

Inter-relação entre sítios de regulação gênica e proteoma no patógeno humano *Paracoccidioides lutzii* sob hipóxia

Raphaela B. Naves ¹(IC); Lucas Nojosa Oliveira ^{2,3}(PG) ; Célia Maria de Almeida Soares ²(PQ); Patrícia de Sousa Lima ¹(PQ)*

¹Universidade Estadual de Goiás, Laboratório Interdisciplinar de Biologia, Itapuranga -GO.

²Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Laboratório de Biologia Molecular, Goiânia – GO.

³ Universidade de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Brasília-DF.

E-mail: patricia.lima@ueg.br

O fungo *Paracoccidioides lutzii* causa a paracoccidioidomicose, micose sistêmica da América do Sul. Patógenos fúngicos enfrentam hipóxia (baixos níveis de oxigênio quando comparado ao atmosférico) nos tecidos do hospedeiro durante patogênese. Mecanismos de adaptação à hipóxia são variáveis entre fungos sendo o fator de transcrição SrbA, o principal regulador descrito. Previamente em *P. lutzii*, dados proteômicos revelaram respostas à hipóxia pela expressão diferencial de proteínas envolvidas em várias vias metabólicas. O fungo também apresentou a proteína SrbA como funcional. Porém, não foi comprovada a relação dos dados proteômicos com a regulação direta por SrbA, como já publicado para outros patógenos. O objetivo deste trabalho é, a partir de análises *in silico*, selecionar quais proteínas reguladas por hipóxia em *P. lutzii* são reguladas diretamente pela SrbA. Artigos científicos e ferramentas de bioinformática foram utilizadas nas buscas das proteínas homólogas e na determinação da presença ou não da sequência de nucleotídeos específica para ligação da SrbA na região promotora dos respectivos genes de *P. lutzii*. Resultados parciais indicam que há proteínas de *P. lutzii* reguladas diretamente pela SrbA. A SrbA é importante no contexto infeccioso de doenças fúngicas por isso o estudo pode auxiliar no entendimento da adaptação do fungo à hipóxia.

Palavras-chave: SrbA. Sequências promotoras. Paracoccidioidomicose. Hipóxia.

Introdução

O fungo patogênico *Paracoccidioides lutzii* causa a paracoccidioidomicose, micose sistêmica da América do Sul (TEIXEIRA *et al.* 2013; SAN-BLAS *et al.* 2002; RESTREPO *et al.* 2001). Patógenos fúngicos enfrentam baixos níveis de oxigênio quando comparado ao nível atmosférico nos tecidos do hospedeiro, denominado hipóxia. Essa condição de estresse se torna relevante pois é considerada fator chave na virulência de fungos tais como *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, importantes patógenos humanos (CHUN *et al.* 2007; WILLGER *et al.* 2008).

Os mecanismos de adaptação à hipóxia são variáveis entre fungos patogênicos humanos (BARKER *et al.* 2012; SHIMIZU *et al.* 2009; SYNNOTT *et al.* 2010) e merecem ser caracterizados. Apesar de respostas variáveis, um aspecto comum das respostas fúngicas à hipóxia se baseia no sensoramento de oxigênio pela proteína



da família SREBP (proteína de ligação ao elemento responsivo esterol), nomeada SrbA. Esse é o principal fator que regula as respostas à hipóxia nos fungos porém eles podem apresentar outros. Dados proteômicos revelaram que *P. lutzii* responde a hipóxia, regulando a expressão diferencial de proteínas envolvidas em várias vias metabólicas e o fungo apresentou a proteína SrbA como funcional (LIMA *et al.* 2015). Porém, a ligação direta entre tais proteínas reguladas e o fator SrbA não pode ser feita por enquanto. Análises *in silico* e, em futuro próximo, funcionais, poderão corroborar quais dessas proteínas são diretamente reguladas pela SrbA de *P. lutzii*.

