de 30 a 85 °C.

O ensaio para mensurar a interferência de íons metálicos sobre a atividade da enzima foi realizado nas condições ótimas de reação. Os íons foram testados na concentração de 4 mM. Os sais utilizados foram KCl, $CaCl_2$, $MgSO_4$, $MnCl_2$, NaCl, $ZnSO_4.7H_2O$, BaCl, LiCl, $AlCl_3.6H_2O$, $CuCl_2$, $CoCl_2.6H_2O$ e $NiSO_4.6H_2O$. Não houve incubação prévia.

Foram realizadas curvas com os surfactantes brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), dodecil-sulfato de sódio (SDS), Triton X-100 e Tween 20. As concentrações testadas de SDS foram 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,1 %. Já para CTAB, Triton X-100 e Tween 20 as concentrações testadas foram 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 %. Houve incubação por 10 min. dos surfactantes com a enzima e tampão.

Uma curva com agentes caotrópicos também foi realizada. Foram realizados testes com ureia, guanidina e ditiotreitol (DTT). As concentrações testadas foram 10, 25, 50, 100 e 150 mM. Houve incubação por 10 min. dos agentes caotrópicos com a enzima e tampão.

Foram feitas curvas de estabilidade, tanto ao pH, quanto à temperatura. A curva de estabilidade ao pH se baseou em uma incubação prévia de 100 µg da r*Pl*_SerPep em tampões de pH variando de 5 a 10, na concentração de 50 mM e volume final de 30 µL por 1 h. Depois disso, adicionaram-se substrato e tampão de reação na concentração final de 87 mM, em um volume final de 250 µL.

As curvas de estabilidade à temperatura foram geradas variando temperatura e tempo de incubação. A variação de temperatura foi de 30 a 75 °C. Sendo assim, em cada temperatura, foram incubadas enzima e água por 5, 15, 30 e 60 minutos. Depois da incubação, cada amostra retirada foi adicionada à mistura de reação convencional para avaliação de atividade residual.

2.5.6. Estudos estruturais

A técnica de SAXS (Small Angle X-ray Scattering) é utilizada nas análises de estrutura molecular de macromoléculas em solução à baixa resolução. Para proteínas,

essa análise permite determinar o estado oligomérico, a massa molecular, o volume molecular, o raio de giro (R_g), o envelope molecular, entre outros parâmetros. Os experimentos de SAXS foram conduzidos em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Igor Polikarpov e a comunicação direta foi realizada com o então pós-doutorando, Dr. Danilo Elton Evangelista. Aproximadamente 11 mg de r*Pl*_SerPep purificada, em diferentes concentrações, foram levados para a coleta de dados na linha D02A-SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas–SP. O conjunto de dados foi coletado usando um feixe monocromático de raios-X (λ= 1,55 Å) e um detector Pilatus 300. A distância entre a amostra e o detector foi ajustada para aproximadamente 1,0 mm cobrindo um vetor de espalhamento ($q=4\pi/\lambda\sin(\theta)$, sendo 2θ o anglo de espalhamento) de variação entre 0.0129 a 0.3500 $Å^{-1}$. Amostras de 1,5, 3,0 e 6,0 mg/mL da proteína pura em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 e 5% (p/v) de glicerol foram previamente preparadas. Para garantir a qualidade das medidas e remover qualquer artefato de agregamento, a amostra foi previamente centrifugada a 23.500 x *g* e 4 °C por 5 min. A amostra foi carregada em uma célula de mica de 1.0 mm de comprimento e exposta ao feixe de raios-X em intervalos de 30 s. A análise comparativa de cada conjunto coletado foi usada para avaliar danos por radiação. A medida coletada para o tampão foi usada na subtração da medida das amostras. A análise de Guinier foi utilizada para checar a monodispersidade e o raio de giro (R_g), o qual também foi determinado pelo método de Transformada de Fourier indireta, usando o software GNOM (Svergun, 1992). A função de distribuição de distâncias P(r) foi analisada pelo software GNOM, onde o diâmetro máximo (Dmax) foi atribuído. A massa molecular experimental baseada nos dados de SAXS foi calculada através do programa SAXSMoW (Fischer et al., 2003). Dez modelos de envelope molecular foram gerados via *ab initio* pelo programa GASBOR (Svergun, 1992), sendo alinhados e cálculado a média pelo programa DAMAVER (Volkov e Svergun, 2003). Um modelo de homologia tridimensional (3D) de r*Pl*_SerPep foi gerado usando o software online Phyre2 (Kelley et al., 2015). O modelo de homologia 3D da estrutura r*Pl*_SerPep e o modelo final do envelope molecular r*Pl*_SerPep foram sobrepostos pelo programa SUPCOMB (Kozin e Svergun, 2001).

2.6. Metalo peptidase

As etapas de caracterização do gene, transformação em P. pastoris, bioprocesso de expressão recombinante e purificação seguiram exatamente o que foi descrito para r*Pl*_SerPep. As principais diferenças metodológicas estão na etapa de caracterização bioquímica parcial, descrita a seguir. Demos o nome de *Pl*_MetPep para o gene da metalo peptidase e r*Pl*_MetPep para a proteína recombinante.

2.6.1. Caracterização bioquímica parcial

A r*Pl*_MetPep passou por uma caracterização mediante curva de pH e temperatura. A metodologia de detecção da atividade enzimática se baseou na utilização de substratos peptídicos sintéticos com supressão intramolecular de fluorescência (FRET). Na estrutura deste substrato há um grupo emissor de fluorescência (ácido orto-aminobenzóico – Abz) na extremidade amino-terminal e um grupo supressor de fluorescência (grupo etilenodiamo-dinitro-fenil – EDDnp) na extremidade carboxi-terminal. Quando o substrato é clivado, o supressor se afasta do emissor e então a fluorescência pode ser detectada (Carmona et al., 2009). De maneira mais específica, o substrato escolhido possui a seguinte configuração: Abz-KLRSSKQ-EDDnp e é chamado P1R, pois possui uma arginina na posição P1.

Na confecção do ensaio enzimático, 200 µg de r*Pl*_MetPep purificada foram incubados com tampão a 100 µM, que variou de acordo com o ensaio, e 30 uM de substrato P1R por 15 min a temperaturas que variaram de acordo com o ensaio. A avaliação em tempo real da quantidade de fluorescência emitida deu-se em espectrofluorímetro modelo Lumina (Thermo), acoplado a um Peltier 4-position fluorescense cell holder, responsável pela agitação e temperatura da reação, nos comprimentos de onda de excitação 320 nm e emissão 420 nm. Luminous Software version 3.0 foi o software utilizado para visualização dos resultados.

O ensaio de curva de pH foi construído com os tampões: acetato de sódio para os pH 5,0 e 5,5; MES para os pH 6,0 e 6,5 e HEPES para pH 7,0; 7,5 e 8,0. A reação foi incubada a 40 °C.

O ensaio de curva de temperatura foi realizado em pH 7,0 (HEPES), pois este foi o pH de maior atividade no ensaio anterior. As temperaturas de reação variaram de 25 a 55 °C.

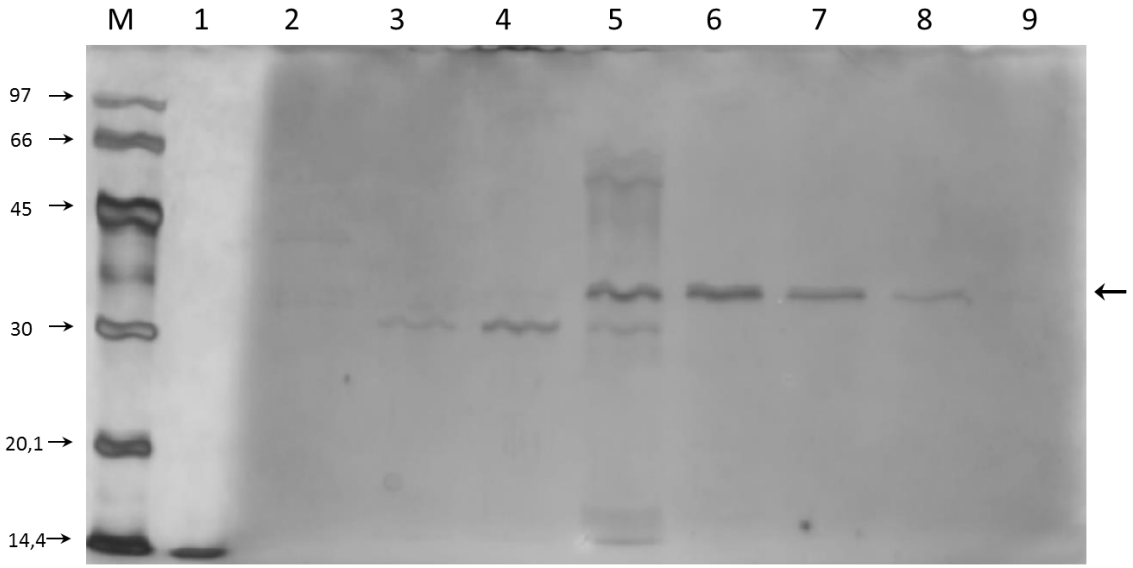
3. Resultados e discussão

3.1. Estudo de peptidases nativas

Com o objetivo de estudar melhor as peptidases produzidas por *P. lilacinum*, elaboramos experimentos para detecção das enzimas nativas e posterior expressão recombinante. O estudo das peptidases nativas se iniciou com a tentativa de purificação de duas peptidases que se destacavam em testes com caseína (Giovanini, 2014).

O protocolo de purificação da serino peptidase foi bem-sucedido. Após as etapas de purificação, realizou-se um SDS-PAGE para verificação da pureza das amostras (Figura 17).

Figura 17: Gel SDS-PAGE 12 % corado com nitrato de prata: referente às frações eluídas da cromatografia que apresentaram atividade proteolítica contra caseína no processo de purificação proteica. M: Marcador de massa molecular LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare); 1: Amostra vazia; 2: fração 22 da cromatografia; 3: fração 23; 4: fração 24; 5: fração 25; 6: fração 26; 7: fração 27; 8: fração 28; 9: fração 29. A massa aproximada da serino peptidase é de 35 kDa (indicado na seta preta à direita) e pode ser vista nas frações 5, 6, 7 e 8. As frações mais purificadas foram 6, 7 e 8.



Fonte: Autor

As amostras 25, 26, 27 e 28, referentes às canaletas 6, 7 e 8, foram as que apresentaram maior atividade de hidrólise de caseína. Comparando a massa molecular das bandas dessas frações com as massas moleculares descrita por Giovanini, 2014 – aproximadamente 35 kDa – espera-se que as mesmas sejam referentes à serino peptidase de *P. lilacinum*. Considerando que as amostras 26, 27 e 28 apresentaram grau de pureza mais elevado, estas foram reunidas e concentradas em membranas de 10 kDa para a confecção de um SDS-PAGE 12 %. Este novo gel corado com Comassie blue G-250 foi recortado na banda de aproximadamente 35 kDa, referente à enzima, e seguiu-se com o preparo de amostra para digestão e análise por espectrometria de massas.

Até o momento não foi possível estabelecer um protocolo de purificação adequado para a metalo peptidase identificada em experimentos de atividade enzimática. Sendo assim, os peptídeos não foram obtidos e identificados por espectrometria de massas com o da serino peptidase. A abordagem para identificar a metalo peptidase no transcriptoma foi diferente e foi explicada nos itens da metodologia.

A análise dos dados de espectrometria de massas no software MASCOT revelaram uma associação da banda da serino peptidase com a proteína “Chain A, Crystal Structure Of Cuticle-degrading Protease” de *Paecilomyces lilacinus*. O *score* gerado foi de 74 e os peptídeos identificados foram “K.AQSVNDGAAAMIR.A” e “-.AYTQQPGAPWGLGR.I”.

Estes resultados, portanto, mostram que os peptídeos gerados são provenientes de uma protease capaz de degradar cutícula. As enzimas anotadas como degradadoras de cutícula são, em geral, serino peptidases (Dias *et.* al, 2008). Tendo em vista que os experimentos de atividade da enzima purificada revelaram características de serino peptidase, sugere-se que a banda do SDS-PAGE utilizada para o sequenciamento é, de fato, uma serino peptidase.

Com essas informações, foi possível fazer uma busca por genes de proteínas homólogas à encontrada na análise proteômica tendo o transcriptoma *de novo* como referência molecular.

3.2. Análise de transcriptoma

3.2.1. Montagem de transcriptoma *de novo*

Os resultados do transcriptoma de *P. lilacinum* foram aproveitados para uma busca por enzimas de interesse. A montagem de transcriptoma *de novo* possibilita encontrar genes que ainda não haviam sido bem anotados, visto que uma nova etapa de anotação gênica foi realizada. As análises, neste caso, se iniciaram após a etapa de controle de qualidade do sequenciamento, que já havia sido feita para as análises com antifúngicos.

Tendo a qualidade dos sequenciamentos confirmadas, seguiu-se com a montagem dos transcritos, realizada pelo software Trinity. Essa ferramenta passa por três etapas de processamento das sequências e libera um único arquivo fasta contendo as sequências dos transcritos montadas e uma identificação para cada uma delas. Além disso, um arquivo contendo algumas estatísticas da montagem é gerado.

