



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

**Identificação Proteômica, Expressão Heteróloga, Citolocalização,  
Estudos de Regulação Transcricional e Traducional da  
Aconitase Mitocondrial de *Paracoccidioides brasiliensis***

**TESE DE DOUTORADO**

Candidato: Wesley de Almeida Brito  
Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Goiânia - GO  
Novembro - 2009





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia**  
**Doutorado em Biologia – Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular**

**Identificação Proteômica, Expressão Heteróloga, Citolocalização,  
Estudos de Regulação Transcricional e Traducional da  
Aconitase Mitocondrial de *Paracoccidioides brasiliensis***

**Goiânia – GO**  
**Novembro / 2009**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**      ☐ Dissertação      ☒ Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                              |        |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--|
| Autor (a):                                                                                                          | <b>Wesley de Almeida Brito</b>                                                                                                                                                               |        |  |
| E-mail:                                                                                                             | <b>wesleyfarmacia@uol.com.br</b>                                                                                                                                                             |        |  |
| Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input type="checkbox"/> Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não |                                                                                                                                                                                              |        |  |
| Vínculo empregatício do autor                                                                                       |                                                                                                                                                                                              |        |  |
| Agência de fomento:                                                                                                 |                                                                                                                                                                                              | Sigla: |  |
| País:                                                                                                               |                                                                                                                                                                                              | UF:    |  |
|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                              | CNPJ:  |  |
| Título:                                                                                                             | <b>Identificação Proteômica, Expressão Heteróloga, Citolocalização, Estudos de Regulação Transcricional e Traducional da Aconitase Mitocondrial de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.</b> |        |  |
| Palavras-chave:                                                                                                     | <b><i>Paracoccidioides brasiliensis</i>, Aconitase, Proteômica.</b>                                                                                                                          |        |  |
| Título em outra língua:                                                                                             | <b>Identification, Characterization and Regulation Studies of the Mitochondrial Aconitase of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.</b>                                                       |        |  |
| Palavras-chave em outra língua:                                                                                     | <b><i>Paracoccidioides brasiliensis</i>, Aconitase, Mass spectrometry, Cellular localization, Carbon sources.</b>                                                                            |        |  |
| Área de concentração:                                                                                               | <b>Biologia Celular e Molecular</b>                                                                                                                                                          |        |  |
| Data defesa: (dd/mm/aaaa)                                                                                           | <b>18/11/2009</b>                                                                                                                                                                            |        |  |
| Programa de Pós-Graduação:                                                                                          | <b>Biologia</b>                                                                                                                                                                              |        |  |
| Orientador (a):                                                                                                     | <b>Dra. Célia Maria de Almeida Soares</b>                                                                                                                                                    |        |  |
| E-mail:                                                                                                             | <b>celia@icb.ufg.br</b>                                                                                                                                                                      |        |  |
| Co-orientador (a):                                                                                                  |                                                                                                                                                                                              |        |  |
| E-mail:                                                                                                             |                                                                                                                                                                                              |        |  |

**3. Informações de acesso ao documento:**

Liberação para disponibilização?<sup>1</sup>      ☒ total      ☐ parcial

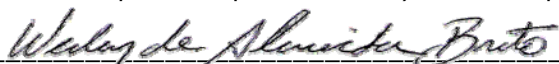
Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique: \_\_\_\_\_

☐ Outras restrições: \_\_\_\_\_

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

  
 \_\_\_\_\_  
 Assinatura do (a) autor (a)

Data: 12/03/2010

<sup>1</sup> Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Doutorado em Biologia – Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular**

**Identificação Proteômica, Expressão Heteróloga, Citolocalização,  
Estudos de Regulação Transcricional e Traducional da  
Aconitase Mitocondrial de *Paracoccidioides brasiliensis***

**Candidato: Wesley de Almeida Brito**

**Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares**

**Tese apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Biologia, como  
requisito para a obtenção do título de  
Doutor em Biologia, área de  
concentração em Biologia Celular e  
Molecular.**

**Linha de Pesquisa: Genoma, Proteoma e Bioquímica do fungo Patogênico Humano  
*Paracoccidioides brasiliensis*.**

**Goiânia – GO  
Novembro / 2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**GPT/BC/UFG**

Brito, Wesley de Almeida.

Identificação proteômica, expressão heteróloga, citolocalização, estudos de regulação transcricional e traducional da aconitase mitocondrial de *Paracoccidioides brasiliensis* [manuscrito] : / Wesley de Almeida Brito. - 2009.

