

## Isocitrato liase de *Paracoccidioides brasiliensis*.

**CRUZ**, Aline Helena da Silva<sup>1</sup>; **SOARES**, Célia Maria de Almeida<sup>2</sup>; **PEREIRA**, Maristela<sup>3</sup>

Palavras-chave: Isocitrato liase, metilisocitrato liase, *Paracoccidioides brasiliensis*.

### 1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

A Paracoccidioidomicose (PCM), causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, é uma das micoses humanas sistêmicas mais prevalentes da América Latina, com áreas endêmicas se estendendo da América Central à Argentina. O *P. brasiliensis* é um fungo termodimórfico, capaz de se desenvolver sob a forma miceliana a 22°C, in vitro e no meio ambiente, e sob a forma leveduriforme a 37°C, in vivo e in vitro. Após a inalação dos micélios, (M) estes se convertem em leveduras (L), sendo fagocitados por macrófagos, onde se multiplicam. No interior dos macrófagos há uma limitação de glicose. (Selitrennikoff, 2003). Na busca de novas fontes de carbono, fungos e muitos outros microorganismos procariotos e eucariotos utilizam etanol, acetato e ácidos graxos como a única fonte de carbono. O ciclo do gioxalato, que é ausente em mamíferos, é requerido para a utilização destas fontes de carbono (NAKATA, 2002). As principais enzimas do ciclo do gioxalato são: isocitrato liase e malato sintase. A enzima isocitrato liase catalisa a reação reversível de clivagem do isocitrato em gioxalato e succinato. A molécula de gioxalato condensa com uma de Acetyl-CoA formando L-malato pela ação da enzima malato sintase (Selitrennikoff, 2003). A molécula de malato formada originará oxaloacetato que pode ser utilizado como precursor da glicose na gliconeogênese. Uma reação análoga à conversão de isocitrato em gioxalato e succinato ocorre no metabolismo de propionil-coenzima A (Co A) através do ciclo do 2-metilcitrato. Este ciclo é iniciado pela síntese de 2-metilcitrato a partir de oxaloacetato e propionil - CoA. 2-metilcitrato é então convertido em 2-metilisocitrato que é clivado em piruvato e succinato pela 2-metilisocitrato liase (Luttik, 2000). Ao contrário do ciclo do gioxalato que ocorre nos glioissomos, o ciclo do 2-metilcitrato (ciclo do ácido 2-metilcítico) ocorre na mitocôndria. Resultados de atividade com o gene ICL1 (isocitrato liase) e o gene ICL2 de *S. cerevisiae* com linhagens crescidas em meio etanol-aspartato demonstram que ICL2 codifica uma específica metilisocitrato liase e ICL1 uma enzima que utiliza isocitrato e 2-metilcitrato como substratos (Luttik, 2000). As limitações terapêuticas das duas classes de drogas antifúngicas correntes e o aumento da incidência de infecções fúngicas ameaçadoras, associado com imunodepressão bem como o surgimento de isolados clínicos resistentes a drogas tem se tornado preocupante. A aplicação da genômica de fungos oferece oportunidade para desenvolvimento de novos antifúngicos. Estima-se que 80% do genoma de *P. brasiliensis*, fungo dimórfico termo-regulado, foi analisado e novos genes correspondentes a proteínas que devem atuar como fatores de virulência e potentes alvos para drogas foram identificados. Dentre estes, está o gene da isocitrato liase que é supra-regulado em levedura (Felipe, 2005). Nossa grupo tem trabalhado visando a busca de moléculas de *P. brasiliensis* ausentes em humanos como alvos para novas drogas. Nesse sentido, as seqüências de isocitrato liase (ICL) e metilisocitrato liase (me-ICL) foram obtidas do transcriptoma de *P.*

*brasiliensis* com objetivo de realizarmos a clonagem, caracterização, expressão heteróloga e avaliar a atividade destas enzimas.

## **2. METODOLOGIA**

**2.1–Organismo:** Foi utilizado o isolado já caracterizado, *Pb* 01 (ATCC, MYA,828) de *P. brasiliensis*, padrão de nosso laboratório.