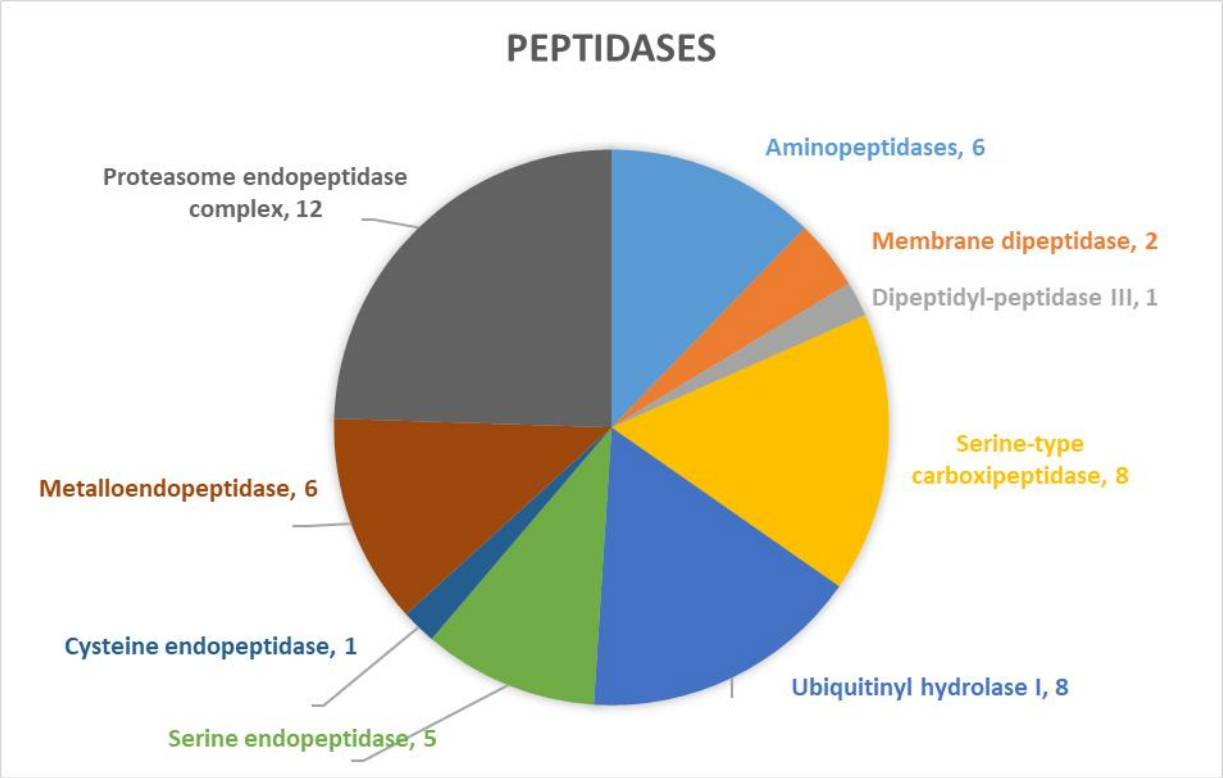
Um dos parâmetros apresentado do arquivo é o valor de N50, referente ao tamanho das moléculas médias da análise. Observou-se que o tamanho dos transcritos construídos na condição N50 é de 5428 pb, ou seja, 50 % dos transcritos gerados possui, pelo menos 5428 pb. Fazendo-se uma comparação deste parâmetro com outros organismos, foi possível observar que o valor de 5428 pb é superior ao encontrado em *Piptoporus betulinus*, *Candida africana* e *Candida albicans* (Yang *et*. al, 2017; Giosa *et*. al, 2017). Este parâmetro revela a qualidade da montagem no tocante à capacidade de gerar sequências longas de transcritos.

As etapas de anotação estão completamente finalizadas e foi possível carregar a plataforma web do TrinotateWeb e fazer algumas análises na busca de genes de interesse. A etapa de BlastX resultou em 100.200 transcritos anotados, BlastP gerou anotação de 61.719 e hmmscan anotou 479.905 genes traduzidos sem sequências de aminoácidos. O número de informações geradas é grande e a análise desses dados foi possível pelo uso do TrinotateWeb. A plataforma disponibiliza mecanismos de busca por palavras chave em que se pode preencher com os códigos dos genes ou nome de

anotação dos mesmos. A análise de cada gene fornece os dados de expressão em cada condição de cultivo.

Uma análise da anotação foi realizada e foi possível gerar um panorama geral das peptidases produzidas pelo fungo nas condições testadas no transcriptoma (Figura 18).

Figura 18: Panorama de peptidases produzidas por *P. lilacinum*. Gráfico pizza apresentando as classes de peptidases detectadas e o número de genes de cada classe.



Fonte: Autor

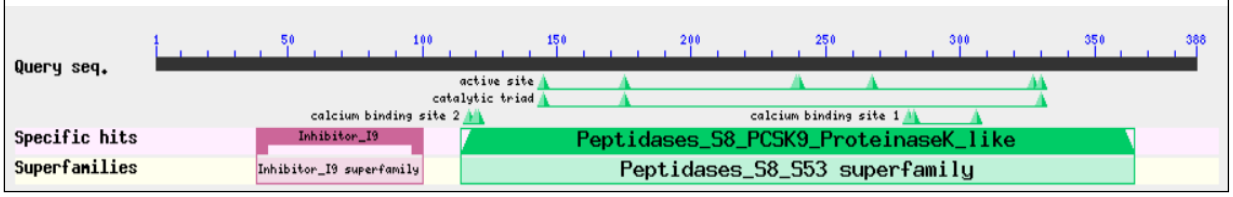
Observa-se a presença das classes serino, cisteino e metalo peptidases. Dentre as serino peptidases apresentadas, 5 atuam como endopeptidases e 8 como carboxipeptidases. Outras nomenclaturas foram apresentadas, como peptidases presentes no complexo proteassoma, ubiquitinil hidrolases, dipeptidil peptidases e aminopeptidases.

3.2.2. Seleção dos genes de duas peptidases

Tendo as análises de anotação gênica realizadas, foram feitas buscas por genes com algum potencial biotecnológico para se realizar expressão heteróloga. Aproveitando-se das informações previamente geradas sobre a serino peptidase, que foi purificada no trabalho, realizamos uma busca no banco de dados local de genes anotados utilizando os peptídeos preditos por espectrometria de massas como *query*. Os resultados nos levaram a 6 sequências codificadoras de peptidases da superfamília S8. Essas sequências foram selecionadas segundo a presença de Inibidor I9, pois é muito encontrado em enzimas com essas características, e tamanho menor que 450 resíduos de aminoácidos, pois a banda purificada nos revelou um tamanho aproximado de 35 kDa e este foi calculado como sendo o tamanho da cadeia de aminoácidos sem o inibidor I9. Restaram 4 sequências com estas características. Observou-se, portanto, a anotação que estas sequências possuíam. Verificou-se que dentre as quatro sequências, uma delas era homóloga a uma "*cuticle degrading enzyme*". Esta sequência foi, portanto, selecionada para expressão heteróloga (Figura 19).

Figura 19: Sequência de aminoácidos e domínios conservados da serino peptidase: Sequência de 368 resíduos de aminoácidos. Observa-se a indicação da região inibidora I9, aminoácidos responsáveis pela formação de um sítio de ligação ao cálcio, sítio ativo e a representação da tríade catalítica. Observa-se a indicação de que a sequência está categorizada como superfamília S8 e tem características de Proteinase K.

> Serino Peptidase
GRNTLAPLLKSGGQTVPGSYIVKLKDGVLTTQTDVQLSSFTERADHVYTHAFHGFATKLDDESLVALRRR
SDVEYIEHDGIASVNGYIEQPNAPWGLVRISHRQRVGTSYVYDDSAGLGTCAYIIDTGVDVTHPEFGNRA
QVLKSFVNDTTDGNGHGTHLAGIIGSKTYGVAKKTRIYGVKVLDNSGSGTYSNIIAGMDFVAKDWKTR
NCPKGAMANLSLGGSFSAAVNNAAASLVKAGVFTSVAAGGDNSDASRNSPASEPTVCTVGGTTRSDTR
LSSSNYGPIVDIFAPGEAITSTWTNGGTNTISGTSTSAAYITGLGCYLAGFEGNPGAEPLCKRIQELATKDVI
QNIPKGTLNLLAFNGNPTG



Fonte: Autor. Adaptado do *website* https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/

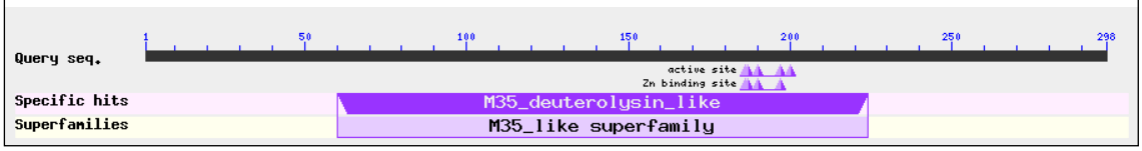
A busca por domínios mostrou que há a presença da região de Inibidor I9 e que se trata de uma peptidase da superfamília S8. Pode-se observar também que a proteína

conta com sítios de ligação ao cálcio e que alguns aminoácidos foram observados como presentes na região de sítio ativo e tríade catalítica.

Os experimentos de purificação proteica e teste de atividade enzimática nos revelaram a presença de uma outra peptidase, com características de metalo peptidase. Infelizmente, não foi possível fazer experimentos de espectrometria de massas com a banda da proteína purificada, como ocorreu com a serino peptidase. A busca por BlastP, entretanto, revelou uma sequência de aminoácidos com alta conservação em relação a uma metalo peptidase de *Eupenicillium javanicum* já caracterizada em nosso laboratório (Hamin Neto *et*. al, 2017). A sequência possui 300 resíduos de aminoácidos, quantidade compatível com a banda de aproximadamente 30 kDa encontrada na tentativa de purificação. Esta sequência foi selecionada para expressão heteróloga (Figura 20).

Figura 20: Domínios conservados da metalo peptidase: Sequência de 281 resíduos de aminoácidos. Observa-se a indicação de aminoácidos responsáveis pela formação de um sítio de ligação ao zinco e sítio ativo. Observa-se a indicação de que a sequência se categoriza como da superfamília M35 e tem características de Deuterolisina.

> Metalo Peptidase
IPADSQGRTATGTDVKSTRHLTNTGGNSLGSTATLQKRANIAKSCQGNLDFVQTALQGCAERAA
ASAKEALNGSSKLMQDIFHTSDQGARRFVSDVFTKIADECGRKEGGSVHVACGARPECRDDN
GQELGAWTDKPGPNLNLCPNYFTIPIRGKGAWCHGLDAESLMVHEMSHALNATEDYAYGLDG
VRGLSAERSLHNAESYGMFSIWLALKCSGDGMPGQSSQGTPGTSPNGSSGGQSQGSPGQSS
QGGPESLPSDSPSQGPETPNEGPSSGKGELGD



Fonte: Autor. Adaptado do *website* https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/

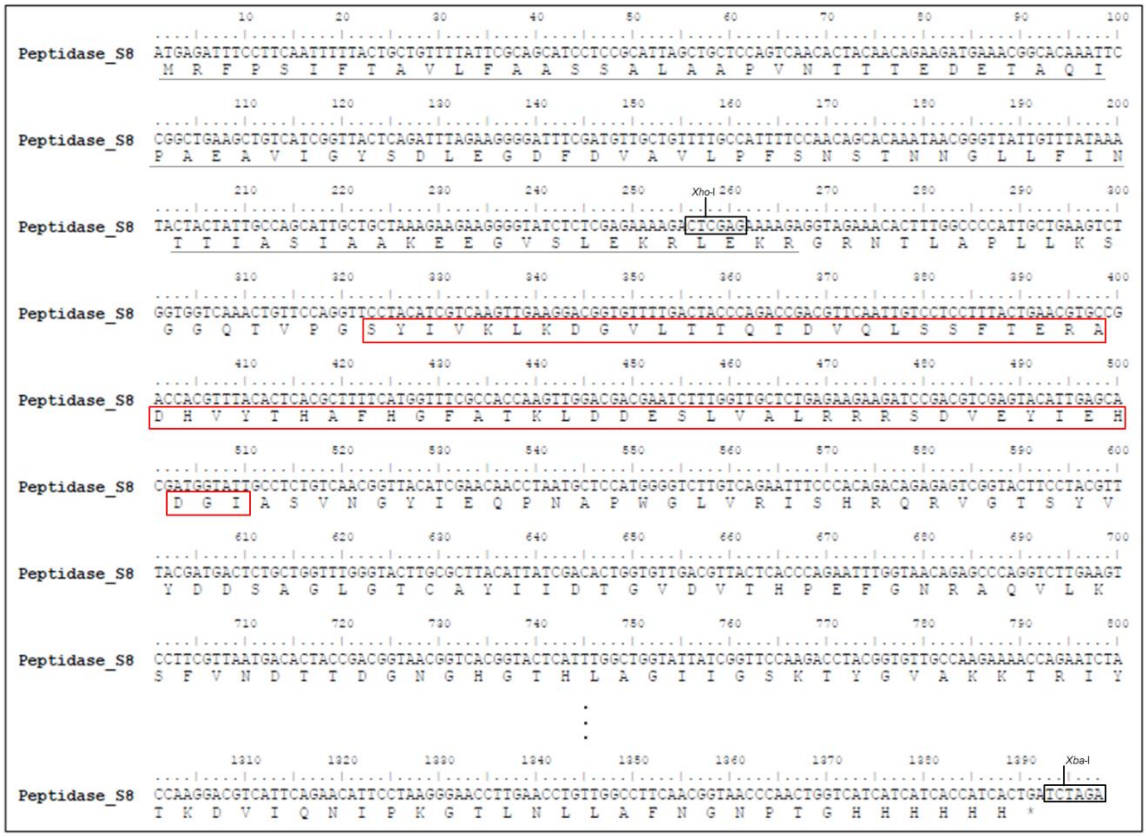
Observa-se que a metalo peptidase faz parte da superfamília M35, composta por deuterolisinas, não possui sequência do Inibidor I9 e possui sítio de ligação ao zinco em sua cadeia, além de quatro aminoácidos compondo o sítio ativo.

3.3. Serino peptidase

3.3.1. Caracterização do gene

O gene da serino peptidase de *P. lilacinum* foi selecionado por similaridade a peptídeos gerados por espectrometria de massas da enzima nativa. O gene foi então caracterizado e foi possível observar que o mesmo codifica um peptídeo sinal de secreção. Considerando que em nossa estratégia de expressão recombinante iremos utilizar o vetor pPICZα-A, que já possui o fator α de secreção, decidimos retirar essa sequência do gene desenhado para produção. A sequência do peptídeo retirado é MQVLALFFVFSAQAASAVA. O gene foi sintetizado para integrar o pPICZα-A, como mostrado na figura 21.

Figura 21: Caracterização do gene *Pl*_SerPep e sua tradução *in silico*. Os 89 resíduos de aminoácidos sublinhados representam o fator α de secreção do vetor pPICZα-A. Os blocos pretos representam as enzimas de restrição escolhidas para clonagem Xho-I e Xba-I. Os 63 aminoácidos nas caixas vermelhas representam a regiões do inibidor I9. O restante da sequência corresponde à enzima madura.



