

Clonagem, caracterização e expressão de Isocitrato liase de *Paracoccidioides brasiliensis*.

CRUZ, Aline Helena da Silva¹; **SANTOS-SILVA**, Ludier Kesser¹; **SOARES**, Célia Maria de Almeida²; **PEREIRA**, Maristela³

Palavras-chave: Isocitrato liase, *Paracoccidioides brasiliensis*, ciclo do glicoxilato, antifúngicos.

1. INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma das micoses humanas sistêmicas mais prevalentes da América Latina, O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, causador desta micose, é 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 existe uma limitação de glicose (SELITRENNIKOFF and NAKATA, 2003), sendo assim, fungos e muitos outros microorganismos procaríotos e eucaríotos, na busca de novas fontes de carbono, utilizam etanol, acetato e ácidos. Para a utilização destas fontes de carbono é requerido um ciclo que ocorre nos glioxissomos e é ausente em mamíferos, o ciclo do glioxilato (NAKATA, 2002). As principais enzimas deste ciclo são: isocitrato liase (ICL) e malato sintase (MLS). A enzima ICL catalisa a reação reversível de clivagem do isocitrato em glioxalato e succinato. A molécula de glioxalato condensa com acetil-CoA formando malato pela ação da enzima MLS (SELITRENNIKOFF, 2003), e a partir do malato é formado o oxaloacetato.

O fato de oxaloacetato ser um precursor da glicose na gliconeogênese gerou a hipótese de que a finalidade primordial do ciclo do glioxalato é a produção de glicose. Esta hipótese ainda é mantida devida aos experimentos realizados com *Saccharomyces cerevisiae*, que verificaram a alta indução de frutose-1,6-bifosfato (*FBP1*), enzima que realiza a conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato, quando o fungo está presente no interior de macrófagos (LORENZ, 2002).

As limitações terapêuticas 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.

A ICL parece estar envolvida em mecanismos de virulência de muitos microorganismos. Além disso, nenhuma proteína homóloga foi encontrada em humanos, o que torna a ICL um candidato atrativo como alvo para antibióticos e antifúngicos específicos (Ebel, et all. 2006).

O gene da ICL é supra-regulado em levedura (Felipe, et all 2005). Como nosso grupo tem trabalhado visando a busca de moléculas de *P. brasiliensis* ausentes em humanos como alvos para novas drogas, a seqüência de ICL foi obtida do transcriptoma de *P. brasiliensis* com objetivo de realizarmos a clonagem, caracterização, expressão heteróloga e avaliar a atividade desta enzima.

2. METODOLOGIA

2.1–Organismo:

Os ensaios foram realizados com o isolado já caracterizado, *Pb 01* (ATCC, MYA,828) de *P. brasiliensis*, padrão de nosso laboratório.

2.2-Construção de oligonucleotídeos: O clones de cDNA de ICL, obtidos do transcriptoma de *P. brasiliensis* foi seqüenciado. A partir da seqüência de cDNA de ICL obtida, oligonucleotídeos foram construídos, adicionando-se sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Xho*HI. Os oligonucleotídeos foram utilizados na amplificação do cDNA correspondente, via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

2.3-Expressão Heteróloga: A clonagem do cDNA de ICL foi realizada no vetor de expressão pET32a (Novagen), a linhagem *E.coli* DH5 α foi a receptora do plasmídeo recombinante. O clone selecionado foi sequenciado e utilizado para transformar *E. coli* C43, a qual possibilitou a super expressão do gene. Os clones recombinantes foram selecionados por análise do perfil de expressão de proteínas de fusão e por sequenciamento.

2.4- Purificação: A purificação da enzima recombinante foi realizada usando resina de níquel de acordo com o protocolo apresentado pela Novagen.

2.5 - Atividade enzimática: A atividade enzimática de ICL da recombinante foi avaliada pelo método de Ebel et all (2006). O substrato utilizado foi DL-isocitrato.

2.6- Análises computacionais: As análises do cDNA de ICL foram realizadas utilizando programas computacionais tais como Clustal X (THOMPSON et all, 1997), Gene Runner (<http://www.generunner.com>), Blastx e Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

2.6- Análise Filogenética: A árvore filogenética foi construída pelo método de múltiplo alinhamento de seqüências usando o programa Clustal X. A árvore foi gerada pelo método de neighbor-joining (SAITOU, 1987) e visualizada através do programa Tree View.