Há cada vez mais necessidade de estudos da biologia de *P. lutzii*, pois a elucidação de potenciais fatores de virulência pode resultar em futuras estratégias coadjuvantes no tratamento da paracoccidioidomicose (PCM) resultando em formas mais efetivas, com menor tempo e reação do hospedeiro. A caracterização mais detalhada das moléculas reguladas por essa proteína tem grande relevância no contexto da patogenia do fungo.

Material e Métodos

1. Levantamento bibliográfico: foi realizada a busca por artigos científicos que contemplam estudos sobre fungos patogênicos humanos onde a condição de hipóxia em que envolvia o principal regulador da condição, a proteína SrbA. Para tal, a plataforma de busca por periódicos na área biomédica Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), foi utilizada. **2. Proteínas reguladas por hipóxia em *P. lutzii*:** a partir dos dados previamente publicados em *P. lutzii* (LIMA *et al.*, 2015), pode-se selecionar as proteínas reguladas por hipóxia nesse fungo. **3. Proteínas homólogas em *P. lutzii*:** foi realizada a busca por homólogos das proteínas do proteoma (item 2) no banco de dados selecionado (item 1). **4. Análises *in silico* de busca por sítios de ligação ao fator de transcrição SrbA:** A região promotora dos genes selecionados (1000 pares de base *upstream* à região iniciadora do gene) foram considerados para análises *in silico* para a busca de regiões consenso de ligação ao fator de transcrição SrbA. O banco de dados genômico do gênero de *Paracoccidioides* foi utilizado (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências

(A/G)TCA(T/C/G)(C/G)CCAC(T/C);



(A/G)(C/T)C(A/G/T)NN(C/T)(C/T/G)A(C/T) e ATC(G/A)(T/G)(A/G)(C/T)(G/C)AT, descritas previamente (CHUNG et al., 2014, TODD et al., 2006, LINDE et al., 2012, respectivamente), foram utilizadas nas buscas. A ferramenta de bioinformática utilizada para análise de tais sequências consenso de ligação em regiões promotoras foi o *Sequence Manipulation Suite* (disponível em <http://www.bioinformatics.org/sms2/>).

Resultados e Discussão

O total de genes regulados pelo principal regulador da condição de hipóxia, o fator de transcrição **SrbA**, foram procurados em outros organismos. A partir desse critério de seleção, o fungo *Aspergillus fumigatus* foi o único fungo patogênico humano onde estudos revelaram genes **diretamente** regulados pela proteína SrbA (Figura 1). Técnicas tais como RNAseq, *Microarray* (microarranjo) e CHIPseq além de linhagens selvagem e mutante para o gene SrbA de *A. fumigatus* foram utilizados em tais estudos (CHUNG et al., 2014 e BLATZER et al., 2011).