**2.2-Construção de oligonucleotídeos:** A partir das seqüências de ICL e me-ICL obtidas do transcriptoma de *P. brasiliensis* ([www.biomol.unb.br](http://www.biomol.unb.br)) desenharemos os oligonucleotídeos para amplificação do cDNA via PCR.

**2.3-Expressão Heteróloga:** A clonagem dos cDNAs será realizada no vetor de expressão pET32a (Novagen), a linhagem *E.coli* DH5 $\alpha$  será a receptora dos plasmídios recombinantes. Os clones selecionados serão sequenciados e utilizados para transformar *E. coli* ORIGAMI (DE3), a qual possibilitará a super expressão dos genes. Os clones recombinantes serão selecionados por análise do perfil de expressão de proteínas de fusão.

**2.4- Atividade enzimática:** As atividades enzimáticas, de ICL e me-ICL no extrato total protéico e das recombinantes, serão avaliadas pelo método de Dixon & Kornberg (1959). Os substratos utilizados serão: 2-metilisocitrato e DL-isocitrato para me-ICL e ICL, respectivamente.

### **3. RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO**

### 3.1 Obtêncão da seqüênciâa.

As seqüências parciais de nucleotídeos de ICL e me-ICL foram obtidas a partir do sequenciamento de clones. As proteínas preditas foram obtidas através do programa Gene Runner, versão 3.05.

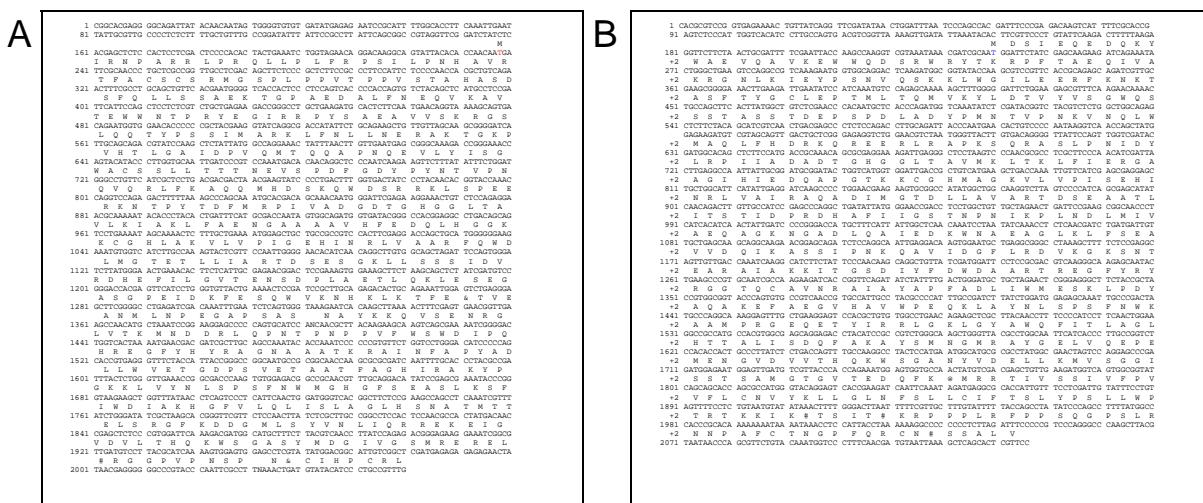


Figura01: Seqüências de nucleotídeos e proteínas preditas de me-ICL (A) e ICL (B). Sendo M (metionina) o códon inicial.

3.2 – Alinhamento das seqüências de proteínas preditas de me-ICL e ICL.  
As seqüências foram alinhadas com outros organismos.

