

Isocitrato liase de *Paracoccidioides brasiliensis*.

CRUZ, Aline Helena da Silva¹; **SOARES**, Célia Maria de Almeida²; PEREIRA, Maristela³

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 glicoxalato, que é ausente em mamíferos, é requerido para a utilização destas fontes de carbono (NAKATA, 2002). As principais enzimas do ciclo do glicoxalato são: isocitrato liase e malato sintase. A enzima isocitrato liase catalisa a reação reversível de clivagem do isocitrato em glicoxalato e succinato. A molécula de glicoxalato condensa com uma de Acetil-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 glicoxalato 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 glicoxalato que ocorre nos glicoxissomos, o ciclo do 2-metilcitrato (ciclo do ácido 2-metilcitrato) 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). Nosso 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) 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* DH5α 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-metiliscitrato e DL-isocitrato para me-ICL e ICL, respectivamente.

3. RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção da seqüência.

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.

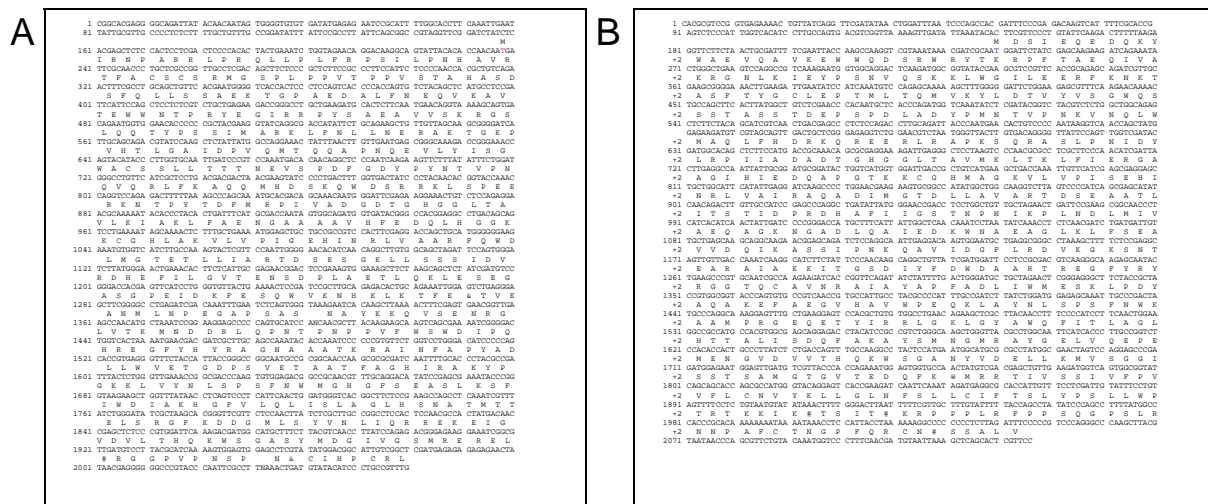


Figura01: Seqüências de nucleotídeos e proteínas preditas de me-ICL (A) e ICL (B). Sendo M (metionina) o códon inicial.

3.2 – Alinhamento das seqüências de proteínas preditas de me-ICL e ICL.

As seqüências foram alinhadas com outros organismos.

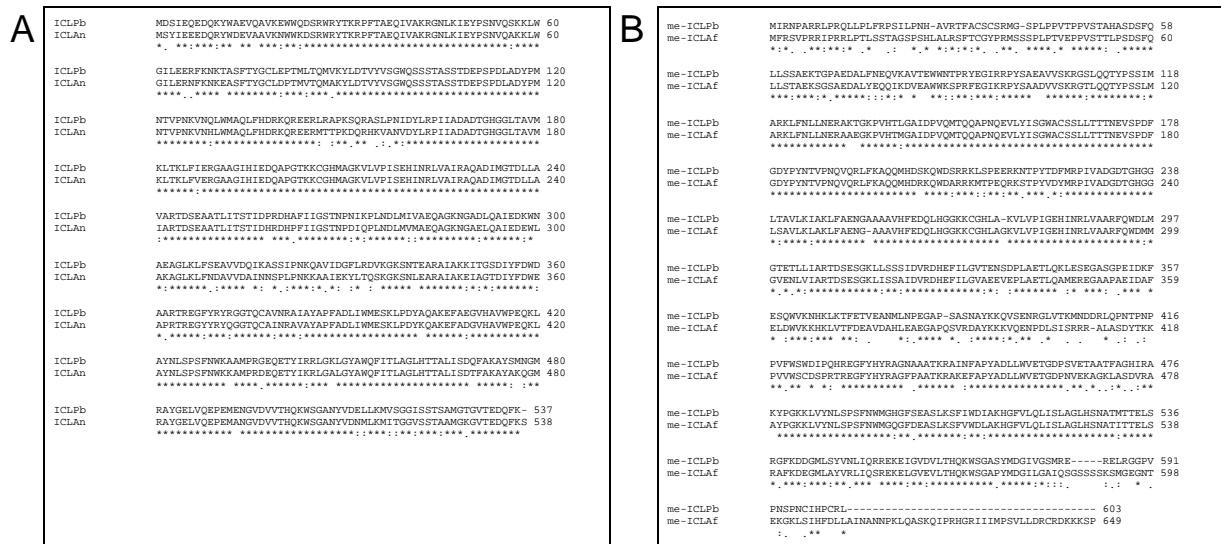


Figura 02: Alinhamento das proteínas confirmando ser ICL uma isocitrato liase glioxissomal (A) e me-ICL, mitocondrial (B). Pb (*P. brasiliensis*), An (*Aspergillus nidulans*) e Af (*Aspergillus fumigatus*).

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.

¹ Mestranda em Biologia, concentração em Biologia Molecular e Celular/Instituto de Ciências Biológicas/UFG, alinebioufg@yahoo.com.br

² Colaboradora/ Instituto de Ciências Biológicas /UFG, celia@icb.ufg.br

³ Orientadora/Instituto de Ciências Biológicas /UFG, mani@icb.ufg.br