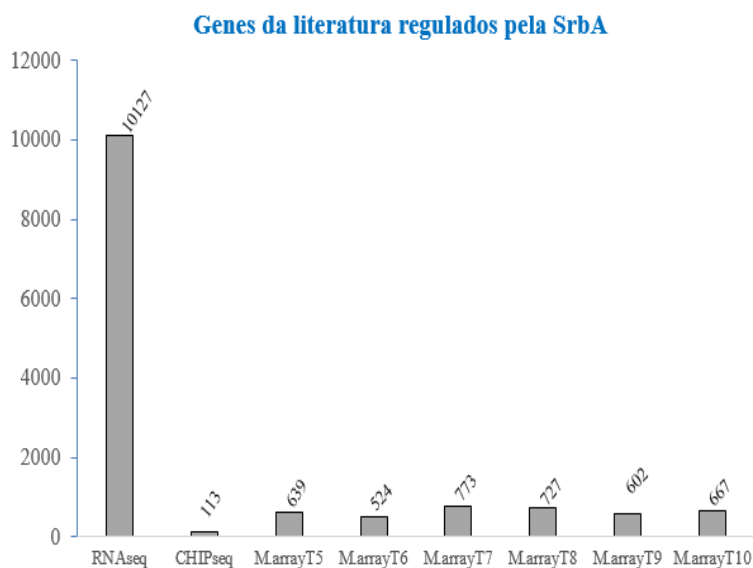


Figure 1: Genes regulados diretamente pelo fator de transcrição SrbA do fungo *Aspergillus fumigatus*. **Eixo x:** condição testada RNAseq (30 e 120 min após hipóxia); CHIPseq (genes confirmados utilizando anticorpo contra SrbA e sequenciamento gênico); M.array T5 (genes com expressão reduzida após 1h de hipóxia revelados por microarranjo); T6 (genes induzidos após 1h de hipóxia); T7 (genes com expressão reduzida após 2h de hipóxia); T8 (genes induzidos após 2h de hipóxia); T9 (genes com expressão reduzida após 4h de hipóxia); T10 (genes induzidos após 4h de hipóxia) e **Eixo y:** total de genes. (CHUNG et al., 2014; BLATZER et al., 2011).

Paralelamente, as proteínas de *P. lutzii* que foram reguladas por hipóxia (Lima et al., 2015) mas que ainda são incertas quanto as regulações diretas pela SrbA, foram selecionadas. Das 233 proteínas, apenas 88 apresentaram ao menos uma proteína homóloga àquelas selecionadas pela Figura 1. As 88 proteínas foram submetidas a

análises nas regiões promotoras de seus respectivos genes a fim de caracterização da presença de elementos de ligação à proteína SrbA (Figura 2). Um total de 3 sequências consenso foram utilizadas (como descrito em “Material e Métodos”). Com a sequência 1, todos os genes demonstraram conter sítios de ligação à SrbA; com a sequência 2, apenas 2 genes; com a sequência 3, apenas 10 genes. Assim, um total de 12 genes demonstraram conter sítios de ligação à SrbA em seus promotores, detectados por pelo menos 2 sequências consenso (Figura 2 B).

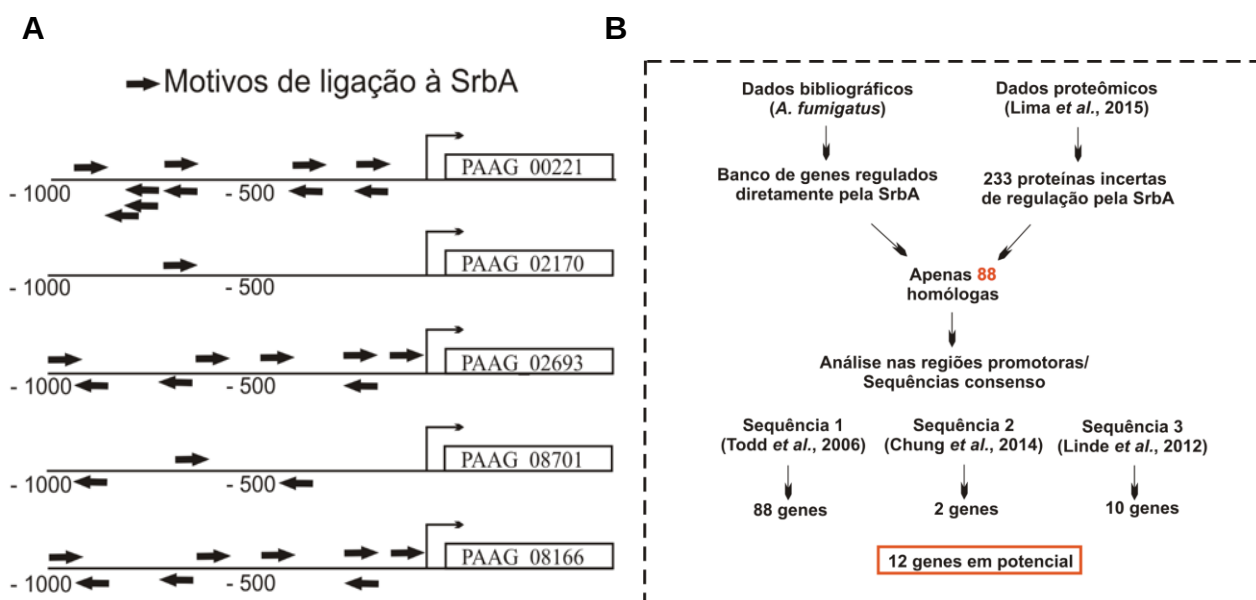


Figure 2: Busca por elementos de ligação ao fator de transcrição SrbA no promotor dos genes de *P. lutzii*.