98 f. : figs, tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,  
Instituto de Ciências Biológicas, 2009.  
Bibliografia.

1. *Paracoccidioides brasiliensis* 2. Aconitase.  
3. Proteômica. I. Título

**TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, DO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, DO INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.**

**APOIO FINANCEIRO: FINEP / FAPEG / SECTEC-GO / CNPq / MCT**

## **BANCA EXAMINADORA**

**PROFA. DRA. CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.**

**PROF. DR. CARLOS ANDRE ORNELAS RICART, DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.**

**PROFA. DRA. MARISTELA PEREIRA, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.**

**PROF. DR. CIRANO JOSE ULHOA, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.**

**PROF. DR. ALEXANDRE SIQUEIRA GUEDES COELHO, ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.**

## **SUPLENTES**

**PROF. DR. FLÁVIO MONTEIRO AYRES, CURSO DE BIOLOGIA, UNIDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS.**

**PROFA. DRA. SILVIA MARIA SALEM IZACC, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.**

**PROF. DR. ALEXANDRE MELO BAILÃO, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.**

**PROF. DR. CLAYTON LUIZ BORGES, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.**

*A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério.*

*Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras.*

**Albert Einstein**

*O reconhecimento  
da própria ignorância  
é um dos mais belos e seguros  
testemunhos de juízo que conheço.*

**Michel Eyquem de Montaigne**

À Ovidia, meu amor,  
que sempre acreditou em mim e me apoiou  
incondicionalmente em todos os projetos,  
minha verdadeira companheira para sempre,  
e às nossas amadas filhas Isabella, Isadora e Marisa,  
nosso maior e mais importante projeto nesta vida,  
motivos constantes de alegria e realização,  
dedico este trabalho.

Dedico também à minha mãe, Dona Fia,  
mulher de fibra e adiante do seu tempo,  
que sempre me deu amor e carinho.  
Viúva, trabalhou duro para proporcionar ao único filho  
aquilo que considera a maior riqueza: o estudo.  
Jamais me esquecerei do dia em que  
ao despertar da anestesia geral após complexa neurocirurgia,  
ainda na UTI, me disse que não “iria” daquela vez  
por que queria ver o filho doutor de verdade...  
Foi decisivo para que eu prosseguisse sempre!

## AGRADECIMENTOS

Ao Deus da vida, pela saúde e por colocar no meu caminho pessoas incríveis.

À admirável professora Dra. Célia Maria de Almeida Soares, pela orientação, compreensão e confiança. Por ser um exemplo de dedicação constante e de profissionalismo, em quem sempre procuro e procurarei me espelhar.

À professora Dra. Maristela Pereira, pela disponibilidade e pelos conselhos que muito contribuíram para este trabalho.

À professora Dra. Silvia Maria Sallem Izacc, pelo incentivo, otimismo e amizade.

À professora Dra. Ursula Kreisel, pelo incentivo à pesquisa e pelas conversas sempre agradáveis, desde minha graduação.

Ao professor Dr. Alexandre Mello Bailão, pela amizade e pelo apoio constante, mesmo quando estive distante.

Ao meu precioso amigo Dr. Clayton Luiz Borges, pelo incentivo e por todos os bons momentos compartilhados.

À Dra. Juliana Parente e à doutoranda Ana Flávia Parente, pela amizade verdadeira e pela ajuda na execução de inúmeros experimentos.

À doutoranda Tereza Cristina Vieira de Rezende, pela colaboração nos ensaios de proteômica, pela partilha dos conhecimentos e pela amizade.

Ao grande parceiro Dr. Luiz Augusto Pereira, pela discussão sobre os protocolos de clonagem e expressão heteróloga, pela doação de reagentes e pelos inesquecíveis momentos de descontração.

À amiga Dra. Sabrina Fonseca Ingênilo Moreira Dantas, uma verdadeira “*lady*” que tem o dom de suavizar os momentos mais difíceis trazendo alegria, e ao seu sempre presente esposo, Sr. Alessandro Dantas.

Às amigas mestradas Elisa Flávia Bailão Luiz Cardoso e Mirelle Garcia Silva, pela colaboração nos experimentos e pela presteza e atenção especial.

À grande parceira, mestrada Patrícia de Souza Lima, pela alegria contagiante, pelas vibrantes comemorações nos bons resultados e ainda pela colaboração na clonagem e expressão heteróloga, na produção de anticorpos policlonais e na imunocitocalização.