Fonte: Autor

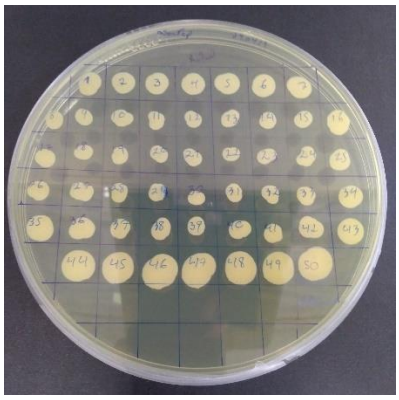
Segundo o que foi projetado, o gene será traduzido com o peptídeo sinal “fator α”, que será clivado no sítio da peptidase Kex-II no momento da secreção. A proteína manterá a sequência do inibidor I9 mesmo após secretada. A proteína deve então ser encontrada no sobrenadante do bioprocesso, com aproximadamente 39,3 kDa. Quando ativada, ou seja, sem o inibidor I9 de sequência GRNTLAPLLKSGGQTVPGSYIVKLKDGVLTTQTDVQLSSFTERADHVYTHAFHGFATK LDDESLVALRRRSDVEYIEHDGI, a proteína deve ser encontrada com aproximadamente 30,3 kDa.

Levando em consideração todas essas informações, o gene foi sintetizado e chegou ao nosso laboratório liofilizado, na quantidade de 5 µg.

3.3.2. Transformação em *Pichia pastoris*

Tendo o plasmídeo com a construção pPICZα-*PI*_SerPep em mãos, realizamos a reação de linearização com base no sítio de Pme-I 5’-GTTTAAAC-3’. Logo após sua purificação, o DNA foi misturado às células de *P. pastoris* competentes para a transformação. O resultado da transformação é verificado com o crescimento de colônias resistentes à Zeocina (Invitrogen). Logo que as colônias isoladas aparecem, a placa é repicada para placas com espaço delimitado. Isso permite que as colônias permaneçam isoladas e possam ser testadas perante a capacidade de produzir as proteínas heterólogas (Figura 22).

Figura 22: Colônias de *P. pastoris* transformadas com pPICZα-*PI*_SerPep.

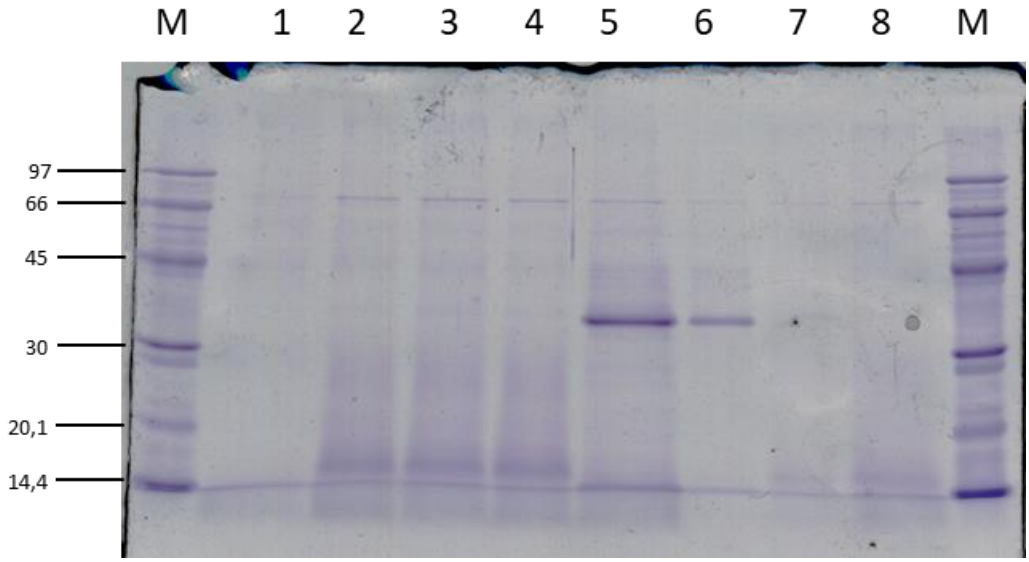


Fonte: Autor

3.3.3. Bioprocesso de expressão recombinante

O primeiro bioprocesso realizado após a transformação em células de *P. pastoris* é um *screening* de quais colônias são melhores produtoras da r*Pl*_SerPep. Dentre as primeiras 20 colônias testadas, foi possível observar, por SDS-PAGE, que algumas se destacaram ao produzir quantidades adequadas da proteína (Figura 23).

Figura 23: *Screening* de colônias produtoras da r*Pl*_SerPep. SDS-PAGE 12% M: Marcador de massa molecular LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare), valores em kDa. Amostras de 1 a 8 são extratos de bioprocessos das colônias que cresceram após a transformação.

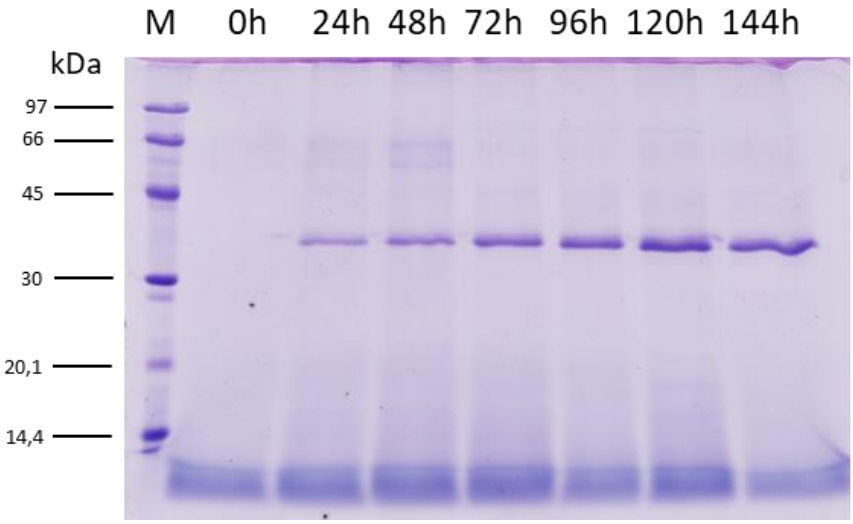


Fonte: Autor

Pode-se observar que as amostras 5 e 6 se sobressaíram por apresentarem bandas entre as massas moleculares de 30 e 45 kDa. As amostras 5 e 6 se referem às colônias 11 e 12 do *screening*. Considerando que a massa molecular esperada para a enzima em sua forma precursora é 39,3 kDa, consideramos que essas bandas proeminentes são a r*Pl*_SerPep.

A colônia 11 apresentou, visualmente, a maior produção. Sendo assim, foi realizado um SDS-PAGE com todos os tempos de bioprocesso dessa amostra para determinar quando ocorreu o pico de produção (Figura 24).

Figura 24: Curva de expressão da colônia 11. SDS-PAGE 12% dos tempos de indução da colônia 11. M: Marcador de massa molecular LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare).



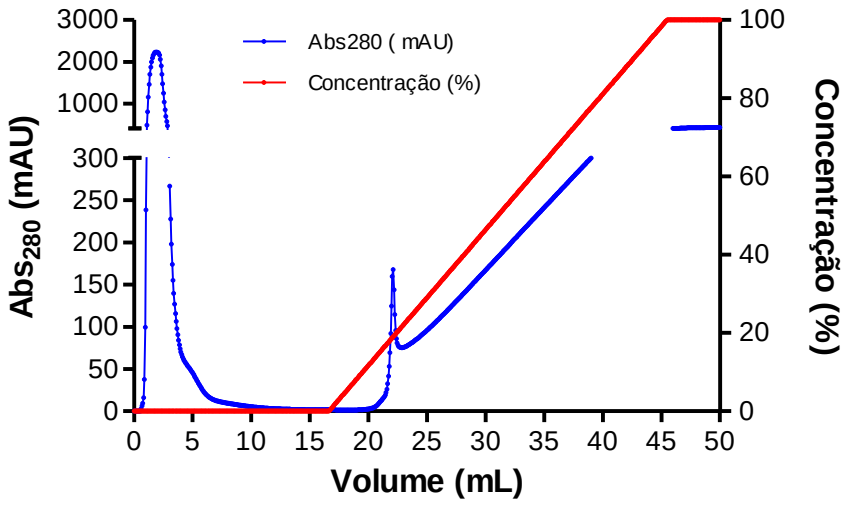
Fonte: Autor

Observa-se, visualmente, que após 72 h de bioprocesso o ganho de intensidade de banda já não é mais tão intenso e, em 120 h, aparentemente ocorre o pico de produção. Dessa maneira, a colônia 11 foi selecionada para expressão em maior escala, que ocorreu por 120 h da etapa de indução, em volume final de 100 mL.

3.3.4. Purificação da r*Pl*_SerPep

Após a produção, o material foi centrifugado, filtrado e o sobrenadante foi aplicado em coluna de cromatografia contendo resina de níquel. O processo cromatográfico foi monitorado em 280 nm. O perfil cromatográfico da proteína está representado na figura 25.

Figura 25: Curva cromatográfica da r*Pl*_SerPep. Em azul, perfil de absorção de luz em comprimento de onda de 280 nm ao longo da cromatografia. Em vermelho, gradiente de concentração de imidazol na fase móvel da cromatografia. Observa-se um pico de absorção em torno de 20% do tampão com imidazol.

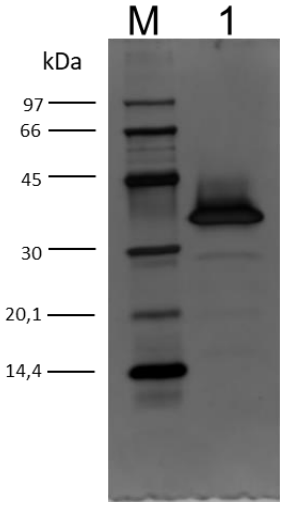


Fonte: Autor

Observou-se um pico de absorbância na concentração de 50 mM de imidazol, correspondente a r*Pl*_SerPep.

A pureza das amostras eluídas da coluna cromatográfica foi avaliada por SDS-PAGE, corado com nitrato de prata (Figura 26).

Figura 26: Teste de pureza da r*Pl*_SerPep. M: Marcador de massa molecular LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare); 1: Amostra de r*Pl*_SerPep purificada



Fonte: Autor

Observou-se uma banda proeminente entre as massas moleculares de 30 e 45 kDa, com aproximadamente 40 kDa, com um ligeiro arraste. Além disso, é possível identificar uma banda discreta em torno de 30 kDa.

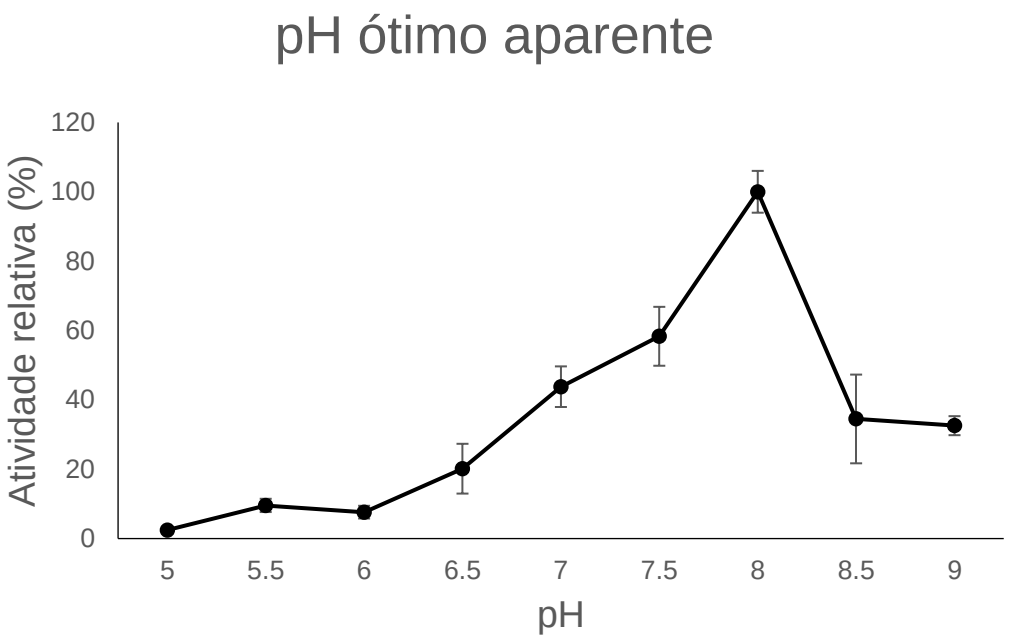
O fato de a amostra de r*Pl*_SerPep ter sido eluída da cromatografia com alta concentração implicou em um arraste na banda que está em torno de 40 kDa. A alta concentração de proteínas de mesma massa molecular pode gerar este tipo de artefato na eletroforese. A discreta banda em torno de 30 kDa pode ser uma parcela da própria r*Pl*_SerPep que tenha perdido a região do inibidor I9, ou seja, essa banda pode ser a enzima ativada. Já as “bandas fantasmas” podem ser produto de autocatálise da r*Pl*_SerPep, supondo que exista uma porção da proteína já ativada e capaz de atuar, mesmo em condições não ideais.

A enzima com alto grau de pureza seguiu para diálise para se remoção do imidazol da solução. Em seguida as amostras foram quantificadas e armazenadas em freezer a -20 °C. O rendimento de produção de enzima pura por litro de bioprocesso foi de 55 mg/L.

3.3.5. Caracterização bioquímica parcial

A etapa de caracterização bioquímica foi proposta para se estabelecer os principais parâmetros de atividade enzimática e gerar informações que possam indicar um potencial de aplicação biotecnológica da r*Pl*_SerPep. Os primeiros experimentos de teste de atividade enzimática foram as curvas de pH e temperatura ótimos aparente. Essas duas curvas balizam as condições de reação mais adequadas para a elaboração dos experimentos seguintes (Figuras 27 e 28).