2.7- Southern blot: A extração de DNA de *P. brasiliensis* foi realizada conforme descrito por DEL SAL (1989) e o *Southern blot* foi processado de acordo com o protocolo descrito por SAMBROOK e RUSSEL (2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1-Expressão Heteróloga:

A indução da expressão da proteína de fusão ICL, foi realizada através do crescimento do clone recombinante na presença de 1mM de IPTG, durante 3 horas. A proteína superinduzida apresentou o tamanho esperado de aproximadamente 83KDa, sendo 60 KDa o valor estimado para a proteína ICL não fusionada.

3.2- Atividade enzimática:

Na intenção de se verificar a atividade da recombinante, realizou-se a purificação da enzima ICL de *P. brasiliensis* na forma nativa, em resina de níquel, a partir do extrato protéico do clone recombinante. O sucesso na obtenção da proteína purificada permitiu a realização de testes de atividade enzimática para ICL com a proteína de fusão. Testes iniciais apresentaram uma atividade específica de 0,159 U/ μ g, sendo que 1U é definida como a formação de 1 μ mol de glioxilato fenilhidrazone por minuto usando isocitrato como substrato. Este resultado demonstra que a recombinante purificada não só é ativa, como apresenta atividade de ICL mesmo fusionada.

3.3- Análises computacionais:

A homologia da seqüência de aminoácidos da ICL de *P. brasiliensis* com ICLs de outros organismos foi avaliada através do programa Clustalx. O alinhamento confirmou a alta identidade entre as ICLs de diferentes organismos, além da presença de resíduos conservados da família das ICL. O hexa-peptídeo conservado K(KR)CGH(LMQR), que pode ser usado como um motivo de identificação de ICL, foi identificado como KKCGHM, na ICL de *P. brasiliensis*. O sítio ativo desta enzima, incluindo o resíduo de cisteína, conservado em seqüências de fungos, plantas e bactérias, está localizado no meio do hexa-peptídeo conservado.

3.4-Análise Filogenética:

Com o objetivo de verificar a proximidade evolutiva de ICLs realizamos uma análise filogenética utilizando a proteína de ICL de diferentes fungos. A árvore filogenética obtida através do método neighbour-joining mostrou uma distribuição das seqüências condizente com a filogenia dos organismos utilizados. A seqüência de ICL de *P. brasiliensis* agrupou-se juntamente com a ICL de *Coccidioides immitis* e de outros Eurotiomycetes, no filo Ascomycota.

2.7- Southern blot.

Para avaliar o número de cópias do gene de ICL, o clone de ICL obtido do transcriptoma de *P. brasiliensis* foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I para liberação do inserto. O fragmento liberado foi utilizado como sonda para realização do *Southern blot*. O DNA de *P. brasiliensis* foi digerido com enzimas de restrição, *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hin*III, *Kpn*I, transferido para membrana de náilon e hibridizado com a sonda radioativa. A análise do resultado apresentado sugere a presença de apenas um gene de ICL em *P. brasiliensis*.

4. CONCLUSÃO

- O proteína predita de ICL de *P. brasiliensis* apresenta alta homologia com ICL de outros organismos.
- A expressão heteróloga da ICL de *P. brasiliensis* e posterior purificação da mesma permitiram a realização de ensaios enzimáticos que confirmam a atividade de ICL da proteína de fusão obtida.
- A proteína predita de ICL de *P. brasiliensis* possui o resíduo de cisteína no meio do hexapeptídeo conservado característico das ICLs de fungos, plantas e bactérias.

- A análise filogenética mostra que ICL de *P. brasiliensis* apresenta um agrupamento baseado na filogenia.
- A análise do *Southern blot* indica a existência de apenas um gene para a enzima ICL em *P. brasiliensis*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DEL SAL, G.; MANFIOLETTI, G. & SCNEIDER, C. The CTAB – DNA precipitation method: a common miniscale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques*. v.7, p. 514-519, 1989.

EBEL, F.; SCHWIENBACHER, M.; BEYER, J.; HEESEMANN, J.; BRAKHAGE, A.A.; BROCK, M. Analysis of regulation, expression, and localization of the isocitrate lyase from *Aspergillus fumigatus*, a potential target for antifungal drug development. *Fungal Genetics and Biology*. 43(7), p. 476-489. July, 2006.

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.

SAITOU, N. AND NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, v.4, p.406-425, 1987.

SAMBROOK J., RUSSEL D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. 2001.

SELITRENNIKOFF, C.P. & NAKATA, M. New cell wall for antifungal drugs. *Current Opinion In Investigational Drugs*. 4 (2), 2003.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. AND HIGGINS, D.G. The Clustal X window a interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuclei. Acids. Res.* V.24, p.4876-4882, 1997.

FONTE DE FINANCIAMENTO: IFS, CNPq, CAPES e FUNAPE/UFG

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