Às doutorandas Kelly Pacheco de Castro e Sarah Veloso Nogueira, por estarem sempre prontas a ajudar em tudo e em discutir os resultados.

À doutoranda Patrícia Kott Tomazett, pelo repasse do treinamento na ultracentrífuga e pelas agradáveis conversas sobre o mundo artes.

À doutoranda Patrícia Fernanda Zambuzzi-Carvalho, pela presteza e exemplo, pelo auxílio com os freezers e pelas agradáveis conversas sobre família.

Aos parceiros e recém mestres, Rodrigo da Silva Santos, Benedito Rodrigues Neto e Rogério Bento Fiúza, pela troca de informações, pela colaboração e pelas longas conversas amistosas dentro e fora do laboratório.

Aos saudosos amigos egressos do LBM, Dra. Mônica Oliveira Santos, Dra. Milce Costa, Dra. Karine Bastos, Dra. Nadya da Silva Castro, Dra. Mônica Santiago Barbosa, MS. Bruno Tacco, MS. Lidiane Santana, MS. Aline Helena da Silva Cruz e MS. Maria Regilda Fernandes.

À Keila Patrícia Almeida de Carvalho, acadêmica do curso de farmácia da UFG e bolsista de iniciação científica, a quem tive a oportunidade de apresentar o laboratório e iniciar com os primeiros passos na atividade de pesquisa, pela atenção e ajuda durante os últimos experimentos deste trabalho.

Aos queridos parceiros do LBM: Nathalie, Ronney, Daciene, Mariana, Daiane, Bernadette, Hellen, Ademar, Renata, Amanda, Raquel, Hérika, Christielly e João Guilherme, pelo companheirismo e por compartilharem o conhecimento.

Aos membros da Banca que aceitaram nosso convite para contribuir com nosso trabalho.

À professora Dra. Maria Helena Rezende, pela amizade e pelos primeiros incentivos à pesquisa durante minha iniciação científica, que até agora perduraram.

Ao professor Dr. Cirano José Ulhoa, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia da UFG, pelas críticas construtivas sobre este trabalho, em nome de quem agradeço ao corpo docente do programa, pelo empenho e dedicação.

Aos professores do Instituto de Ciências Biológicas da UnB, Dr. Carlos André Ricart, Dr. Marcelo Valle de Sousa e Dra. Sônia Nair Bão, pelas sugestões e colaboração neste trabalho.

À professora Dra. Lydia Andreu Guillo, por ter gentilmente cedido o fotomicroscópio usado no presente trabalho e à sua orientanda Paula Roberta, pelo auxílio com as fotomicrografias.

À secretária da pós-graduação, Gleizilene Braz dos Santos (Gleice) por sua dedicação, disponibilidade e atenção todas as vezes que precisei.

Aos caríssimos professores Dr. Wander Cairo Albernaz e Alberto Luiz Finotti, a quem devo, além dos conhecimentos transmitidos, a consolidação dos meus princípios de ética, honra e humanidade.

À Professora Dra. Eliana Martins Lima, em nome de quem agradeço à minha inesquecível turma do curso de farmácia da UFG “Vigilantes da Saúde à Serviço da Ciência e da Vida”, que este ano comemora os vinte anos da formatura e também a todos os professores e amigos da Faculdade de Farmácia da UFG.

À Professora Dra. Valdirene Neves Monteiro, em nome de quem agradeço a todos meus colegas professores e colaboradores da Universidade Estadual de Goiás.

À Professora Dra. Dulcinéia Maria Barbosa Campos, pelos conselhos e incentivo, em nome de quem agradeço aos colegas professores e colaboradores da UniEvagélica - Centro Universitário de Anápolis.

Aos grandes amigos farmacêuticos classistas: Jaldo de Souza Santos, Nara Luiza de Oliveira e Marlene Ramos Vasconcelos, pelo enorme incentivo aos farmacêuticos cientistas.

Ao amigo farmacêutico Fuad Mohamad Allan, em nome de quem agradeço a todos meus amigos farmacêuticos da Associação Profissional Farmacêutica de Anápolis.

Ao amigo farmacêutico e professor Edilson Pinheiro Peixoto, em nome de quem agradeço a todos meus amigos que atuam no pólo industrial farmacêutico de Anápolis.

À amiga farmacêutica Ernestina Rocha de Souza e Silva, em nome de quem agradeço a todos os meus amigos que trabalham em Vigilância Sanitária e que sempre me incentivaram.