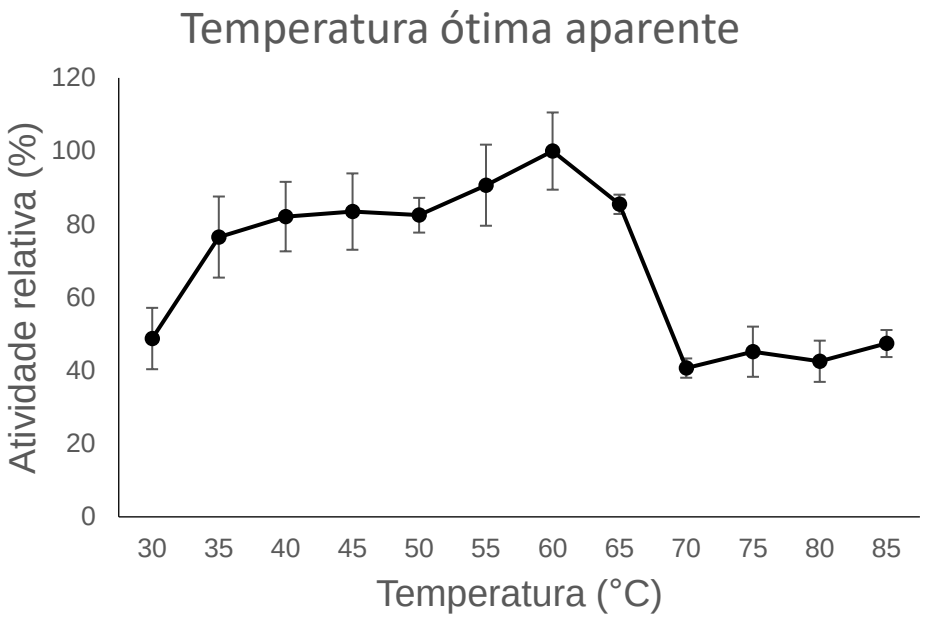
Figura 27: Curva de pH. Curva de atividade da r*Pl*_SerPep em diferentes pHs. Os resultados são apresentados como atividade relativa ao ponto de maior atividade, pH 8,0.



Fonte: Autor

Observa-se que o pH de maior atividade foi 8,0. Isso caracteriza a r*Pl*_SerPep como uma peptidase básica. Segundo Zibae e Ramzi, 2018, as enzimas degradadoras de cutícula de fungos apresentam pH ótimo entre 7 e 12, ou seja, são peptidases neutras ou básicas.

Figura 28: Curva de temperatura. Curva de atividade da r*Pl*_SerPep em diferentes temperaturas. Os resultados são apresentados como atividade relativa ao ponto de maior atividade, 60 °C.



Fonte: Autor

Como pode ser observado, a temperatura ótima aparente foi de 60 °C. Não foram encontrados relatos de enzimas degradadoras de cutícula com temperatura ótima acima de 45 °C. Os dados já relatados mostram temperaturas ótimas entre 35 e 45 °C (Zibae e Ramzi, 2018). Essa disparidade pode ter sido gerada por conta de a enzima ter sido produzida por outro organismo, *P. pastoris*, e alguma variação conformacional proporcionar uma maior rigidez, característica de enzimas termoestáveis.

As condições padrão para a reação foram definidas como pH 8,0 e temperatura de 55 °C. Apesar de 60 °C apresentar maior atividade, está próximo de 65 °C, que apresentou uma queda de rendimento, provavelmente por ter promovido desnaturação térmica na enzima.

O experimento que avalia a interferência de íons metálicos na atividade de r*Pl*_SerPep foi realizado com 12 sais diferentes. Os dados, em expressão relativa, foram agrupados na tabela 5.

Tabela 5: Teste de interferência de íons. 12 sais foram testados para se determinar suas influências na atividade catalítica de r*Pl*_SerPep. As atividades mostradas são consideradas relativas aos dados de uma reação sem adição de sais. Os *P* valores foram gerados por teste T de *student*.

Sal	Atividade relativa (%)	Desvio padrão (+/-)	*P* valor
KCl	114,7	9,0	0.039
$CaCl_2$	146,9	6,5	0.023
$MgSO_4$	138,6	4,1	0.034
$MnCl_2$	159,0	5,3	0.018
NaCl	125,9	3,6	0.067
$ZnSO_4.7H_2O$	115,2	8,0	0.207
BaCl	124,4	3,3	0.061
LiCl	127,6	4,5	0.064
$AlCl_3.6H_2O$	142,9	2,1	0.018
$CuCl_2$	87,8	9,6	0.101
$CoCl_2.6H_2O$	130,7	1,2	0.030
$NiSO_4.6H_2O$	119,4	4,1	0.115
Controle	100	8,8	-

Fonte: Autor

Observou-se um aumento da atividade enzimática em quase todos os sais testados, com exceção do $CuCl_2$, que apresentou uma redução de 12,2% da atividade da enzima sem adição de sais. Essa variação não é estatisticamente significante, segundo o teste realizado. Os outros sais de íons bivalentes, como $CaCl_2$, $MnCl_2$ e $CoCl_2.6H_2O$ apresentaram aumentos acima de 30% de sua atividade e *P* valores inferiores a 0,05. Os íons tetravalentes não apresentaram variações significativas de atividade relativa.

Em suma, observou-se que a presença dos sais $CaCl_2$, $MnCl_2$ e $AlCl_3.6H_2O$ na concentração de 4 mM promoveu uma modulação positiva na atividade de peptidase. O teste “T de *Student*” revela que $MnCl_2$ apresenta ativação significativamente maior que $AlCl_3.6H_2O$, com *P* valor de 0,0240. Já a comparação entre $CaCl_2$ e $MnCl_2$ gerou *P* valor de 0,0968, o que traz como não significante a variação de ativação entre os sais.

Os ensaios com surfactantes foram realizados contra SDS, CTAB, Triton X-100 e Tween 20. A atividade relativa foi calculada com base em uma reação sem adição de surfactantes. Os dados foram agrupados na tabela 6.

Tabela 6: Influência de surfactantes. Os surfactantes SDS, CTAB, Triton X-100 e Tween 20 foram testados para se determinar suas influências na atividade catalítica de r*Pl*_SerPep. As atividades mostradas são consideradas relativas aos dados de uma reação sem adição de surfactantes. Os *P* valores foram gerados por teste T de *student*.

Surfactante	Concentração (%)	Atividade relativa (%)	Desvio padrão (+/-)	*P* valor
SDS	0,02	60,88	3,77	0,019
	0,04	48,32	6,10	0,012
	0,06	62,21	2,01	0,030
	0,08	142,36	4,38	0,014
	0,1	61,64	3,56	0,025
CTAB	0,1	30,56	0,96	0,009
	0,2	12,62	1,81	0,006
	0,5	3,93	1,77	0,006
	1	1,81	0,40	0,006
Triton X-100	0,1	31,77	5,38	0,018
	0,2	53,52	2,09	0,031
	0,5	122,61	3,36	0,197
	1	77,62	2,19	0,063
Tween 20	0,1	86,81	4,48	0,128
	0,2	82,37	9,35	0,216
	0,5	84,08	9,84	0,305
	1	82,75	6,48	0,080
Controle	-	100	12,4	-

Fonte: Autor

A tabela mostra o efeito de surfactantes na atividade enzimática de r*Pl*_SerPep. Observou-se claramente um efeito de ativação com a adição de 0,08% de SDS, com *P* valor de 0,014 na comparação com a atividade residual. Esse tipo de surfactante interfere nas interações hidrofóbicas e, por ser aniônico, adiciona carga negativa na superfície da proteína (Hamin Neto et al., 2017). Possivelmente, na concentração exata de 0,08% as interações modificadas foram positivas para a catálise.

O efeito de CTAB sobre a atividade de r*Pl*_SerPep é de inibição. À medida que a concentração de CTAB foi aumentando, a atividade foi diminuindo ainda mais. CTAB é um surfactante catiônico e interfere nas interações hidrofóbicas ao inserir carga positiva na superfície das proteínas (Guzman et al., 2016). A adição de cargas positivas à r*Pl*_SerPep pode gerar comprometimento de ligações e causar desnaturação.

Triton X-100 e Tween 20 são surfactantes não iônicos, mas induziram respostas distintas sobre r*Pl*_SerPep. Triton X-100, em 0,1 e 0,2%, apresentou redução

significativa na atividade e, nas concentrações maiores, variações de atividade não significativas. Já Tween 20, apesar de apresentar atividade relativa com tendência de inibição, não foram números significantes estatisticamente. Sendo assim, os surfactantes que menos efeitos exercem sobre a atividade de r*Pl*_SerPep são os não iônicos.

Os agentes caotrópicos são caracterizados por promover desequilíbrio em ligações fracas, como ligações de hidrogênio e dissulfeto. Dessa forma, desestabilizam as interações entre os resíduos de aminoácidos que promovem importantes funções conformacionais na proteína, gerando desnaturação (Fonseca et al., 2006). Os ensaios de desafio da r*Pl*_SerPep contra esses agentes foram agrupados na tabela 7.

Tabela 7: Influência de agentes caotrópicos. Os agentes caotrópicos DTT, ureia e guanidina foram testados para se determinar suas influências na atividade catalítica de r*Pl*_SerPep. As atividades mostradas são consideradas relativas aos dados de uma reação sem adição agentes caotrópicos. Os *P* valores foram gerados por teste T de *student*.

Ag. caotrópico	Concentração (mM)	Atividade relativa (%)	Desvio padrão (+/-)	*P* valor
DTT	10	119.81	3.30	0.067
	25	113.01	25.19	0.368
	50	105.63	15.84	0.629
	100	117.67	19.08	0.298
	150	68.87	4.15	0.032
Ureia	10	145.76	12.26	0.027
	25	155.21	13.90	0.035
	50	108.48	11.46	0.198
	100	316.12	6.39	0.0002
	150	230.68	5.49	0.029
Guanidina	10	145.76	18.87	0.133
	25	116.31	2.52	0.033
	50	109.13	4.85	0.258
	100	80.13	12.11	0.110
	150	71.84	9.62	0.017
Controle	-	100	6,09	-

Fonte: Autor

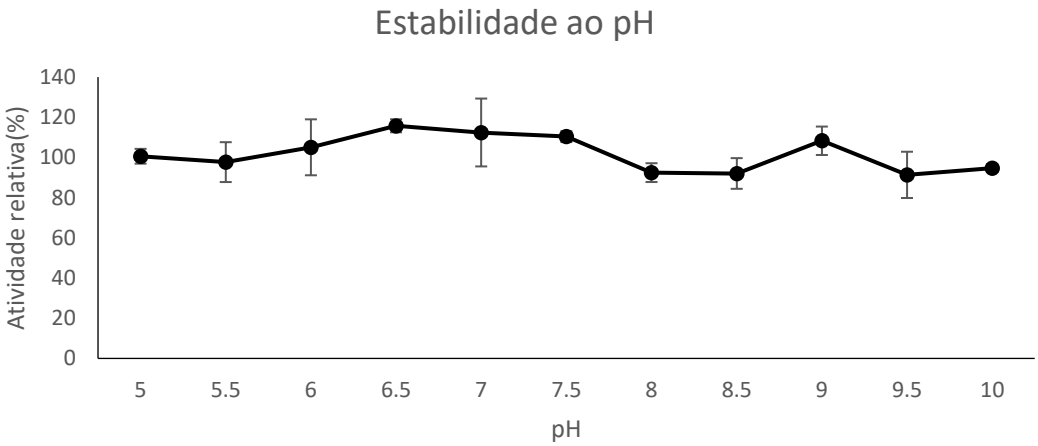
Os testes realizados com DTT mostraram que houve uma variação significante somente na concentração de 150 mM. Foi verificada uma atividade relativa de 68,87%. Essa “resistência” à presença de DTT pode ser explicada pelo baixo potencial de formação de pontes de dissulfeto, já que em sua sequência de aminoácidos existem

apenas 5 resíduos de cisteína, aminoácido responsável por gerar essas ligações devido à sua cadeia lateral (Burmeister Getz et al., 1999).

A ureia e guanidina atuam de maneira parecida sobre a proteína. Elas competem pelas ligações de hidrogênio realizadas entre os aminoácidos da cadeia de peptídeos e, com isso, desestabilizam a estrutura terciária das proteínas. O efeito gerado é a desnaturação das enzimas e consequente perda de função (Fonseca et al., 2006). Nos testes realizados com ureia, entretanto, foi verificado um aumento substancial da atividade de r*Pl*_SerPep, principalmente na concentração de 100 mM. Isso pode ter acontecido pois, nessa concentração, a ureia geraria uma flexibilização do sítio ativo e aumento da processividade da enzima. Mais testes serão necessários para melhor descrever o que gera esse aumento de atividade.

Os testes de estabilidade envolvem a exposição da enzima a variadas condições e depois avaliação da sua atividade residual na condição de reação considerada ótima aparente. Esses testes visam a vislumbrar possíveis aplicações para a enzima, visto que operações biotecnológicas geralmente acontecem em condições, principalmente de pH e temperatura específicas, por longos períodos. O teste de resistência ao pH foi realizado e os resultados foram plotados em um gráfico de dispersão (Figura 29).

Figura 29: Curva de estabilidade ao pH. Atividade de r*Pl*_SerPep após incubação por 1 h em diferentes pHs. As atividades mostradas são consideradas relativas aos dados de uma reação com enzima sem ter sofrido com incubação nos diferentes pHs.