<p><b>A</b></p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>ICLPb</td><td>MDSIEQEDQKYWAEVQAVKENWQDSRWRYTAKRPTAQIIVAKRGNLKIEYPSNVQSKKLW 60</td></tr> <tr> <td>ICLAn</td><td>MSYILEDQR*NDVEAAVKSNSKUDSRMRYTAKRPTAQIIVAKRGNLKIEYPSNVQAKKLW 60</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>ICLPb</td><td>GILLEERFKNTAATFTYGCCLPFTMLTQMVKYLDTVTVSGWSQSSTASSTDEPSFDLADYPM 120</td></tr> <tr> <td>ICLAn</td><td>GILLENFKNEEASTFTYGCCLPFTMTCMAKYLDTVTVSGWSQSSTASSTDEPSFDLADYPM 120</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>ICLPb</td><td>NTVPKNVNLQMAQLPHDRQKBEERLAPRKSPQRASLNIDYLRLPIIADADTGHQGLTAVM 180</td></tr> <tr> <td>ICLAn</td><td>NTVPKNVNLQMAQLPHDRQKBEERLAPRKSPQRASLNIDYLRLPIIADADTGHQGLTAVM 180</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>ICLPb</td><td>KLTKLFIERGAAGCHHIEDQAPOTKKGHMGAKVILVPISEHINRLVIAIRAGADIMGTDLLA 240</td></tr> <tr> <td>ICLAn</td><td>KLTKLFIERGAAGCHHIEDQAPOTKKGHMGAKVILVPISEHINRLVIAIRAGADIMGTDLLA 240</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>ICLPb</td><td>VAROTSSEAATLITSTIDPRDHAFLIGSTENKIPKLNDLMIVAEQAGKNGADLQAIEDKNN 300</td></tr> <tr> <td>ICLAn</td><td>IARTOSSEAATLITSTIDPRDHAFLIGSTENKIPKLNDLMIVAEQAGKNGADLQAIEDKNN 300</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>ICLPb</td><td>ABAGLKLFCSEAVVUQOIKASSIENQVACIDPFLDPUKRSNTBAAJAKETDSDLYPDMD 360</td></tr> <tr> <td>ICLAn</td><td>ANAGLKLFPDAAVVDALINNSPLNPKAAIEKYLQDQGKCKGNLBARAJAHEIAGTDLYPDMD 360</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>ICLPb</td><td>AARTTREGFVRYRGTGQCQAVNRAYAAPFDALIMMSEKSLPDDYQAQKFAEWHAVWPFEQKL 420</td></tr> <tr> <td>ICLAn</td><td>AAPTTRREGFVRYRGTGQCQAVNRAYAAPFDALIMMSEKSLPDDYQAQKFAEWHAVWPFEQKL 420</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>ICLPb</td><td>AVNLSPSFNWWAMPRGDEQTTYIRLKGKLGTYAQOFITLAGLHTTALISQDPKAAYSHNMG 480</td></tr> <tr> <td>ICLAn</td><td>AVNLSPSFNWWAMPRGDEQTTYIRLKGKLGTYAQOFITLAGLHTTALISQDPKAAYSHNMG 480</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>ICLPb</td><td>RAYGELVQEPEMENGVDVVTHQKWSGANVYDELLKMVSGG1SSTSAMGTQVTEDQFK- 537</td></tr> <tr> <td>ICLAn</td><td>RAYGELVQEPEMANGVDVVTHQKWSGANVYDNLLM1TGGVSTAAAMGKVTEFDK5 538</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> </tbody> </table>	ICLPb	MDSIEQEDQKYWAEVQAVKENWQDSRWRYTAKRPTAQIIVAKRGNLKIEYPSNVQSKKLW 60	ICLAn	MSYILEDQR*NDVEAAVKSNSKUDSRMRYTAKRPTAQIIVAKRGNLKIEYPSNVQAKKLW 60	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		ICLPb	GILLEERFKNTAATFTYGCCLPFTMLTQMVKYLDTVTVSGWSQSSTASSTDEPSFDLADYPM 120	ICLAn	GILLENFKNEEASTFTYGCCLPFTMTCMAKYLDTVTVSGWSQSSTASSTDEPSFDLADYPM 120	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		ICLPb	NTVPKNVNLQMAQLPHDRQKBEERLAPRKSPQRASLNIDYLRLPIIADADTGHQGLTAVM 180	ICLAn	NTVPKNVNLQMAQLPHDRQKBEERLAPRKSPQRASLNIDYLRLPIIADADTGHQGLTAVM 180	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		ICLPb	KLTKLFIERGAAGCHHIEDQAPOTKKGHMGAKVILVPISEHINRLVIAIRAGADIMGTDLLA 240	ICLAn	KLTKLFIERGAAGCHHIEDQAPOTKKGHMGAKVILVPISEHINRLVIAIRAGADIMGTDLLA 240	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		ICLPb	VAROTSSEAATLITSTIDPRDHAFLIGSTENKIPKLNDLMIVAEQAGKNGADLQAIEDKNN 300	ICLAn	IARTOSSEAATLITSTIDPRDHAFLIGSTENKIPKLNDLMIVAEQAGKNGADLQAIEDKNN 300	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		