Aos meus alunos e ex-alunos, a quem devo a motivação constante na busca da construção do conhecimento.

À minha sogra Dona Aparecida e ao meu sogro Sr. Ary, pelo apoio constante e por me considerarem como filho, em nome de quem agradeço a todos os familiares.

A todos que de alguma forma me auxiliaram, profissionalmente ou pessoalmente, durante o desenvolvimento deste trabalho.

O meu sincero muito obrigado!

## SUMÁRIO

|                                                    |     |
|----------------------------------------------------|-----|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>                       | XII |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                            | XIV |
| <b>RESUMO</b>                                      | XV  |
| <b>ABSTRACT</b>                                    | XVI |
| <b>I. INTRODUÇÃO</b>                               |     |
| I.1 – O FUNGO <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 17  |
| I.2 – A DOENÇA PARACOCCIDIOIDOMICOSE               | 22  |
| I.3 – ACONITASE                                    | 24  |
| I.4 – ACONITASE DE <i>P. brasiliensis</i>          | 36  |
| <b>II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>               |     |
| II.1 – JUSTIFICATIVA                               | 38  |
| II.2 – OBJETIVOS                                   | 39  |
| <b>III. ARTIGO</b>                                 |     |
| <b>IV. DISCUSSÃO</b>                               | 40  |
| <b>V. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b>      | 45  |
| <b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>              | 46  |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                |                                                                         |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 2C                             | - Dois átomos de carbono                                                |
| 4C                             | - Quatro átomos de carbono                                              |
| Å                              | - Angstrom                                                              |
| <i>acnA</i>                    | - Aconitase A de procariotos (gene)                                     |
| <i>AcnA</i>                    | - Aconitase A de procariotos (proteína)                                 |
| <i>acnB</i>                    | - Aconitase B de procariotos (gene)                                     |
| <i>AcnB</i>                    | - Aconitase B de procariotos (proteína)                                 |
| <i>AcnC</i>                    | - Aconitase C de procariotos (proteína)                                 |
| <i>acnR</i>                    | - Regulador transcricional da aconitase (gene)                          |
| ACO                            | - Aconitase                                                             |
| ATP                            | - Trifosfato de adenosina                                               |
| cDNA                           | - DNA complementar                                                      |
| CG                             | - Ciclo do glioxalato                                                   |
| CK                             | - Ciclo de Krebs                                                        |
| CoA                            | - Coenzima A                                                            |
| DNA                            | - Ácido desoxirribonucléico                                             |
| EC                             | - Número na classificação enzimática                                    |
| EPR                            | - Ressonância paramagnética eletrônica                                  |
| EST                            | - Etiqueta de seqüência expressa                                        |
| FCM                            | - Citometria de fluxo                                                   |
| Fe <sub>3</sub> S <sub>4</sub> | - Grupo prostético ferro-enxofre (ferredoxina) com 3 átomos de ferro    |
| Fe <sub>4</sub> S <sub>4</sub> | - Grupo prostético ferro-enxofre (ferredoxina) com 4 átomos de ferro    |
| <i>g</i>                       | - Aceleração da gravidade                                               |
| GAPDH                          | - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (proteína)                      |
| GCPSR                          | - Reconhecimento de espécies filogenéticas por concordância genealógica |
| <i>Icl</i>                     | - Isocitrato liase (gene)                                               |
| ICL                            | - Isocitrato liase (proteína)                                           |
| IRE                            | - Elemento responsivo ao ferro                                          |
| IRP                            | - Proteína reguladora de ferro                                          |
| ITS                            | - Seqüência espaçadora interna                                          |
| kDa                            | - Kilodalton                                                            |
| LIP                            | - Lábil coleção de ferro                                                |