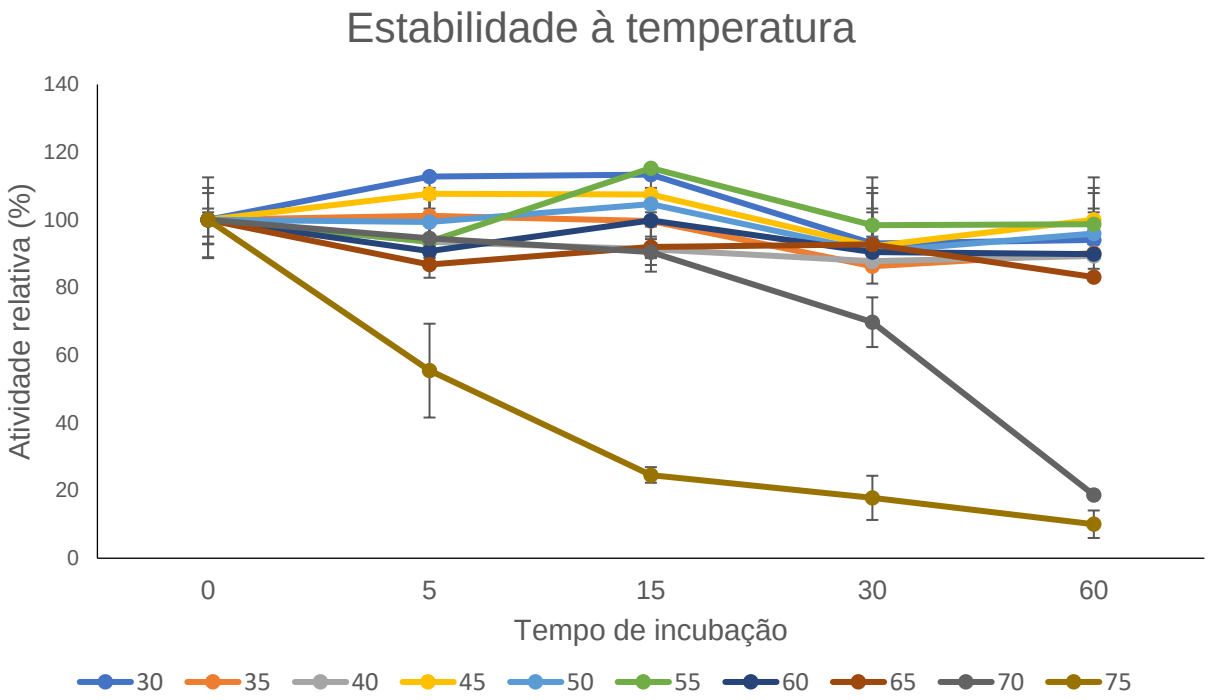


Fonte: Autor

Observa-se que a variação de pH não afeta a estrutura geral da r*Pl*_SerPep, dado que a variação de atividade não foi estatisticamente significante em nenhum dos pHs testados. Esse dado é interessante considerando uma potencial aplicabilidade para a r*Pl*_SerPep. Enzimas com alta atividade em uma ampla faixa de pH tendem a ser aplicadas industrialmente com mais facilidade (Hamin Neto et al., 2017).

A curva de estabilidade à temperatura foi plotada em forma de dispersão e apresenta os resultados da variação de temperatura de 30 a 75 °C e de tempo de exposição de 5 a 60 min (Figura 30)

Figura 30: Curva de estabilidade à temperatura. Atividade de r*Pl*_SerPep após incubação por diferentes períodos em diferentes temperaturas. As atividades mostradas são consideradas relativas aos dados de uma reação com enzima sem nenhum tratamento térmico.



Fonte: Autor

Pode-se observar que a enzima apresenta grande estabilidade diante de altas temperaturas. Analisando-se a temperatura de 70 °C, verifica-se que só houve queda de atividade estatisticamente significativa no ponto de 60 min. Para 75 °C, o *P* valor do ponto de 5 min. foi de 0,0508. Já com 15 min. de incubação pode-se observar queda de atividade residual significativa.

A comparação entre as curvas de temperatura ótima aparente e estabilidade à temperatura mostra que uma reação realizada a 65 °C apresenta desnaturação térmica, enquanto que, ao se incubar a enzima a essa temperatura por 60 min. e depois realizar uma reação a 55 °C, sua atividade atinge 100% da atividade residual, ou seja, não sofre desnaturação. Este curioso fato se dá porque o tempo de incubação para o teste de estabilidade se limitou a 60 min., enquanto o tempo de reação testado foi de 120 min. Provavelmente, se o teste de estabilidade avançasse até 120 min. de incubação, mostraria desnaturação térmica na temperatura de 65 °C.

O fato de a r*Pl*_SerPep ser resistente a altas temperaturas é um bom indício quando se pensa em uma possível aplicação industrial. Enzimas termo resistentes são mais bem aceitas pelas indústrias, pois a maioria dos processos industriais com peptidases ocorrem em temperaturas que superam 40 °C (Sharma et al., 2019).

3.3.6. Estudos estruturais

Para melhor entender estruturalmente a enzima r*Pl*_SerPep e o papel do inibidor I9 na atividade da enzima, realizamos os experimentos de SAXS. O experimento foi definido para determinar o envelope molecular de baixa resolução em solução. Os resultados foram sumarizados na tabela 8.

Tabela 8: Dados de SAXS sumarizados

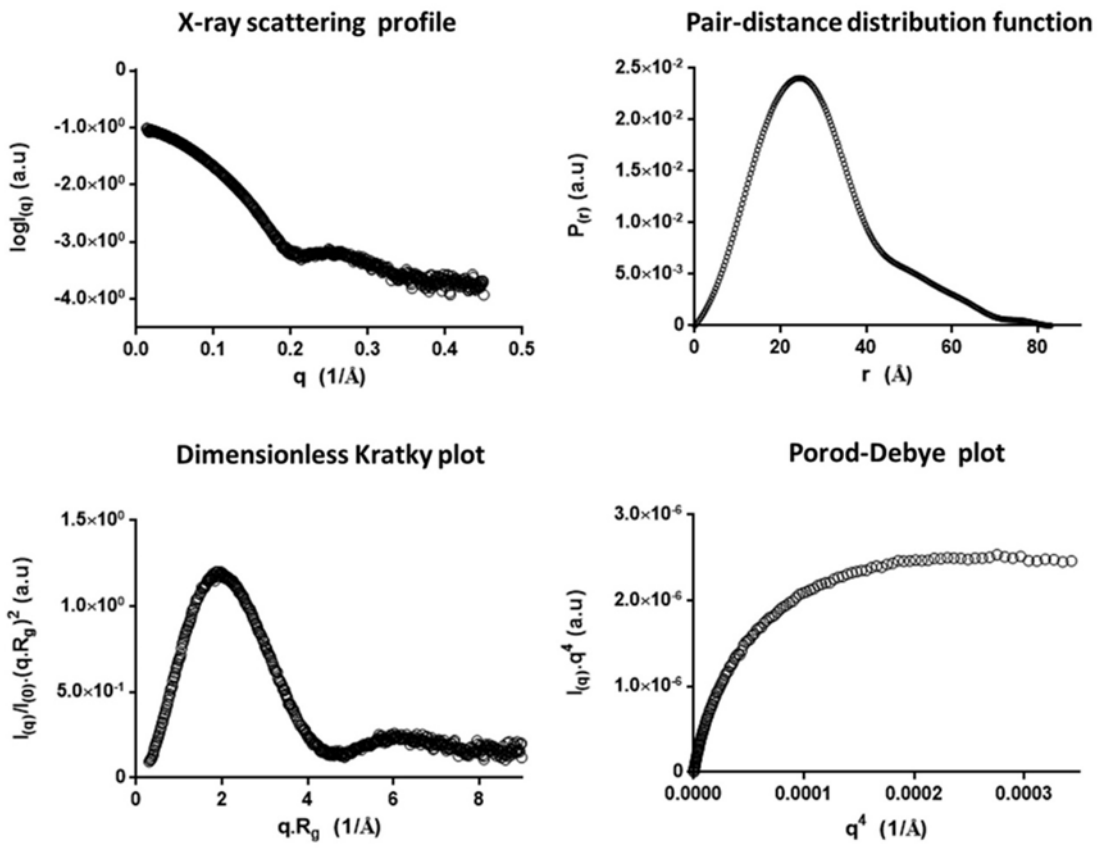
Dados de coleta	
Feixe de luz	LNLS-SAXS1
Comprimento de onda (Å)	1,55
Variação de q ($Å^{-1}$)	0,0129 – 0,3500
Tempo de exposição por *frame* (s)	30
Concentrações de proteína (mg/mL)	1,5, 3,0 e 6,0
Temperatura (°C)	20
Análise dos dados	
R_g (Å) (Guinier)	22,9
R_g (Å) (GNOM)	22,5
D_{max} (Å)	83
Massa molecular experimental (kDa)	29,9
Massa molecular teórica (kDa)	38.5

Estado oligomérico	Monômero
Modelamento *Ab initio*	
Número de modelos	10
Número de desv. padrão	0,848 +- 0,022
χ	4,67
Software usado	
Primeira redução de dados	Fit2D
Processamento de dados	PRIMUS
Modelamento	GASBOR

Fonte: Autor

Os softwares de análise geraram dispersões gráficas para melhor elucidar os resultados obtidos do espalhamento.

Figura 31: Representações gráficas dos resultados de SAXS. Os gráficos estão apresentados na língua inglesa, pois o software que plota os resultados assim os dispõe.

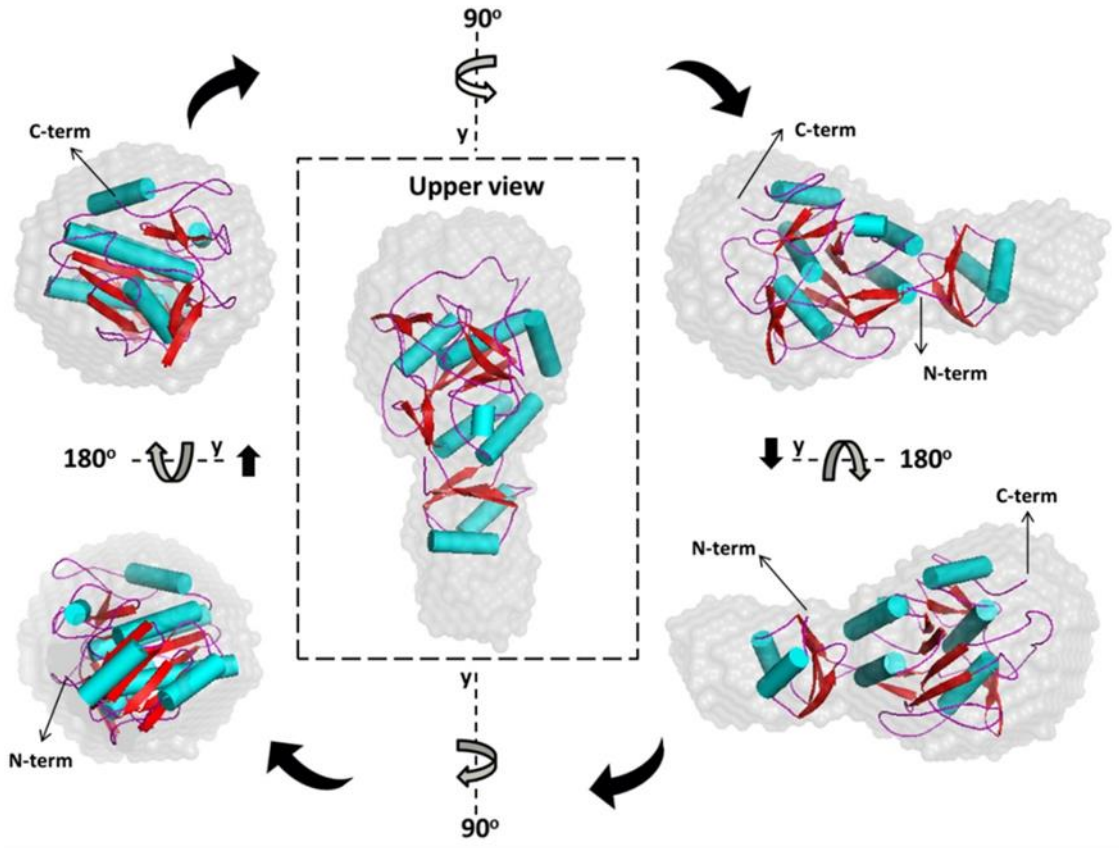


Fonte: Autor

r*Pl*_SerPep mostrou que D_{max} e R_g são iguais a 83 Å e 22,5 Å, respectivamente. O gráfico da distribuição de distância $P_{(r)}$ sugere uma forma de sino para r*Pl*_SerPep com uma cauda extendida, indicando que a proteína tem forma globular, com algum grau de elongação. No fim da cauda extendida é observado um segundo pico, muito pequeno, na "*q*-region" mais alta. Isso sugere um pequeno módulo, como uma protuberância, que aparece vindo da região globular.

O gráfico de Porod-Debye mostra um platô claro, consistente com as proteínas globulares sem regiões desordenadas. A curva adimensional de Kratky tem um máximo bem definido de 1,2 a qR_g = 1,86, que remete a uma proteína globular em solução. Além disso, mesmo a qR_g> 8, a linha de base mantém valores baixos, sugerindo um alto grau de compactação (Figura 32).

Figura 32: Representação espacial do modelo gerado por SAXS. O modelo estrutural mostrado internamente se trata da estrutura predita da r*Pl*_SerPep. A imagem em marca d'água representa geometricamente os resultados de SAXS.



Fonte: Autor

Com os resultados apresentados, pode-se sugerir que a porção alongada da estrutura globular se refere ao inibidor I9, dado que o mesmo se posiciona na porção N-terminal da r*Pl*_SerPep. Os inibidores I9 têm como característica estrutural a presença de 4 folhas β anti-paralelas e duas α-hélices (PFAM - https://pfam.xfam.org/). A estrutura predita mostra exatamente essas características. Os dados de SAXS sugerem também que há pouca flexibilidade desta região. Os resultados de atividade contra agentes caotrópicos, mais especificamente ureia a 100 mM mostraram uma ativação substancial da enzima. Uma hipótese levantada é que a quebra de ligações fracas promovida pela ureia pode ter aumentado a flexibilidade dessa porção alongada e, por consequência, a enzima se ativou de maneira mais eficiente. Essa hipótese será testada no futuro realizando-se um novo experimento de SAXS em tampão contendo ureia. O resultado que comprovaria essa hipótese seria uma curva adimensional de Kratky mostrando maior flexibilidade dessa região.

Experimentos preliminares de dicroísmo circular (não mostrados) mostraram uma alta porcentagem de α-hélices na estrutura de r*Pl*_SerPep. Esse fato sugere uma explicação para a alta estabilidade térmica da enzima, visto que existe uma forte associação entre a presença de α-hélices estáveis e termoestabilidade enzimática (Yakimov et al., 2016).

Ainda faltam estudos estruturais para proteínas mais próximas da r*Pl*_SerPep para se basear melhor as discussões. Nossa colaboração com o grupo do Prof. Dr. Igor Polikarpov irá gerar esse tipo de informação via cristalização enzimática. Temos alguns resultados preliminares de cristais formados, que ainda necessitam aprimoramento do protocolo de cristalização, e em breve teremos os dados de difração de raios-X para melhor entender essas questões estruturais da r*Pl*_SerPep.