ICLPb	ABAGLKLFCSEAVVUQOIKASSIENQVACIDPFLDPUKRSNTBAAJAKETDSDLYPDMD 360	ICLAn	ANAGLKLFPDAAVVDALINNSPLNPKAAIEKYLQDQGKCKGNLBARAJAHEIAGTDLYPDMD 360	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		ICLPb	AARTTREGFVRYRGTGQCQAVNRAYAAPFDALIMMSEKSLPDDYQAQKFAEWHAVWPFEQKL 420	ICLAn	AAPTTRREGFVRYRGTGQCQAVNRAYAAPFDALIMMSEKSLPDDYQAQKFAEWHAVWPFEQKL 420	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		ICLPb	AVNLSPSFNWWAMPRGDEQTTYIRLKGKLGTYAQOFITLAGLHTTALISQDPKAAYSHNMG 480	ICLAn	AVNLSPSFNWWAMPRGDEQTTYIRLKGKLGTYAQOFITLAGLHTTALISQDPKAAYSHNMG 480	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		ICLPb	RAYGELVQEPEMENGVDVVTHQKWSGANVYDELLKMVSGG1SSTSAMGTQVTEDQFK- 537	ICLAn	RAYGELVQEPEMANGVDVVTHQKWSGANVYDNLLM1TGGVSTAAAMGKVTEFDK5 538	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		<p><b>B</b></p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>me-ICLPb</td><td>MIEBNPARRLPRQQLPLFRPSLIPNHN-AVRITFAGCSGRMSG-SPLPPVTPVSTAHASDSFO 58</td></tr> <tr> <td>me-ICLAF</td><td>MFRSPVFRRIIFRPLPTLSSTAGSPSHLALSRSFCOTPRMSSSPLETFVPPVSTLPSDSFO 60</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>me-ICLPb</td><td>LLSSAAEKTGPADELALFNEQVKAVTENWTPRREGICRIPVSAEEVSKRGSLQQTYPSSSM 118</td></tr> <tr> <td>me-ICLAF</td><td>LLSTAEGSSAEADALYBQQIKDVAWMMSPRFEGIKRIPVSAADVSKRGTLQQTYPSSSM 120</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>me-ICLPb</td><td>ARKLNFLILLNEBANTOKPWHTLGALIDPVOMTQQAPNQEVLYISGWACSSLTTTNBVSPDF 178</td></tr> <tr> <td>me-ICLAF</td><td>ARKLNFLILLNEBANTOKPWHTLGALIDPVOMTQQAPNQEVLYISGWACSSLTTTNBVSPDF 180</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>me-ICLPb</td><td>GDYPTNTVNVNQVORLFLKAQPMIDSKMDSRKLSPEERKNTPYTDMPPIVADGDTGHOG 238</td></tr> <tr> <td>me-ICLAF</td><td>GDYPTNTVNVNQVORLFLKAQPMIDSKMDSRKLSPEERKNTPYTDMPPIVADGDTGHOG 240</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>me-ICLPb</td><td>LTAVALKLAFLPAEONGAAAHHFEDQLHLGKKGCKGHLA-KVILVPIGHIINRLVAAVPQNDLM 297</td></tr> <tr> <td>me-ICLAF</td><td>LSAVLKLALFLPAEONGAAAHHFEDQLHLGKKGCKGHLA-KVILVPIGHIINRLVAAVPQNDLM 299</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>me-ICLPb</td><td>GTEFLLIARTSESGKLSSSIDVRDHFILGVTTENSDPLAETLQLKLSSEGASGPEDIKF 357</td></tr> <tr> <td>me-ICLAF</td><td>GVENLVIARTSESGKLSSSIDVRDHFILGVVAEEVEPLAETLQAMEREGAAPEIDAID 359</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>me-ICLPb</td><td>ESQWQKVNHHKLTTFETEAVANLNPFGPNP-SASNAYKQVSSENRLVTKNNUDRLQJPNTPNP 416</td></tr> <tr> <td>me-ICLAF</td><td>ELDWVKKHHKLTTFETEAVDAHLEAEGGPQPSVDRAYKKKVEVPDLISIIRR-ALASDVTKK 418</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>me-ICLPb</td><td>PVFMNSD1PQHREGFVHYHAGNAATKRAINFAPYADLNNVTPDCPSPVTEAATTFHHIRA 476</td></tr> <tr> <td>me-ICLAF</td><td>PVWVSCDSHPRTREGFVHYHAGFPAFANTKRAKEFAPYADLNNVTPDCPSPVTEAATTFHHIRA 478</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>me-ICLPb</td><td>KVPGKKLVNLSPSPNWNMGHIGFSSEASLKSFIINDIAKHGFLVLOLISLAGLISNATMTELS 538</td></tr> <tr> <td>me-ICLAF</td><td>AYPGKKLVNLSPSPNWNMGQGFDEASLKSFPVNOLAKHGFLVLOLISLAGLISNATMTELS 538</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>me-ICLPb</td><td>RQFKDD3MSLTVNLQREKEIGWDWLTHQKNGGASYMOGICVGSNRE-----RELRGCPF 