|              |                                                                                    |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Mls</i>   | - Malato sintase (gene)                                                            |
| MLS          | - Malato sintase (proteína)                                                        |
| Mpb          | - Mega pares de bases                                                              |
| mRNA         | - Ácido ribonucleico mensageiro                                                    |
| mtDNA        | - DNA mitocondrial                                                                 |
| MTS          | - Sequência de endereçamento para mitocôndria                                      |
| NADPH        | - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido                              |
| NC-IUBMB     | - Comitê de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular |
| NO           | - Óxido nítrico                                                                    |
| <i>PbACO</i> | - Aconitase de <i>Paraccocidioides brasiliensis</i> (proteína)                     |
| <i>Pbaco</i> | - Aconitase de <i>Paraccocidioides brasiliensis</i> (gene)                         |
| <i>Pbmls</i> | - Malato sintase de <i>Paraccocidioides brasiliensis</i> (gene)                    |
| PCM          | - Paracoccidioidomicose                                                            |
| PCR          | - Reação em cadeia da polimerase                                                   |
| PFGE         | - Eletroforese em gel de campo pulsado                                             |
| <i>pI</i>    | - Ponto isoelétrico                                                                |
| qRT-PCR      | - PCR quantitativo em tempo real                                                   |
| RNA          | - Ácido ribonucleico                                                               |
| RNI          | - Intermediários reativos do nitrogênio                                            |
| SAGE         | - Análise serial de expressão gênica                                               |
| Tf           | - Transferrina (proteína)                                                          |
| TfR          | - Receptor de transferrina                                                         |
| TPI          | - Triose fosfato isomerase (proteína)                                              |
| UTR          | - Região não traduzível do mRNA                                                    |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                             | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1 – Aspectos morfológicos macro e microscópicos de <i>P. brasiliensis</i>                                                                            | 18     |
| Figura 2 – Distribuição geográfica da PCM                                                                                                                   | 22     |
| Figura 3 – Reação catalisada pela aconitase                                                                                                                 | 25     |
| Figura 4 – Ligação do Citrato ao complexo Ferro-Enxofre da Aconitase                                                                                        | 26     |
| Figura 5 – Aconitase (ACO) é uma enzima que catalisa a isomerização do citrato à isocitrato tanto no ciclo de Krebs (CK) quanto no ciclo do glioxalato (CG) | 27     |
| Figura 6 – Controles pós-traducionais da síntese de ferritina e de receptor de transferrina                                                                 | 32     |
| Figura 7 – Estrutura da IRP1 complexada ao IRE-RNA                                                                                                          | 33     |

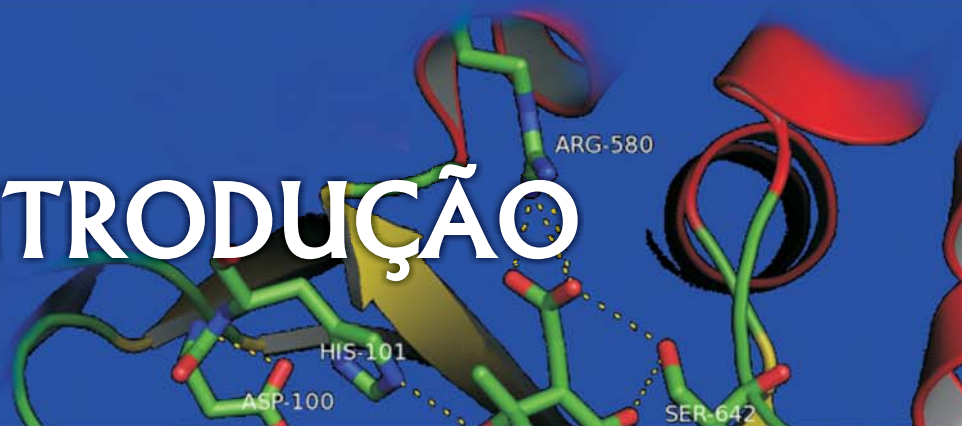
## RESUMO

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico, agente causador de uma importante micose sistêmica na América Latina, a paracoccidioidomicose (PCM). Uma proteína apresentando massa molecular de 80kDa e ponto isoelétrico (pI) de 7,79, preferencialmente expressa em células leveduriformes, foi isolada do proteoma de *P. brasiliensis* e caracterizada como uma aconitase (EC 4.2.1.3). Aconitase é uma enzima que catalisa a isomerização do citrato em isocitrato tanto no ciclo de Krebs (CK) quanto no ciclo glioxalato (CG). No presente estudo reportamos a clonagem e caracterização do cDNA da aconitase de *P. brasiliensis* (PbACO). O cDNA apresentou um quadro aberto de leitura (ORF) com 2337 pares de bases, codificando uma predita proteína com 779 resíduos de aminoácidos. Objetivando a localização da aconitase de *P. brasiliensis* foi produzida e purificada uma proteína recombinante a qual foi utilizada para a produção de um anticorpo policlonal anti-PbACO. A proteína foi localizada no fluido extracelular, parede celular, mitocôndria, citosol e nos peroxissomos de células leveduriformes, como demonstrado por ensaios de *Western blotting* e por imunocitoquímica. A análise da expressão do gene *Pbaco* foi realizada através RT-PCR em tempo real e os resultados demonstraram um aumento da expressão durante a diferenciação celular de micélio para levedura. A expressão *Pbaco* também foi avaliada quando o fungo é cultivado em meios de cultura contendo acetato e etanol como única fonte de carbono bem como em diferentes concentrações de ferro. Os resultados demonstraram que o transcrito de *Pbaco* é mais expresso em acetato e etanol como única fonte de carbono e em altas concentrações de ferro.