3.4. Metalo peptidase

3.4.1. Caracterização do gene

O gene da *Pl*_MetPep foi selecionado do banco de dados do transcriptoma *de novo* de *P. lilacinum* por apresentar similaridade com uma metalo peptidase já caracterizada em nosso grupo de pesquisa. O gene foi então caracterizado e foi possível

observar que o mesmo codifica um peptídeo sinal de secreção. Considerando que em nossa estratégia de expressão recombinante iremos utilizar o vetor pPICZα-A, que já possui o fator α de secreção, decidimos retirar essa sequência do gene desenhado para produção. A sequência do peptídeo retirado é MRTAVLIAALVASTAA. O gene foi sintetizado para integrar o pPICZα-A, como mostrado na figura 33.

Figura 33: Caracterização do gene *Pl*_MetPep e sua tradução *in silico*. Os 89 resíduos de aminoácidos sublinhados representam o fator α de secreção do vetor pPICZα-A. Os blocos pretos representam as enzimas de restrição escolhidas para clonagem *Xho*-I e *Xba*-I. O restante da sequência corresponde à enzima madura.

```
                    10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Peptidase_M35       ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTC
                     M  R  F  P  S  I  F  T  A  V  L  F  A  A  S  S  A  L  A  A  P  V  N  T  T  T  E  D  E  T  A  Q  I

                   110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Peptidase_M35       CGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAA
                    P  A  E  A  V  I  G  Y  S  D  L  E  G  D  F  D  V  A  V  L  P  F  S  N  S  T  N  N  G  L  L  F  I  N

                   210       220       230       240       250       Xho-I 260 270       280       290       300
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Peptidase_M35       TACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGACTCGAGAAAAGAATTCCAGCTGACTCCCAGGGTAGAACTGCTACT
                     T  T  I  A  S  I  A  A  K  E  E  G  V  S  L  E  K  R  L  E  K  R  I  P  A  D  S  Q  G  R  T  A  T

                   310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Peptidase_M35       GGTACTGACGTTAAGTCCACCAGACACTTGACTAACACCGGTGGTAATTCCTTGGGTTCCACTGCTACCTTGCAGAAGAGAGCTAACATTGCCAAGTCCT
                     G  T  D  V  K  S  T  R  H  L  T  N  T  G  G  N  S  L  G  S  T  A  T  L  Q  K  R  A  N  I  A  K  S

                   410       420       430       440       450       460       470       480       490       500
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Peptidase_M35       GCCAAGGTAACTTGGACTTCGTTCAAACTGCCTTGCAGGGTTGTGCTGAAAGAGCTGCTGCTTCTGCTAAAGAGGCTTTGAACGGTTCCTCCAAGTTGAT
                    C  Q  G  N  L  D  F  V  Q  T  A  L  Q  G  C  A  E  R  A  A  A  S  A  K  E  A  L  N  G  S  S  K  L  M

                   510       520       530       540       550       560       570       580       590       600
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Peptidase_M35       GCAGGACATCTTCCACACTTCCGACCAAGGTGCTAGAAGATTCGTTTCCGACGTGTTCACTAAGATCGCTGACGAGTGCGGTAGAAAAGAAGGTGGTTCT
                     Q  D  I  F  H  T  S  D  Q  G  A  R  R  F  V  S  D  V  F  T  K  I  A  D  E  C  G  R  K  E  G  G  S

                   610       620       630       640       650       660       670       680       690       700
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Peptidase_M35       GTTCACGTTGCTTGTGGTGCTAGACCAGAGTGTAGAGATGACAACGGTCAAGAACTTGGTGCTTGGACTGATAAGCCAGGTCCAAACTTGAACTTGTGCC
                     V  H  V  A  C  G  A  R  P  E  C  R  D  D  N  G  Q  E  L  G  A  W  T  D  K  P  G  P  N  L  N  L  C
                                                                                  .
                                                                                  .
                                                                                  .

                  1010      1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080      1090      1100
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Peptidase_M35       CAGGACAATCTTCACAAGGTGGTCCAGAATCTTTGCCATCTGACTCTCCATCTCAGGGTCCAGAAACTCCAAACGAAGGTCCATCTTCTGGTAAGGGTGA
                    P  G  Q  S  S  Q  G  G  P  E  S  L  P  S  D  S  P  S  Q  G  P  E  T  P  N  E  G  P  S  S  G  K  G  E

                  1110      1120      1130  Xba-I
                    ....|....|....|....|....|....|...|..
Peptidase_M35       ATTGGGTGATCATCACCACCACCATCATTGATCTAGA
                     L  G  D  H  H  H  H  H  H  *
```

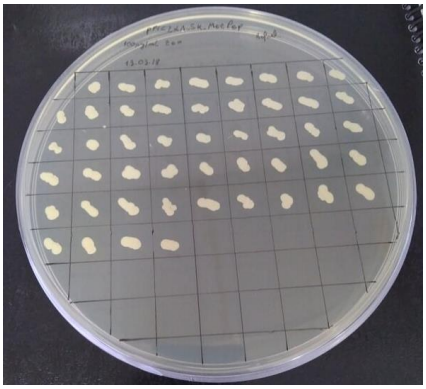
Fonte: Autor

Segundo o que foi projetado, o gene será traduzido com o peptídeo sinal “fator α”, que será clivado no sítio da peptidase Kex-II no momento da secreção. A proteína deve então ser encontrada no sobrenadante do bioprocesso, com aproximadamente 29,9 kDa.

3.4.2. Transformação em *Pichia pastoris*

Tendo o plasmídeo com a construção pPICZα-*Pl*_MetPep em mãos, realizamos a reação de linearização com base no sítio de Pme-I 5'-GTTTAAAC-3'. Logo após sua purificação, o DNA foi misturado às células de *P. pastoris* competentes para a transformação. O resultado da transformação é verificado com o crescimento de colônias resistentes à Zeocina (Invitrogen). Logo que as colônias isoladas aparecem, a placa é repicada para placas com espaço delimitado. Isso permite que as colônias permaneçam isoladas e possam ser testadas perante a capacidade de produzir as proteínas heterólogas (Figura 34).

Figura 34: Colônias de *P. pastoris* transformadas com pPICZα-*Pl*_MetPep.

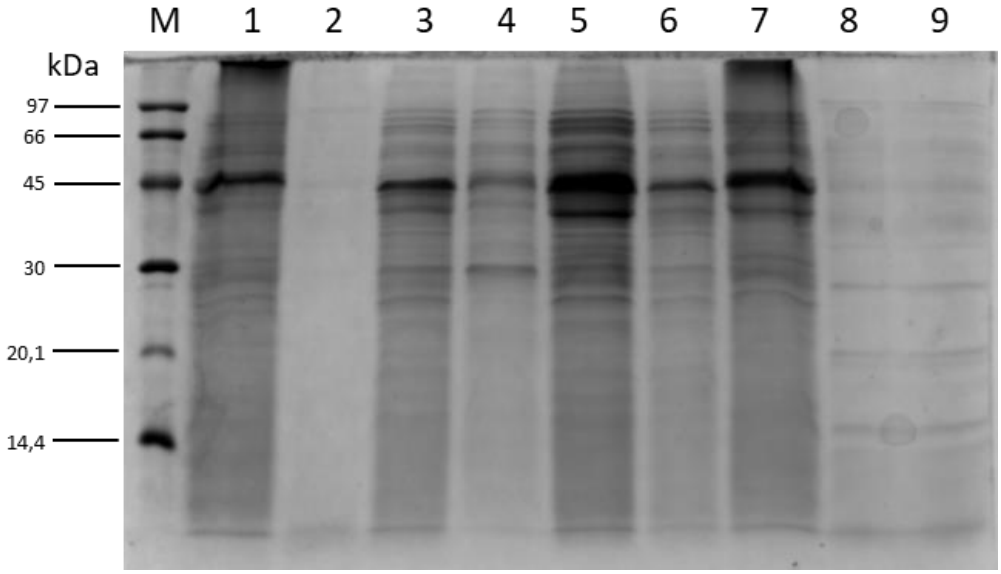


Fonte: Autor

3.4.3. Bioprocesso de expressão recombinante

O primeiro bioprocesso realizado após a transformação em células de *P. pastoris* é um *screening* de quais colônias são melhores produtoras da r*Pl*_MetPep. Dentre as primeiras 20 colônias testadas, foi possível observar, por SDS-PAGE, que algumas se destacaram ao produzir quantidades visíveis (em SDS-PAGE) da proteína.

Figura 35: *Screening* de colônias produtoras da r*Pl*_MetPep. SDS-PAGE 12% M: Marcador de massa molecular LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare), valores em kDa. Amostras de 1 a 9 são extratos de bioprocessos das colônias que cresceram após a transformação.

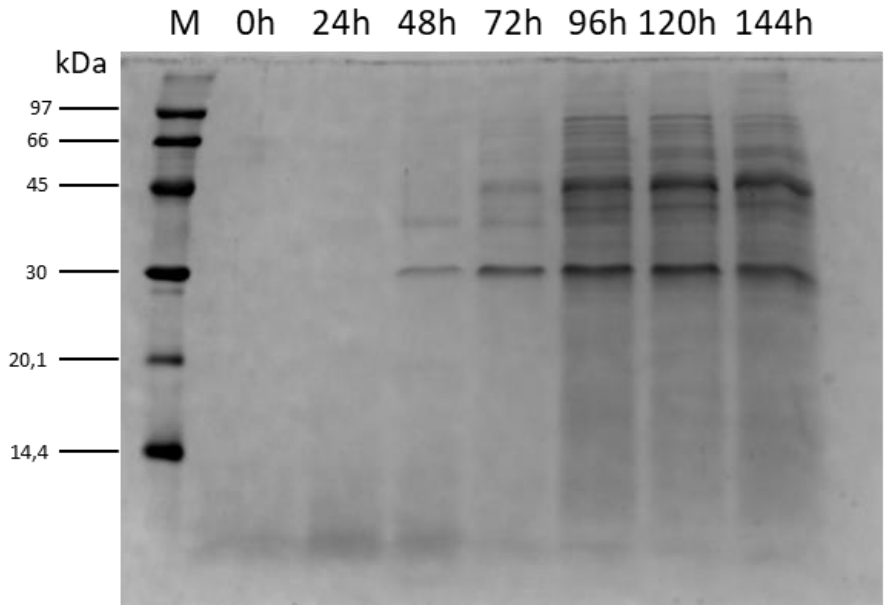


Fonte: Autor

Pode-se observar que a amostra 4 se sobressaiu por apresentar uma banda com massa molecular próxima de 30 kDa. A amostra 4 se refere à colônia 12 do *screening*. Considerando que a massa molecular esperada para a enzima em sua forma precursora é 29,9 kDa, consideramos que essa banda proeminente é da r*Pl*_MetPep.

Pelo fato de a colônia 12 apresentar essa banda promissora, foi realizado um SDS-PAGE com todos os tempos de bioprocesso dessa amostra para determinar quando ocorreu o pico de produção (Figura 36).

Figura 36: Curva de expressão da colônia 12. SDS-PAGE 12% dos tempos de indução da colônia 12. M: Marcador de massa molecular LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare).



Fonte: Autor

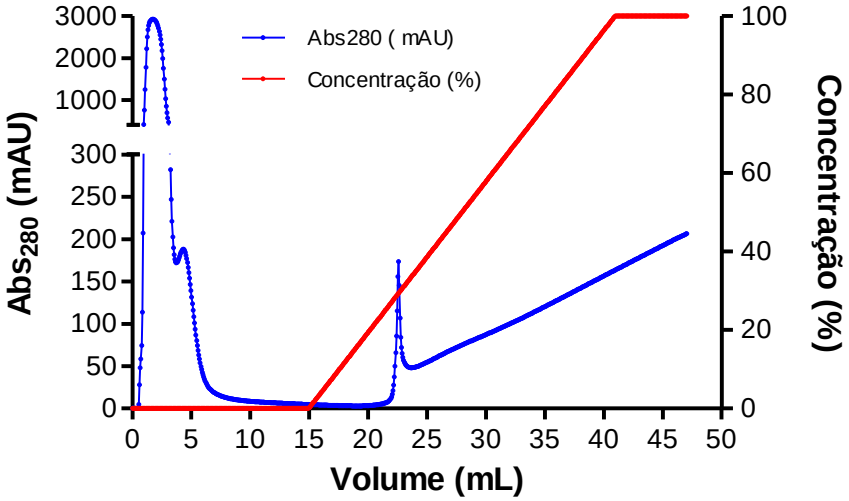
Observa-se que ao decorrer do bioprocesso a banda próxima de 30 kDa aumenta sua intensidade até 96 h de indução. Observa-se também que há uma banda na altura de 45 kDa. Essa banda aumenta de intensidade de maneira mais expressiva no tempo de 96 h. Com o objetivo de fazermos uma expressão com prevalência da banda de 30 kDa, escolhemos o ponto de 72 h para parar o bioprocesso. A banda de 45 kDa pode ser um contaminante secretado por *P. pastoris* ou a própria r*Pl*_MetPep glicosilada. Mais estudos são necessários para confirmar a origem desta banda.

Dessa maneira, a colônia 12 foi selecionada para expressão em maior escala, que ocorreu por 72 h da etapa de indução, em volume final de 100 mL.

3.4.4. Purificação da r*Pl*_MetPep

Após a produção, o material foi centrifugado, filtrado e o sobrenadante foi aplicado em coluna de cromatografia contendo resina de níquel. O processo cromatográfico foi monitorado em 280 nm. O perfil cromatográfico da proteína está representado na figura 37.

Figura 37: Curva cromatográfica da r*Pl*_MetPep. Em azul, perfil de absorção de luz em comprimento de onda de 280 nm ao longo da cromatografia. Em vermelho, gradiente de concentração de imidazol na fase móvel da cromatografia. Observa-se um pico de absorção em torno de 30% do tampão com imidazol.

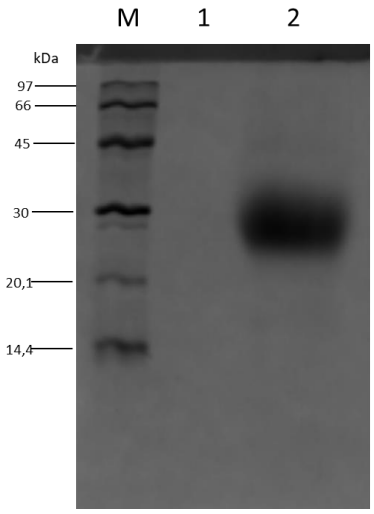


Fonte: Autor

Observou-se um pico de absorbância na concentração de 75 mM de imidazol, correspondente a r*Pl*_MetPep.

