

MARINA LAGES DE ANDRADE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL  
DA TOXINA *KILLER* PRODUZIDA PELA LEVEDURA  
*Kodamaea ohmeri* ES92

UFMG

2011

MARINA LAGES DE ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA TOXINA KILLER  
PRODUZIDA PELA LEVEDURA *Kodamaea ohmeri* ES92

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito  
a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Patrícia Silva Cisalpino

Co-orientador: Carlos Augusto Rosa

Belo Horizonte

2011

Andrade, Marina Lages de.  
Caracterização e purificação da toxina *killer* produzida pela levedura *Kodamaea ohmeri* ES92. [manuscrito] / Marina Lages de Andrade. – 2011.

92 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Patrícia Silva Cisalpino. Co-orientador: Carlos Augusto Rosa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. *Candida albicans* - Teses. 2. Leveduras (Fungos) - Teses. 3. Microbiologia – Teses. 4. Micologia – Teses. 5. Fungicidas – Teses. 6. *Kodamaea ohmeri*. I. Cisalpino, Patrícia Silva. II. Rosa, Carlos Augusto. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 582.28

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus orientadores; Profa. Patrícia Silva Cisalpino e Prof. Carlos Augusto Rosa pela oportunidade, apoio e orientação.

Ao Agenor Valadares Santos por todos os ensinamentos, paciência, amizade, apoio e orientação, sem os quais seria impossível concluir esta dissertação.

A todo o pessoal do laboratório de Biologia de Microrganismos professores e alunos, em especial Carol, Rosana, Ludmila, Patrícia, Silvinha e Marco, amigos muito queridos que tornaram meus dias muito mais felizes, divertidos e fáceis. Sem vocês teria sido infinitamente mais difícil!

A Gil pelos cuidados, carinho e ótima convivência.

À equipe do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras pela ajuda, compreensão, amizade e carinho.

Ao pessoal do departamento de bioquímica; Jamil, professores Marcelo Santoro, Adriano Pimenta e toda a equipe de seus laboratórios pela excelente convivência, por todo apoio, incentivo, confiança e receptividade.

À professora Viviane Gouveia por não medir esforços para ajudar.

À minha querida família pelo amor incondicional e paciência infinita.

Aos meus queridíssimos amigos da biologia e da vida pelo apoio, carinho, amor e pelos muitos momentos felizes repletos de risadas e alegrias.

**MUITO OBRIGADA**

## RESUMO

As toxinas *killer* ou micocinas, produzidas por leveduras, são moléculas extracelulares que exercem efeito deletério em células susceptíveis da mesma espécie, ou de espécies distintas, sem que ocorra o contato entre as células. A levedura *Kodamaea ohmeri*, alvo deste estudo, foi isolada do cactus *Opuntia sp.* e foi preliminarmente caracterizada como produtora de toxina *killer*. Sua micocina tem efeito deletério em espécies do gênero *Candida*, relevantes agentes oportunistas, cuja importância médica vem crescendo com o aumento de pacientes imunossuprimidos ou com outras condições predisponentes. Torna-se necessária a busca por novas drogas antifúngicas já que estes microrganismos estão relacionados com altas taxas de morbidade e mortalidade, além de algumas linhagens serem pouco suscetíveis às drogas antifúngicas tradicionais. Surge então, a importância de estudar a micocina de *K. ohmeri* que ainda não foi caracterizada. Neste estudo objetivou-se determinar o espectro de ação da micocina bem como obter sua caracterização, purificação e identificação. Para determinar o espectro de ação da toxina foram utilizadas linhagens pertencentes a diferentes espécies do gênero *Candida*, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kodamaea ohmeri* e diferentes espécies de dermatófitos. Ao longo dos experimentos surgiu a necessidade de confirmar a identidade de algumas das amostras de *Candida* utilizadas, previamente identificadas pelo kit de fermentação API20AUX (Biomérieux), empregando-se para tal o crescimento em CHROMagar e o seqüenciamento de DNA ribossomal. A identificação de *Candida* por CHROMagar foi mais precisa que aquela feita pelo kit de fermentação API20AUX, considerando-se sua destinação precípua para as espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilopsis*, tendo sido muito coerente com as identificações obtidas com base no seqüenciamento. A caracterização da micocina baseou-se na avaliação da sua resistência à variações de temperatura, pH, presença de diferentes íons, definição de sua natureza, determinação de sua massa e investigação de seu determinante genético. Na tentativa de purificar e identificar a toxina, foram utilizadas as técnicas de cromatografia líquida (HPLC), eletroforese (SDS-PAGE) e espectrometria de massa (MS). As linhagens de *C. albicans* (86,2%) e *C. glabrata* (60%) foram as mais sensíveis à micocina, seguidas pelas amostras de *S. cerevisiae* (50%) e por outras linhagens de *K. ohmeri* (50%); os dermatófitos testados foram resistentes. Os resultados indicam que a sensibilidade das amostras de *C. albicans* à micocina pode ter importância taxonômica, uma vez que foram substancialmente mais sensíveis que as demais espécies. Os resultados obtidos indicam que a micocina de *K. ohmeri* seja uma glicoproteína que possui massa acima de 30 kDa, sensível a temperaturas maiores ou iguais a 37°C, mais ativa entre pH 3,5 a 4,5; possui atividade antifúngica aumentada na presença de íons de cálcio e é possivelmente codificada por um gene plasmidial. Os testes realizados não indicaram que a micocina provoque morte celular por formação de poro na membrana celular.