## ABSTRACT

*Paracoccidioides brasiliensis* is a thermal-dimorphic fungus, the causative agent of Paracoccidioidomycosis (PCM), an important endemic mycosis in Latin America. A protein species preferentially expressed in yeast cells with a molecular mass of 80kDa and isoelectric point (pI) of 7.79 was isolated from the proteome of *P. brasiliensis* and characterized as an aconitase (E.C. 4.2.1.3). Aconitase is an enzyme that catalyzes the isomerization of citrate to isocitrate in both the Krebs cycle (KC) and the glyoxylate cycle (GC). We report the cloning and characterization of the cDNA encoding the aconitase of *P. brasiliensis* (*PbACO*). The cDNA showed a 2337 bp open reading frame (ORF) and encoded a predicted protein with 779 amino acids. A polyclonal antibody against the purified recombinant *PbACO* was obtained in order to analyze the subcellular localization of the molecule in *P. brasiliensis*. The protein is present in the extracellular fluid, cell wall, mitochondria, cytosol and peroxisomes of yeast cells as demonstrated by western blot and immunocytochemistry analysis. The expression analysis of the *Pbaco* gene was performed through quantitative real time RT-PCR and results demonstrated increasing expression during differentiation from mycelium to yeast cells. Real time RT-PCR assays was also used to evaluate the *Pbaco* expression when the fungus grows on media with acetate and ethanol as sole carbon sources and in different iron levels. The results demonstrated that *Pbaco* transcript is over expressed in acetate and ethanol as sole carbon sources and in high-iron conditions.

# I- INTRODUÇÃO



## I. INTRODUÇÃO

### I.1 O fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo polimórfico, agente etiológico da micose sistêmica mais importante da América Latina, a paracoccidioidomicose (PCM) (SAN-BLAS *et al.*, 2002). *P. brasiliensis* foi isolado pela primeira vez por Adolpho Lutz em 1908, a partir de lesões nasofaríngeas de dois pacientes, apresentando-se como células leveduriformes. Lutz classificou o fungo no grupo dos blastomicetos, descreveu os sintomas da doença e os resultados obtidos com os tratamentos testados. Splendore, quatro anos depois, descreveu novos casos em pacientes da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, tendo descrito de forma atual do fungo foi instituída pelo professor Floriano Paulo de Almeida em 1930 (LACAZ *et al.*, 1991; RESTREPO, 2006).

Por compartilhar uma série de características com outros fungos dimórficos como *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum*, *P. brasiliensis* está classificado no reino Fungi, filo Ascomycota, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero *Paracoccidioides*, espécie *Paracoccidioides brasiliensis* (SAN-BLAS *et al.*, 2002). *P. brasiliensis* apresenta macro e microscopicamente um dimorfismo termo-dependente. As culturas mantidas à temperatura ambiente ou em incubadoras entre 20°C e 26°C apresentam-se, na fase miceliana, com colônias de aspecto cotonoso, micélio hialino, com hifas finas, septadas, com conídios terminais, sendo que alguns isolados produzem um pigmento castanho difuso. As culturas mantidas a 36°C apresentam colônias de aspecto cerebriforme e coloração bege, sob a forma de células leveduriformes, forma esta encontrada também quando se desenvolvendo em vida parasitária. As leveduras apresentam-se com morfologia característica: grandes células circundadas por várias células filhas periféricas (blastoconídios) que lembram um timão de barco (Figura 1) (BRUMMER *et al.*, 1993; FRANCO *et al.*, 1989).