591</td></tr> <tr> <td>me-ICLAF</td><td>RAFKDDEGMALAVRLQISREKELGWVLTHQKNGGASYMOGICVGSNRE-----RELRGCPF 598</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> <tr> <td>me-ICLPb</td><td>FNSPNCNICHPCRL----- 603</td></tr> <tr> <td>me-ICLAF</td><td>EKGKLSIHFDLLAINANNPKLQASKQIPRHGRIIIMPSVLLDRCRDKKKSP 649</td></tr> <tr> <td colspan="2">*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:</td></tr> </tbody> </table>	me-ICLPb	MIEBNPARRLPRQQLPLFRPSLIPNHN-AVRITFAGCSGRMSG-SPLPPVTPVSTAHASDSFO 58	me-ICLAF	MFRSPVFRRIIFRPLPTLSSTAGSPSHLALSRSFCOTPRMSSSPLETFVPPVSTLPSDSFO 60	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		me-ICLPb	LLSSAAEKTGPADELALFNEQVKAVTENWTPRREGICRIPVSAEEVSKRGSLQQTYPSSSM 118	me-ICLAF	LLSTAEGSSAEADALYBQQIKDVAWMMSPRFEGIKRIPVSAADVSKRGTLQQTYPSSSM 120	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		me-ICLPb	ARKLNFLILLNEBANTOKPWHTLGALIDPVOMTQQAPNQEVLYISGWACSSLTTTNBVSPDF 178	me-ICLAF	ARKLNFLILLNEBANTOKPWHTLGALIDPVOMTQQAPNQEVLYISGWACSSLTTTNBVSPDF 180	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		me-ICLPb	GDYPTNTVNVNQVORLFLKAQPMIDSKMDSRKLSPEERKNTPYTDMPPIVADGDTGHOG 238	me-ICLAF	GDYPTNTVNVNQVORLFLKAQPMIDSKMDSRKLSPEERKNTPYTDMPPIVADGDTGHOG 240	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		me-ICLPb	LTAVALKLAFLPAEONGAAAHHFEDQLHLGKKGCKGHLA-KVILVPIGHIINRLVAAVPQNDLM 297	me-ICLAF	LSAVLKLALFLPAEONGAAAHHFEDQLHLGKKGCKGHLA-KVILVPIGHIINRLVAAVPQNDLM 299	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		me-ICLPb	GTEFLLIARTSESGKLSSSIDVRDHFILGVTTENSDPLAETLQLKLSSEGASGPEDIKF 357	me-ICLAF	GVENLVIARTSESGKLSSSIDVRDHFILGVVAEEVEPLAETLQAMEREGAAPEIDAID 359	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		me-ICLPb	ESQWQKVNHHKLTTFETEAVANLNPFGPNP-SASNAYKQVSSENRLVTKNNUDRLQJPNTPNP 416	me-ICLAF	ELDWVKKHHKLTTFETEAVDAHLEAEGGPQPSVDRAYKKKVEVPDLISIIRR-ALASDVTKK 418	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		me-ICLPb	PVFMNSD1PQHREGFVHYHAGNAATKRAINFAPYADLNNVTPDCPSPVTEAATTFHHIRA 476	me-ICLAF	PVWVSCDSHPRTREGFVHYHAGFPAFANTKRAKEFAPYADLNNVTPDCPSPVTEAATTFHHIRA 478	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		me-ICLPb	KVPGKKLVNLSPSPNWNMGHIGFSSEASLKSFIINDIAKHGFLVLOLISLAGLISNATMTELS 538	me-ICLAF	AYPGKKLVNLSPSPNWNMGQGFDEASLKSFPVNOLAKHGFLVLOLISLAGLISNATMTELS 538	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		me-ICLPb	RQFKDD3MSLTVNLQREKEIGWDWLTHQKNGGASYMOGICVGSNRE-----RELRGCPF 591	me-ICLAF	RAFKDDEGMALAVRLQISREKELGWVLTHQKNGGASYMOGICVGSNRE-----RELRGCPF 598	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:		me-ICLPb	FNSPNCNICHPCRL----- 603	me-ICLAF	EKGKLSIHFDLLAINANNPKLQASKQIPRHGRIIIMPSVLLDRCRDKKKSP 649	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	
ICLPb	MDSIEQEDQKYWAEVQAVKENWQDSRWRYTAKRPTAQIIVAKRGNLKIEYPSNVQSKKLW 60																																																																																																																								
ICLAn	MSYILEDQR*NDVEAAVKSNSKUDSRMRYTAKRPTAQIIVAKRGNLKIEYPSNVQAKKLW 60																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
ICLPb	GILLEERFKNTAATFTYGCCLPFTMLTQMVKYLDTVTVSGWSQSSTASSTDEPSFDLADYPM 120																																																																																																																								