(A) A fim de demonstração, os motivos de ligação à proteína SrbA são demonstrados em 5 genes dos 88 que apresentaram sequências nucleotídicas que indicam locais de ligação da SrbA em suas regiões promotoras (setas). A busca foi feita utilizando 3 padrões de sequências descritas como locais de ligação da SrbA, em outros organismos, tais como (A/G)TCA(T/C/G)(C/G)CCAC(T/C), (A/G)(C/T)C(A/G/T)NN(C/T)(C/T/G)A(C/T) e ATC(G/A)(T/G)(A/G)(C/T)(G/C)AT, previamente descritos em Chung et al., 2014, Todd et al., 2006 e Linde et al., 2012, respectivamente. Para os 5 genes exemplificados aqui, os motivos foram encontrados apenas para a sequência descrita por Todd et al., 2006. Os números de acesso e nomenclatura são: PAAG_00221: acetolactate synthase; PAAG_02170: adenylosuccinate synthetase; PAAG_02693: saccharopine dehydrogenase; PAAG_08701: D-3-phosphoglycerate dehydrogenase e PAAG_08166: 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. (B) Representação dos resultados obtidos até o momento. Um total de 12 genes distintos são alvo em potencial para futuras análises pois sequências consenso de ligação à SrbA foram encontradas em pelo menos 2 das 3 sequências testadas.

Considerações Finais

Os resultados indicam que *P. lutzii* apresenta proteínas que podem ser reguladas diretamente pela proteína SrbA, indicando que, de fato, podem ser



relevantes na adaptação do fungo durante o estresse hipóxico durante infecção. As 12 proteínas nas quais seus genes apresentaram domínios de ligação à SrbA por mais de uma sequência consenso testada serão alvo de mais análises confirmatórias.

Referências

BARKER, B. M., et al. Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* hypoxia response using an oxygen-controlled fermenter. **BMC Gen** 13: 62, 2012.

BLATZER, M. et al. SREBP coordinates iron and ergosterol homeostasis to mediate triazole drug and hypoxia responses in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **PLoS genetics**, 7(12):e1002374, 2011.

CHUN, C. D., et al. A link between virulence and homeostatic responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathog** 3(2): e22, 2007.

CHUNG D, BARKER BM, CAREY CC, MERRIMAN B, WERNER ER, LECHNER BE, et al. ChIP-seq and in vivo transcriptome analyses of the *Aspergillus fumigatus* SREBP SrbA reveals a new regulator of the fungal hypoxia response and virulence. **PLoS pathogens**, 2014.

LIMA, P. S., et al. Characterization of the *Paracoccidioides* Hypoxia Response Reveals New Insights into Pathogenesis Mechanisms of This Important Human Pathogenic Fungus. **PLOS NTD**, 2015.

LINDE, J. et al. Regulatory interactions for iron homeostasis in *Aspergillus fumigatus* inferred by a Systems Biology approach. **BMC Systems Biology** 6: 6, 2012.

RESTREPO, A. et al. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology** 39: 233e241, 2001.

SAN-BLAS, G. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology** 40: 225e242, 2002.

SHIMIZU, M., et al. Proteomic analysis of *Aspergillus nidulans* cultured under hypoxic conditions. **Proteomics** 9(1): 7-19, 2009.

SYNNOTT, J. M., et al. Regulation of the hypoxic response in *Candida albicans*. **E Cell** 9(11): 1734-1746, 2010.

TEIXEIRA, M.M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology** 52: 19e28, 2013.

TODD, B. L., et al. Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast. **MCBiol** 26(7): 2817-2831, 2006.

WILLGER, S. D., et al. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathog** 4(11): e1000200, 2008.