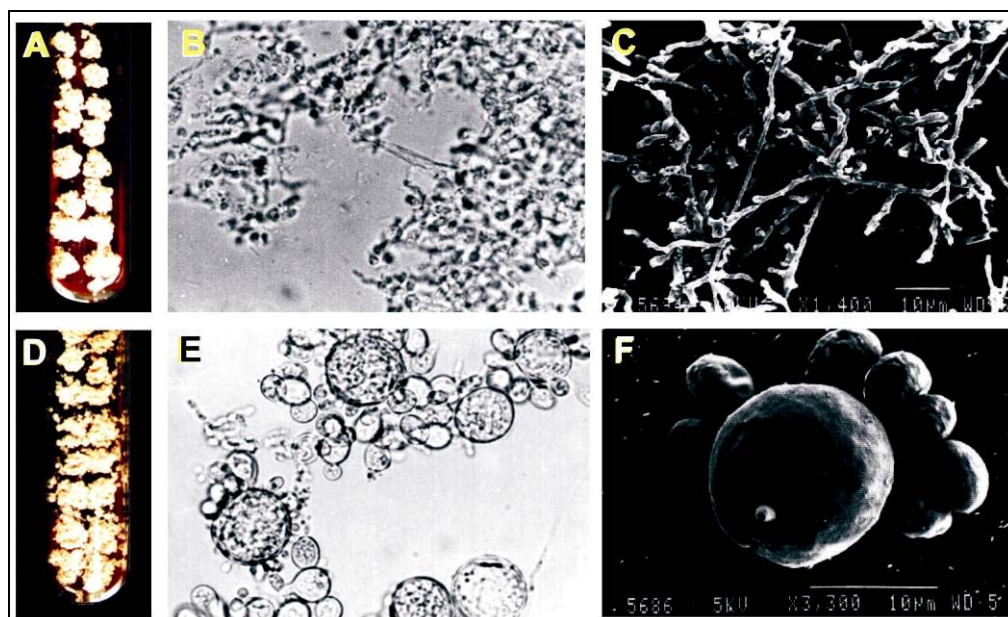


Figura 1. Aspectos morfológicos macro e microscópicos de *P. brasiliensis*.

A, B e C referem-se à forma miceliana enquanto D, E e F à forma leveduriforme respectivamente. Cultivado *in vitro* (A e D), ao microscópio óptico (B e E, ampliações de 1000X) e ao microscópio eletrônico de varredura (C e F, ampliações mostradas nas fotos) (BRITO, 1996).

*P. brasiliensis* raramente tem sido isolado do ambiente e continua sendo principalmente obtido a partir de pacientes com PCM ou, com menor frequência, de animais infectados. O fungo apresenta uma distribuição endêmica, restrita à América Latina (RESTREPO, A. *et al.*, 2005). Diferentemente do reconhecido *habitat* do *H. capsulatum*, ou seja, solo enriquecido com fezes de aves ou morcegos, e do *B. dermatitidis*, descrito como áreas úmidas com vegetais em decomposição às margens de cursos d'água, pouco se sabe em relação ao reservatório de *P. brasiliensis*, ou seja, o local na natureza em que o fungo está presente na forma saprobiótica e em número capaz de produzir infecção. Conti Díaz (2007) sugeriu que *P. brasiliensis* hipoteticamente existiria na natureza em ambientes de água doce, como rios e córregos com vegetação ribeirinha nativa, protegido por uma ou mais espécies de animais aquáticos heterotérmicos como anfíbios, moluscos, peixes e artrópodes. Entretanto, várias evidências apontam para o solo como o seu *habitat* mais provável (TERCARIOLI *et al.*, 2007). O fungo foi também isolado a partir de duas espécies de tatus: *Dasypus novemcinctus* e *Cabassou centralis*, que são considerados hospedeiros silvestres (CORREDOR *et al.*, 2005). Até o presente momento, 81 tatus foram estudados, e destes, 29 (35.8%) apresentaram o fungo nos estudos histopatológicos. Especula-se também sobre a infecção natural em outros animais silvestres, como o morcego e o pinguim (GARCIA *et al.*, 1993), de onde o fungo foi isolado a

partir das fezes, mas não foi encontrado nos tecidos. O fungo também foi isolado a partir de um cão doméstico, de vida estritamente urbana – uma fêmea da raça Dobermann, e as manifestações clínicas da doença foram relatadas. O diagnóstico baseou-se no exame histopatológico do gânglio excisado e na demonstração de formas leveduriformes de *P. brasiliensis* em meio a infiltrado inflamatório crônico granulomatoso (RICCI *et al.*, 2004). Richini-Pereira e colaboradores (2008) utilizando a técnica PCR-Nested detectaram amplificações específicas para *P. brasiliensis* em tecidos de 19 animais mortos em rodovias, a partir de DNA extraído de diversos tecidos de tatus e de porco da índia, pulmão e fígado de porco espinho e pulmão de furão. Estes dados sugerem que a presença de *P. brasiliensis* em animais de áreas endêmicas, é maior do que inicialmente descrita.