ICLAn	GILLENFKNEEASTFTYGCCLPFTMTCMAKYLDTVTVSGWSQSSTASSTDEPSFDLADYPM 120																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
ICLPb	NTVPKNVNLQMAQLPHDRQKBEERLAPRKSPQRASLNIDYLRLPIIADADTGHQGLTAVM 180																																																																																																																								
ICLAn	NTVPKNVNLQMAQLPHDRQKBEERLAPRKSPQRASLNIDYLRLPIIADADTGHQGLTAVM 180																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
ICLPb	KLTKLFIERGAAGCHHIEDQAPOTKKGHMGAKVILVPISEHINRLVIAIRAGADIMGTDLLA 240																																																																																																																								
ICLAn	KLTKLFIERGAAGCHHIEDQAPOTKKGHMGAKVILVPISEHINRLVIAIRAGADIMGTDLLA 240																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
ICLPb	VAROTSSEAATLITSTIDPRDHAFLIGSTENKIPKLNDLMIVAEQAGKNGADLQAIEDKNN 300																																																																																																																								
ICLAn	IARTOSSEAATLITSTIDPRDHAFLIGSTENKIPKLNDLMIVAEQAGKNGADLQAIEDKNN 300																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
ICLPb	ABAGLKLFCSEAVVUQOIKASSIENQVACIDPFLDPUKRSNTBAAJAKETDSDLYPDMD 360																																																																																																																								
ICLAn	ANAGLKLFPDAAVVDALINNSPLNPKAAIEKYLQDQGKCKGNLBARAJAHEIAGTDLYPDMD 360																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
ICLPb	AARTTREGFVRYRGTGQCQAVNRAYAAPFDALIMMSEKSLPDDYQAQKFAEWHAVWPFEQKL 420																																																																																																																								
ICLAn	AAPTTRREGFVRYRGTGQCQAVNRAYAAPFDALIMMSEKSLPDDYQAQKFAEWHAVWPFEQKL 420																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
ICLPb	AVNLSPSFNWWAMPRGDEQTTYIRLKGKLGTYAQOFITLAGLHTTALISQDPKAAYSHNMG 480																																																																																																																								
ICLAn	AVNLSPSFNWWAMPRGDEQTTYIRLKGKLGTYAQOFITLAGLHTTALISQDPKAAYSHNMG 480																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
ICLPb	RAYGELVQEPEMENGVDVVTHQKWSGANVYDELLKMVSGG1SSTSAMGTQVTEDQFK- 537																																																																																																																								
ICLAn	RAYGELVQEPEMANGVDVVTHQKWSGANVYDNLLM1TGGVSTAAAMGKVTEFDK5 538																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
me-ICLPb	MIEBNPARRLPRQQLPLFRPSLIPNHN-AVRITFAGCSGRMSG-SPLPPVTPVSTAHASDSFO 58																																																																																																																								
me-ICLAF	MFRSPVFRRIIFRPLPTLSSTAGSPSHLALSRSFCOTPRMSSSPLETFVPPVSTLPSDSFO 60																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
me-ICLPb	LLSSAAEKTGPADELALFNEQVKAVTENWTPRREGICRIPVSAEEVSKRGSLQQTYPSSSM 118																																																																																																																								
me-ICLAF	LLSTAEGSSAEADALYBQQIKDVAWMMSPRFEGIKRIPVSAADVSKRGTLQQTYPSSSM 120																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