A pureza das amostras eluídas da coluna cromatográfica foi avaliada por SDS-PAGE, corado com nitrato de prata (Figura 38).

Figura 38: Teste de pureza da r*Pl*_MetPep. M: Marcador de massa molecular LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare); 1: sem amostra; 2: amostra de r*Pl*_MetPep purificada



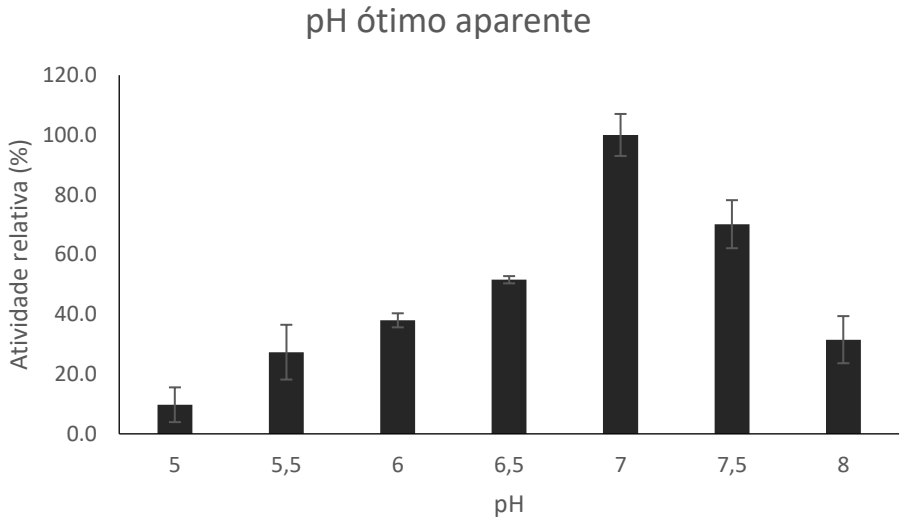
Fonte: Autor

O SDS-PAGE mostrou uma banda única na altura da massa molecular de 30 kDa, sem contaminação aparente. Tendo se conseguido um alto grau de pureza para r*Pl*_MetPep, seguiu-se com a diálise das amostras, para se retirar o imidazol da solução. Em seguida as amostras foram quantificadas e armazenadas em freezer a -20 °C. O rendimento de produção de enzima pura por litro de bioprocesso foi de 10 mg/L.

3.4.5. Caracterização bioquímica parcial

A etapa de caracterização bioquímica foi proposta para se estabelecer os principais parâmetros de atividade enzimática e gerar informações que possam indicar um potencial de aplicação biotecnológica para r*Pl*_MetPep. Os primeiros experimentos de teste de atividade enzimática foram as curvas de pH e temperatura ótimos aparente. Essas duas curvas balizam as condições de reação mais adequadas para a elaboração dos experimentos seguintes (Figuras 39 e 40).

Figura 39: Curva de pH. Curva de atividade da r*Pl*_MetPep em diferentes pHs. Os resultados são apresentados como atividade relativa ao ponto de maior atividade, pH 7,0.

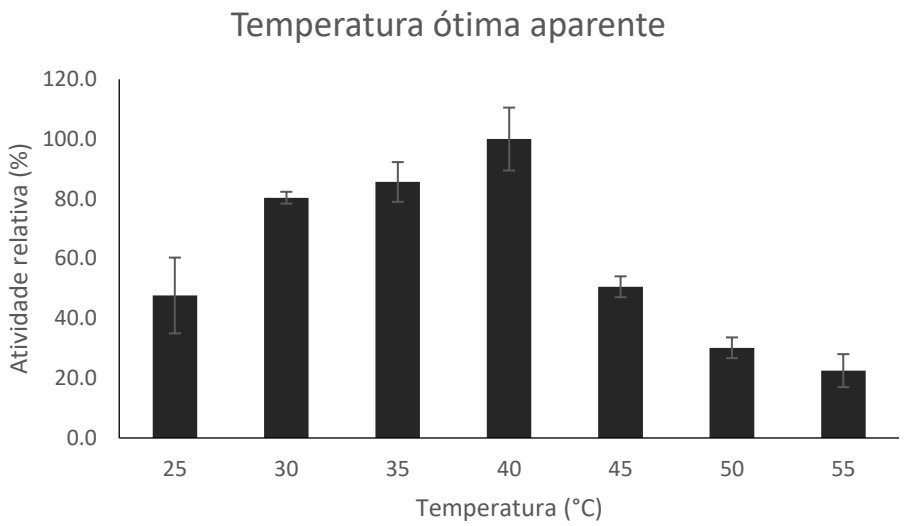


Fonte: Autor

Observa-se que o pH de maior atividade foi 7,0. Isso caracteriza a r*Pl*_MetPep como uma peptidase neutra. Várias metalo peptidases de microrganismos já foram caracterizadas como peptidases neutras. É o caso dos organismos *Microbacterium sp.*

(Thys e Brandelli, 2006), *Penicillium spp.* (El-Gendy, 2010), *Thermoascus aurantiacus* (Merheb-Dini et al., 2009), *Streptomyces septatus* TH-2 (Hatanaka et al., 2005) e outras. A metalo peptidase de *E. javanicum*, cuja sequência foi utilizada para a prospecção da *Pl*_MetPep, também apresentou característica de peptidase neutra.

Figura 40: Curva de temperatura. Curva de atividade da r*Pl*_MetPep em diferentes temperaturas. Os resultados são apresentados como atividade relativa ao ponto de maior atividade, 40 °C.



Fonte: Autor

A r*Pl*_MetPep apresentou como temperatura ótima aparente 40 °C. Metalo peptidase de *Aspergillus fumigatus* tem temperatura ótima de 50 °C. Já a de *E. javanicum* apresentou temperatura ótima de 60 °C.

Mais testes serão feitos futuramente para melhor caracterizar bioquimicamente a r*Pl*_MetPep e então se estabelecer se há algum potencial de aplicação industrial para esta enzima.

4. Conclusões

O genoma de *P. lilacinum* apresenta muito potencial para exploração de suas enzimas. A r*Pl*_SerPep, que já foi melhor descrita, apresentou características interessantes para aplicação industrial, como estabilidade térmica e possibilidade de ativação com ureia. Já a r*Pl*_MetPep ainda precisa ser melhor estudada para ter seu

potencial avaliado. Além dessas enzimas, existem outras ainda não estudadas que podem ser melhor exploradas em projetos futuros.

Estruturalmente, a r*Pl*_SerPep apresentou peculiaridades, como uma região extendida, referente ao inibidor I9. Como essa região se apresentou rígida na solução testada com o SAXS, uma nova coleta de dados será realizada em tampão contendo ureia, para se determinar se há flexibilização dessa região.

3. Discussão geral

O capítulo 1 mostra quais mecanismos moleculares são adotados pelo *P. lilacinum* para que ele se torne resistente. Ficou claro que existe um aumento de expressão nos genes homólogos que codificam a enzima alvo dos antifúngicos testados, a lanosterol – 1,4 – alfademetilase. Com mais dessa enzima no meio intracelular, mais antifúngico é necessário para barrar a síntese de ergosterol do fungo. Provavelmente existe um limite, em que o fungo não consegue produzir enzima suficiente para sobrepor a concentração intracelular do antifúngico. Pelos resultados apresentados, os tratamentos não chegaram a esse ponto, visto que não houve alteração nas taxas de crescimento nas amostras tratadas.

Outro fator que aparece como auxiliar desse fenômeno é o aumento da expressão de genes que codificam proteínas bombas de efluxo. Já é sabido que essas proteínas membranares promovem a expulsão das moléculas de antifúngicos para o meio extracelular e o efeito disso é a diminuição das concentrações intracelulares de antifúngico. Em suma, aparentemente os dois mecanismos agem em sinergia. Enquanto a expressão de enzima alvo é aumentada para suprimir a presença intracelular de antifúngico, a expressão de bombas de efluxo também é aumentada para impedir que o antifúngico atinja concentrações intracelulares que superem a expressão da lanosterol – 1,4 – alfademetilase a ponto de causar danos ao *P. lilacinum*.

O capítulo 2 tem uma abordagem mais exploratória das peptidases produzidas pelo fungo, que foram expressas de maneira heteróloga em *P. pastoris*. Observou-se que a r*Pl*_SerPep é caracterizada como uma enzima degradadora de cutícula. Os dados bioquímicos mostraram uma enzima com grande estabilidade ao pH e à temperatura. Além disso, observou-se uma ativação substancial da enzima na presença de 100 mM de ureia. Os dados de resolução do envelope molecular mostrara que a proteína é globular e apresenta uma extensão, referente ao inibidor I9.

Essa extensão, ao contrário do que é esperado para esse tipo de enzima com inibidor, se apresentou rígida. Essa rigidez pode estar dificultando a ativação da enzima em tampões livres de ureia. Quando a ureia se faz presente, portanto, calcula-se que ocorra

uma flexibilização dessa região por quebra de ligações fracas. O efeito dessa flexibilização seria uma ativação mais eficiente da enzima, o que teria gerado maiores atividades nessa condição.

O fato da estrutura secundária da r*Pl*_SerPep ter uma alta concentração de α-hélices e o envelope molecular mostrar uma proteína globular coêsa provavelmente influenciam na sua estabilidade térmica. Estudos apontam que a presença de α-hélices estáveis podem trazer termoestabilidade para as enzimas. Além disso, a coesão da molécula dificulta a desnaturação térmica, provocada por aumento de energia cinética da solução.

Os resultados da r*Pl*_MetPep ainda serão complementados para que se tenha uma visão geral de sua atividade perante os substratos testados.

4. Conclusão geral

O presente trabalho mostrou diferentes abordagens moleculares que ajudaram a melhor descrever o fungo *P. lilacinum*. Este fungo apresenta importância agropecuária e médica e sua completa descrição é de interesse pois, apesar de ser um patógeno emergente, possui um perfil genético com grande potencial biotecnológico.

Os conhecimentos gerados foram que o fungo lança mão de controle de expressão de genes específicos para conseguir se tornar resistente a antifúngicos e que possui em seu genoma genes de peptidases com potencial de aplicação industrial. Principalmente uma serino peptidase termotolerante.

Referências bibliográficas

Aguilar, C., Pujol, I., Sala, J., Guarro, J. Antifungal susceptibilities of *Paecilomyces* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42(7)**, 1601-4. (1998)

Albesiano, E., Messmer, B. T., Damle, R. N., Allen, S. L., Rai, K. R., Chiorazzi, N. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. Blood. 102(9), 3333-9. (2003).

Alcazar-Fuoli L, Mellado E. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. Frontiers in Microbiology. 2012;3:439. doi:10.3389/fmicb.2012.00439.

Altschul SF; Gish W; Miller W; Myers EW; Lipman DJ., Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215: 403-10 (1990).

Andrews, S. FastQC A Quality Control tool for High Throughput SequenceData. Version 0.11.8. Babraham Institute. http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/. (2018).

Banerjee B, Greenberger PA, Fink JN, Kurup VP. Immunological Characterization of Asp f 2, a Major Allergen from *Aspergillus fumigatus* Associated with Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. Kozel TR, ed. Infection and Immunity. 1998;66(11):5175-5182.

Banu, J. G., Rohini, I., and Gunasekaran, M. Mass multiplication and formulation of a nematophagous fungus, *Paecilomyces lilacinus*. Int. J. Nematol. 16, 145–152. (2006).

Blosser SJ, Cramer RA. SREBP-dependent triazole susceptibility in *Aspergillus fumigatus* is mediated through direct transcriptional regulation of erg11A (cyp51A). Antimicrob Agents Chemother 2012; 56:248–257. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05027-11.

Boettner, M.; Prinz, B.; Holz, C.; Stahl, U.; Lang, C. (2002) High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. Journal of Biotechnology. v. 99, May. p. 51-62.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72, 248-54 (1976).

Burhan, Abbas H; Annon, Mohammed R., Pathogenesis of Paecilomyces lilacinus against the immature stages of Musca domestica L. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research; Cuddalore Vol. 11, Ed. 4 : 1595-1601. (2019).

Burmeister Getz E., Xiao M., Chakrabarty T., Cooke R., Selvin P.R. A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. Anal. Biochem.,273:73–80. doi: 10.1006/abio.1999.4203. (1999).

Carey, J., D'Amico, R., Sutton, D. A., & Rinaldi, M. G. *Paecilomyces lilacinus* vaginitis in an immuno-competent patient. Emerging Infectious Diseases, 9(9), 1155-8. (2003).

Carmona, A. K.; Juliano, M. A.; Juliano, L. The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 381–92, 2009.

Castellani, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. J. trop Med. Hyg., 70, 181-184. (1967).

Chalissery, J., Jalal, D., Al-Natour, Z., Hassan, A. H. Repair of oxidative DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst).* **51,** 2–13. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.12.010. (2017).

Chamilos, G., Kontoyiannis, D. P. Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist. Updat*. **8** 344–358. 10.1016/j.drup.2006.01.001. (2005).

Chowdhary, A., Kathuria, S., Xu, J., Meis, J, F. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. *PLoS Pathog*. **9(10),** e1003633. (2013).

Como JA, Dismukes WE. 1994. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. N Engl J Med 330:263–272. http://dx.doi.org/10.1056 /NEJM199401273300407.

DelMar E, Largman C, Brodrick J, Geokas M., A sensitive new substrate for chymotrypsin. Anal Biochem. 99:316–320. doi:10.1016/s0003-2697(79)80013-5. (1979).

Dias BA, Neves PMOJ, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. Brazilian Journal of Microbiology. 2008;39(2):301-306. doi:10.1590/S1517-838220080002000019.

Dobin, A., et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics(Oxford, England), 29(1), 15-21. (2012).

El-Gendy, M. M. A. (2010). Keratinase production by endophytic *Penicillium spp*. Morsy1 under solid-state fermentation using rice straw. Appl. Biochem. Biotechnol. 162, 780–794. doi: 10.1007/s12010-009-8802-x

Espadale, E., Buckley, L., Borio, S., McEwan, N., Schmidt, V. Successful multimodal treatment of *Paecilomyces lilacinus* infection in a dog Veterinary Record Case Reports 6: e000627. doi: 10.1136/vetreccr-2018-000627. (2018)

Evans, J. M., Wang, A. L., & Elewski, B. E. Successful treatment of *Paecilomyces lilacinus* onychomycosis with efinaconazole and tavaborole. *Skin Appendage Disorders*. **1(4)**, 169-71 (2016).