**Palavras-chave:** *Candida albicans*, *Kodamaea ohmeri*, Levedura, Toxina *killer*

## **ABSTRACT**

Killer toxins or mycocins are extracellular molecules produced by yeasts that have a deleterious effect on organisms taxonomically related or not to its producers, without cell to cell contact. The yeast *Kodamaea ohmeri*, target of this study, was isolated from the cactus *Opuntia sp.* and was previously characterized as a killer yeast. Its killer toxin has a deleterious effect on *Candida* species, relevant opportunistic agents, whose medical importance is growing with the increasing number of immunocompromised patients or presenting other predisposing conditions. The search for new antifungal drugs becomes necessary, since these microorganisms are associated with high morbidity and mortality and some strains are less susceptible to traditional antifungal drugs. This motivates the study of the killer toxin of *K. ohmeri*, which has not yet been characterized. The aims of this study were to determine the spectrum of action of the killer toxin as well as to characterize, purify and identify it. In order to determine its spectrum of action strains belonging to different *Candida* species, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kodamaea ohmeri* and different species of dermatophytes were used. Along the experiments it became necessary to confirm the identity of some of the isolates used, previously identified by *Candida* fermentation API20AUX kit (Biomérieux). The confirmation was performed by growth on CHROMagar and ribosomal DNA sequencing. The identification of *Candida* by CRHOMagar was more accurate than that made by the APIAUX20, even considering its preferential application to *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis*, since it was highly similar to that provided by sequencing. The characterization of the killer toxin was based on an evaluation of its resistance to temperature, pH, presence of different ions, definition of its nature, determination of its mass and investigation of its genetic determinant. For toxin purification and identification, liquid chromatography (HPLC), electrophoresis (SDS-PAGE) and mass spectrometry (MS) were used. The strains of *C. albicans* (86.2%) and *C. glabrata* (60%) were more sensitive to killer toxin followed by samples of *S. cerevisiae* (50%) and other strains of *K. ohmeri* (50%). The dermatophytes tested were resistant. The results indicate that the sensitivity of these samples to the killer toxin may be of taxonomic significance, since the species *C. albicans* is significantly more sensitive than other species. The results indicate that the killer toxin of *K. ohmeri* might be a glycoprotein having mass above 30kDa, sensitive to temperatures greater than or equal to 37°C, more active between pH 3.5 and 4.5, with antifungal activity increased in the presence of calcium ions and possibly encoded by a plasmidial gene. The tests performed until now did not indicate that cell death caused by the killer toxin would be by forming pores in cell membranes.

**Key-words:** *Candida albicans*, *Kodamaea ohmeri*, Levedura, Toxina killer