me-ICLPb	ARKLNFLILLNEBANTOKPWHTLGALIDPVOMTQQAPNQEVLYISGWACSSLTTTNBVSPDF 178																																																																																																																								
me-ICLAF	ARKLNFLILLNEBANTOKPWHTLGALIDPVOMTQQAPNQEVLYISGWACSSLTTTNBVSPDF 180																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
me-ICLPb	GDYPTNTVNVNQVORLFLKAQPMIDSKMDSRKLSPEERKNTPYTDMPPIVADGDTGHOG 238																																																																																																																								
me-ICLAF	GDYPTNTVNVNQVORLFLKAQPMIDSKMDSRKLSPEERKNTPYTDMPPIVADGDTGHOG 240																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
me-ICLPb	LTAVALKLAFLPAEONGAAAHHFEDQLHLGKKGCKGHLA-KVILVPIGHIINRLVAAVPQNDLM 297																																																																																																																								
me-ICLAF	LSAVLKLALFLPAEONGAAAHHFEDQLHLGKKGCKGHLA-KVILVPIGHIINRLVAAVPQNDLM 299																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
me-ICLPb	GTEFLLIARTSESGKLSSSIDVRDHFILGVTTENSDPLAETLQLKLSSEGASGPEDIKF 357																																																																																																																								
me-ICLAF	GVENLVIARTSESGKLSSSIDVRDHFILGVVAEEVEPLAETLQAMEREGAAPEIDAID 359																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
me-ICLPb	ESQWQKVNHHKLTTFETEAVANLNPFGPNP-SASNAYKQVSSENRLVTKNNUDRLQJPNTPNP 416																																																																																																																								
me-ICLAF	ELDWVKKHHKLTTFETEAVDAHLEAEGGPQPSVDRAYKKKVEVPDLISIIRR-ALASDVTKK 418																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
me-ICLPb	PVFMNSD1PQHREGFVHYHAGNAATKRAINFAPYADLNNVTPDCPSPVTEAATTFHHIRA 476																																																																																																																								
me-ICLAF	PVWVSCDSHPRTREGFVHYHAGFPAFANTKRAKEFAPYADLNNVTPDCPSPVTEAATTFHHIRA 478																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
me-ICLPb	KVPGKKLVNLSPSPNWNMGHIGFSSEASLKSFIINDIAKHGFLVLOLISLAGLISNATMTELS 538																																																																																																																								
me-ICLAF	AYPGKKLVNLSPSPNWNMGQGFDEASLKSFPVNOLAKHGFLVLOLISLAGLISNATMTELS 538																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
me-ICLPb	RQFKDD3MSLTVNLQREKEIGWDWLTHQKNGGASYMOGICVGSNRE-----RELRGCPF 591																																																																																																																								
me-ICLAF	RAFKDDEGMALAVRLQISREKELGWVLTHQKNGGASYMOGICVGSNRE-----RELRGCPF 598																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									
me-ICLPb	FNSPNCNICHPCRL----- 603																																																																																																																								
me-ICLAF	EKGKLSIHFDLLAINANNPKLQASKQIPRHGRIIIMPSVLLDRCRDKKKSP 649																																																																																																																								
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:																																																																																																																									