Finn R.D., Clements J., Eddy S.R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching., Nucleic Acids Research (2011) Web Server Issue 39:W29-W37.

Fischer, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. Journal of Applied Crystallography, v. 43, n. 1, p. 101-109, 2009.

Fonseca, L. C., Corrêa, N. C. R., Garrote-Filho, M. da S., Cunha, C. C. da, e Penha-Silva, N., Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. Química Nova, 29(3), 543-548. https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000300024. (2006).

Giosa D, Felice MR, Lawrence TJ, et al. Whole RNA-Sequencing and Transcriptome Assembly of *Candida albicans* and *Candida africana* under Chlamydospore-Inducing Conditions. Genome Biology and Evolution. 2017;9(7):1971-1977. doi:10.1093/gbe/evx143.

Giovanini G. T., Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis koningii.* Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da USP – Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos., Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral. 2014.

Graninger W., Diab-Elschahawi M., Presterl E. (2019) Antifungal Agents. In: Presterl E. (eds) Clinically Relevant Mycoses. Springer, Cham

Gupta R., E. Jung and S. Brunak. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. In preparation, 2004.

Guzman, M. L., Marques, M. R., Olivera Me, M. E., & Stippler, E. S., Enzymatic activity in the presence of surfactants commonly used in dissolution media, Part 1: Pepsin. Results in pharma sciences, 6, 15–19. doi:10.1016/j.rinphs.2016.02.002. (2016).

Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M, Macmanes MD, Ott M, Orvis J, Pochet N, Strozzi F, Weeks N, Westerman R, William T, Dewey CN, Henschel R, Leduc RD, Friedman N, Regev A. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nat Protoc. 2013

Aug;8(8):1494-512. Open Access in PMC doi: 10.1038/nprot.2013.084. Epub 2013 Jul 11. PubMed PMID:23845962.

Hall T. A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98. (1999).

Hall, V. C., Goyal, S., Davis, M. D. P., Walsh, J.S. Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus*: report of three cases and review of the literature. *Int J Dermatol*, **43**, 648-653. (2004)

Hamin Neto, Y. A. A.; De Oliveira, L. C. G., De Oliveira, J. R. ; Juliano, M. A. ; Juliano, L., Arantes, E. C. ; Cabral, H., Analysis of the Specificity and Biochemical Characterization of Metalloproteases Isolated from *Eupenicillium javanicum* Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Peptides. Frontiers in Microbiology (Online), v. 7, p. 1., (2017).

Hatanaka, T., Arima, J., Uesugi, Y., and Iwabuchi, M. (2005). Purification, characterization cloning, and sequencing of metalloendopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2. Arch. Bioquem. Biophys. 434, 289–298. doi: 10.1016/j.abb.2004.11.018

Hokken, M., *et al.* Phenotypic plasticity and the evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*; an expression profile of clinical isolates upon exposure to itraconazole. *BMC genomics*, **20(1)**, 28. doi:10.1186/s12864-018-5255-z. (2019).

Illumina. TruSeq RNA Sample Preparation kit v2. Illumina website.https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseqrna/truseq-rna-sample-prep-v2-guide-15026495-f.pdf. (2014).

Jatala P, Kaltenbach R, Bocangel M. "Biological control of Meloidogyne incognita acrita and *Globodera pallida* on potatoes". Journal of Nematology. 11: 303. (1979).

Kelley, L. A., Mezulis, S.Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis., Nature Protocols., 10:845 DOI: 10.1038/nprot.2015.053 (2015)

Khalique Z, Hatipoğlu S, Rosendahl U, Mohiaddin R. Unusual complicated fungal endocarditis in a patient with vascular Ehlers-Danlos Syndrome. *The Annals of Thoracic Surgery*. doi: https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2018.08.074 (2018)

Khan A, Williams KL, Nevalainen HK (2004). "Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of Meloidogyne javanica juveniles". Biological Control. 31 (3): 346–52. doi:10.1016/j.biocontrol.2004.07.011

Khan, Z., *et al.Purpureocillium lilacinum* as a cause of cavitary pulmonary disease: a new clinical presentation and observations on atypical morphologic characteristics of the isolate. *Journal of Clinical Microbiology*. **50(5)**, 1800-4 (2012).

Kiewnick, S., Neumann, S., Sikora, R. a., and Frey, J. E. (2011). Effect of *Meloidogyne incognita* inoculum density and application rate of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 on biocontrol efficacy and colonization of egg masses analyzed by real-time quantitative PCR. Phytopathology 101, 105–112. doi: 10.1094/PHYTO-03-10-0090

Kontoyiannis, D.P., Sagar, N., Hirschi, K.D. Ovrexpression of Erg11p by the regulatable GAL1 promoter confers fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **43**, 2798–2800. (1999).

KOZIN, M. B.; SVERGUN, D. I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. Journal of Applied Crystallography, v. 34, n. 1, p. 33-41, Feb. 2001.

Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol. 2001 Jan 19;305(3):567-80.

Leonardelli F, Macedo D, Dudiuk C, Cabeza MS, Gamarra S, Garcia-Effron G. *Aspergillus fumigatus* Intrinsic Fluconazole Resistance Is Due to the Naturally Occurring T301I Substitution in Cyp51Ap. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2016;60(9):5420-5426. doi:10.1128/AAC.00905-16.

Li, B., & Dewey, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics, 12, 323.doi:10.1186/1471-2105-12-323. (2011).

Li, W., and Godzik A. , CD-HIT: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics 22:1658-1659. (2006).

Lopes N. P., Pesquisas de novas enzimas levam Nobel de Química 2018., 2018. Acessado em 12/06/2019 em https://jornal.usp.br/artigos/pesquisas-de-novas-enzimas-levam-nobel-de-quimica-2018/

Love M. I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change anddispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology, 15, 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8. (2014).

Luangsa-ard J., et al. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. FEMS Microbiol. Lett. 321, 141–149. (2011).

Manente, M., Ghislain, M. The lipid-translocating exporter family and membrane phospholipid homeostasis in yeast. *FEMS Yeast Res.* **9(5),** 673–687. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00513.x. (2009).

Mansfield BE, Oltean HN, Oliver BG, Hoot SJ, Leyde SE, Hedstrom L, White TC. 2010. Azole drugs are imported by facilitated diffusion in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. PLoS Pathog 6:e1001126. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001126.

Merheb-Dini, C., Cabral, H., Leite, R. S. R., Zanphorlin, L. M., Okamoto, D. N., Bonilla Rodriguez, G. O., et al. (2009). Biochemical and functional characterization of ametalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. J. Agric. Food Chem. 57, 9210–9217. doi: 10.1021/jf9017977

Mordor Intelligence., Industrial enzymes market - growth, trends, and forecast (2019 - 2024)., 2018. Acessado em 13/06/2019 em https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/industrial-enzymes-market

NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard. NCCLS document M38-A [ISBN 1- 56238-470-8]. 19087-1898 USA. (2002).

Pastor FJ, Guarro J. Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. *Clin Microbiol Infect*. **12**, 948-60 (2006).

Pedezzi, R., β-frutofuranosidases em coleópteros: caracterização funcional e produção heteróloga de uma β-frutofuranosidase de *Sphenophorus levis*. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos. Orientador: Flavio Henrique Silva (2015)

Petersen T. N., Søren Brunak, Gunnar von Heijne & Henrik Nielsen. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nature Methods, 8:785-786, 2011

Pradhan, A., *et al*. Elevated catalase expression in a fungal pathogen is a double-edged sword of iron. *PLoS pathogens*, **13(5)**, e1006405. doi:10.1371/journal.ppat.1006405. (2017).

Prasad, P., Varshney, D. & Adholeya, A. Whole genome annotation and comparative genomic analyses of bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum*. *BMC Genomics*. **16**, 1004. doi:10.1186/s12864-015-2229-2 (2015).

Prasad, R., Rawal, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Frontiers in Pharmacology*, **5**, 202. doi:10.3389/fphar.2014.00202. (2014).

Raghavan, R., Chithra, G., Fernandez, S., Shamana Suryanarayana, B., & Singh, R. An unusual case of hyalohyphomycosis due to *Purpureocillium lilacinum* in a patient with myasthenia gravis. *Current Medical Mycology*. **4(2)**, 36-39 (2018).

Sanadhya, P., Bucki, P., Liarzi, O., Ezra, D., Gamliel, A., & Braun Miyara, S. *Caenorhabditis elegans* susceptibility to Daldinia cf. concentrica bioactive volatiles is coupled with expression activation of the stress-response transcription factor daf-16, a part of distinct nematicidal action. PloS one, 13(5), e0196870. doi:10.1371/journal.pone.0196870. (2018).

Sanglard, D., Ischer, F., Calabrese, D., de Micheli, M., Bille, J. Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. *Drug Resist. Updat*. **1**, 255–265. (1998).

Sarath, G., De La Motte, R. S., Wagner, F. W., Peptidase assay methods. In: Beynon, R.J., BOND, J.S. Proteolytic enzymes a practical approach. Oxford University, New York, cap. 3, p. 25-55. 1996.

Scorzoni, L., *et al*. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 36. doi:10.3389/fmicb.2017.00036. (2017).

Sharma S., Vaid S., Bhat B., Singh S., Bajaj B. K., Chapter 17 - Thermostable Enzymes for Industrial Biotechnology., Editor(s): Ram Sarup Singh, Reeta Rani Singhania, Ashok Pandey, Christian Larroche., In Biomass, Biofuels, Biochemicals.,Advances in Enzyme Technology, Elsevier., 2019, Pages 469-495., ISBN 9780444641144., acessado em 11/06/2019. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00017-0. (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444641144000170)

Shivaprasad, A., Ravi, G. C., Shivapriya, & Rama. A Rare case of nasal septal perforation due to *Purpureocillium lilacinum*: case report and review. Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery : official publication of the Association of Otolaryngologists of India. 65(2), 184-8 (2012).

Srinivasan, A., Lopez-Ribot, J. L., & Ramasubramanian, A. K. Overcoming antifungal resistance. *Drug discovery today. Technologies*, **11**, 65-71. (2014).

Statista., Biotechnology industry - Statistics & Facts., 2018. Acessado em 13/06/2019 em https://www.statista.com/topics/1634/biotechnology-industry/

Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Levery SB, Clausen H. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. EMBO J, 32(10):1478-88, May 15, 2013. (doi: 10.1038/emboj.2013.79. Epub 2013).

Stirling GR, West LM. "Fungal parasites of root-knot nematode eggs from tropical and sub-tropical regions of Australia". Australasian Plant Pathology. 20 (4): 149–54. doi:10.1071/APP9910149. (1991).

Sun, M., and Liu, X. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. Mycopathologia 161, 295–305. doi: 10.1007/s11046-006-0249-9. (2006).

Svergun, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. Journal of Applied Crystallography, v. 25, n. 4, p. 495-503, 1992.

Tangrea M. A., Bryan P. N., Sari N., Orban J., Solution Structure of the Pro-hormone Convertase 1 Pro-domain from *Mus musculus*., Journal of Molecular Biology., Volume 320, Issue 4, Pages 801-812, ISSN 0022-2836, https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00543-0. (2002)

Thys, R. C. S., and Brandelli, A. (2006). Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium sp*. J. Appl. Microbiol. 101, 1259–1268. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03050.x

Trinh, S. A., & Angarone, M. P. *Purpureocillium lilacinum* tattoo-related skin infection in a kidney transplant recipient. *Transplant Infectious Disease: an Official Journal of the Transplantation Society*, **19(3)**. 10.1111/tid.12689 (2017).

Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. 2012 Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. Int J Microbiol 2012:713687. http: //dx.doi.org/10.1155/2012/713687.

Visser H., Joosten V., Punt P. J., Gusakov A. V., Olson P. T., Joosten R., Bartels J., Visser J., Sinitsyn A. P., Emalfarb M. A., Verdoes J. C., Wery J., Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a *Myceliophthora thermophila* isolate, previously known as *Chrysosporium lucknowense* C1., Industrial Biotechnology. Jun 2011.acessado em 12/06/2019 em http://doi.org/10.1089/ind.2011.7.214

VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. Journal of Applied Crystallography, v. 36, n. 3, p. 860-864, 2003.

Walsh, TJ, Groll, A, Hiemenz, J, Fleming, R, Roilides, E, and Anaissie, E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin Microbiol Infect. 2004; 10: 48–66

Wang, G., *et al.* Biosynthesis of antibiotic leucinostatins in bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum* and their inhibition on phytophthora revealed by genome mining. *PLoS Pathogens*, **12(7)**, e1005685. doi:10.1371/journal.ppat.1005685 (2016).

Wang, J., Wang, J., Liu, F., and Pan, C. Enhancing the virulence of *Paecilomyces lilacinus* against Meloidogyne incognita eggs by overexpression of a serine protease. Biotechnol. Lett. 32, 1159–1166. doi: 10.1007/s10529-010-0278-9. (2010).

Xie, J., *et al*. Genome and transcriptome sequences reveal the specific parasitism of the nematophagous *Purpureocillium lilacinum* 36-1. *Frontiers in microbiology*. **7**, 1084. doi:10.3389/fmicb.2016.01084 (2016).

Yakimov, A. P., Afanaseva, A. S., Khodorkovskiy, M. A., & Petukhov, M. G. (2016). Design of Stable α-Helical Peptides and Thermostable Proteins in Biotechnology and Biomedicine. Acta naturae, 8(4), 70–81.

Yang L., Peng M., Shah S. S., Wang Q., Transcriptome Sequencing and Comparative Analysis of *Piptoporus betulinus* in Response to Birch Sawdust Induction. Forests 2017, 8, 374; doi:10.3390/f8100374.

Yue, Y., *et al*. Exploring the antibacterial and antifungal potential of jellyfish-associated marine fungi by cultivation-dependent approaches. *PloS One*, **10(12)**, e0144394. doi:10.1371/journal.pone.0144394 (2015).

Zibaee A., Ramzi S., Cuticle-degrading proteases of entomopathogenic fungi: from biochemistry to biological performance., Archives of Phytopathology and Plant Protection., 51 13-14 779-794 Doi: https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1519875 (2018)