## 4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram obtidos os cDNAs e as proteínas preditas de me-ICL e ICL. O cDNA de me-ICL está sendo completado. Os alinhamentos mostram que ICL e me-ICL apresentam, alta homologia com os respectivos homólogos de outros fungos. Os oligonucleotídeos para amplificação dos cDNAs visando a expressão heteróloga foram desenhados.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FELIPE, M.S.S. ANDRADE, R.V.; ARRAES, B.M.; NICOLA, A.M.; MARANHÃO, A.Q.; TORRES, F.A.G.; SILVA-PEREIRA, I.; POÇAS-FONSECA, M.J.; CAMPOS, E.G.; MORAES, L.M.P.; ANDRADE, P.A.; TAVARES, A.H.F.P.; SILVA, S.S.; KYAW, C.M.; SOUZA, D.P.; PbGenome Network, PEREIRA, M.; JESUÍNO, R.S.A.; ANDRADE, E.V.; PARENTE, J.A.; OLIVEIRA, G.S.; BARBOSA, M.S., MATINS, N.F.; FACHIN, A.L.; CARDOSO, R.S.; PASSOS, G.A.S.; ALMEIDA, N.F.; WALTER, M.E.M.T.; SOARES, C.M.A.; CARVALHO, M.J.A.; BRÍGIDO, M.M. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *JBC Papers in Press*. April 27, 2005.
- LUTTIK, M.A.H.; KÖTTER, P.; SALOMONS, F.A.; VAN DER KLEI, I.J.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 Gene Encodes a Mitochondrial 2-Methylisocitrate Lyase Involved in Propionyl-Coenzyme A Metabolism. *Journal of Bacteriology*, v.182, n.24, p. 7007-7013, Dec. 2000.
- NAKATA, M. & SELITRENNIKOFF, C.P. A method to assay Glyoxilate cycle Inhibitors for Antifungals. *The Journal of Antibiotics*, v. 55, n.6, p.602-604. 2002.
- SELITRENNIKOFF, C.P. & NAKATA, M. New cell wall for antifungal drugs. *Current Opinion In Investigational Drugs*. 4 (2), 2003.

## FONTE DE FINANCIAMENTO: IFS, CNPq, CAPES.

<sup>1</sup> Mestranda em Biologia, concentração em Biologia Molecular e Celular/Instituto de Ciências Biológicas/UFG, [alinebioufg@yahoo.com.br](mailto:alinebioufg@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Colaboradora/ Instituto de Ciências Biológicas /UFG, [celia@icb.ufg.br](mailto:celia@icb.ufg.br)

<sup>3</sup> Orientadora/Instituto de Ciências Biológicas /UFG, [mani@icb.ufg.br](mailto:mani@icb.ufg.br)