Na última década os avanços tecnológicos, particularmente aqueles relacionados à Biologia Molecular, têm contribuído significativamente para o conhecimento da biologia do fungo. Matute e colaboradores (2006) sugeriram em seu trabalho com marcadores de microssatélites a presença de espécies crípticas em *P. brasiliensis* que foram anotadas em três diferentes clados denominados S1, PS2, e PS3. Embora essas espécies tenham se apresentado isoladas geneticamente, elas foram capazes de induzir a infecção em humanos e animais, com uma menor virulência atribuída à espécie filogenética PS2. A espécie filogenética S1 foi distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela enquanto isolados da espécie filogenética PS2 foram encontrados no Brasil e na Venezuela. A espécie filogenética PS3 apresentou-se restrita à Colômbia. Objetivando elucidar as relações filogenéticas entre os isolados de *P. brasiliensis*, foi realizada a comparação de seqüências de regiões codantes, não codantes e Seqüências Transcritas Internamente (ITS – do inglês *Internally Transcribed Sequence*) de 7 novos isolados e 14 isolados já estudados de *P. brasiliensis* oriundos do Brasil, Colômbia e Venezuela. Vinte isolados se agruparam nos três grupos filogenéticos descritos anteriormente (S1, PS2 e PS3), com exceção do isolado Pb01 (objeto de nossos estudos) que se mostrou claramente separado dos outros, apresentando uma alta variabilidade genética podendo então se constituir em uma nova espécie no gênero *Paracoccidioides* (CARRERO *et al.*, 2008; THEODORO *et al.*, 2008). Teixeira e colaboradores (2009) apresentaram um clado com 17 isolados genotipicamente semelhantes, incluindo o isolado Pb01, que apresentou-se distinto dos clados S1, PS2 e P3 através do Método de Reconhecimento de Espécies Filogenéticas por Concordância Genealógica (GCPSR - do inglês *Genealogic Concordance Method of Phylogenetic Species Recognition*). Eles então denominaram este clado de *Pb01-like* (Semelhantes ao Pb01). Os isolados do clado *Pb01-like* mostraram ter compartilhado um ancestral comum com os demais clados há cerca de 32 milhões de anos atrás. Além disso, eles

apontaram o possível isolamento reprodutivo dos demais clados com o clado *Pb01-like* e sugeriram a descrição formal desse grupo como uma nova espécie: *Paracoccidioides lutzii*, homenageando Adolpho Lutz.

Através de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE – do inglês *Pulse Field Gel Electrophoresis*) Feitosa e colaboradores (2003) identificaram 4 ou 5 cromossomos com 2-10 Mpb estimando um genoma variando entre 23 a 31 Mpb para *P. brasiliensis*. O tamanho do genoma e a ploidia de *P. brasiliensis* foram ratificados através de citometria de fluxo (FCM, do inglês *Flux Cytometry*), (ALMEIDA *et al.*, 2007). O fungo apresenta um genoma entre 26,3 e 35,5 Mpb por célula de levedura mononucleada, de forma muito similar ao genoma da fase miceliana (conídeos) que se apresentou entre 30,2 e 30,9 Mpb. O tamanho estimado do genoma foi finalmente definido com maior precisão em 2008, quando o projeto denominado Iniciativa em Genoma de Fungos (FGI – do inglês *Fungal Genome Initiative*) desenvolvido por um consórcio internacional de instituições de pesquisa e liderado pelo *Broad Institute of MIT and Harvard* disponibilizou em seu banco de dados os genomas estruturais de três isolados de *P. brasiliensis*: Pb01 (32,94 Mpb e 9.132 genes preditos), Pb03 (29,06 Mpb e 7.875 genes preditos) e Pb18 (29,95 Mpb e 8.741 genes preditos) ([www.broad.harvard.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broad.harvard.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html)).

No estabelecimento da infecção por fungos patogênicos dimórficos, a diferenciação celular é considerada etapa essencial (NEMECEK *et al.*, 2006; SAN-BLAS *et al.*, 2002). O processo de diferenciação em células leveduriformes a partir da forma miceliana foi correlacionado com alterações na composição e estrutura da parede celular em *P. brasiliensis*. Durante a transição, o processo de remodelação da parede envolve a troca do polímero de  $\beta$ -1,3-glucana para  $\alpha$ -1,3-glucana (KANETSUNA *et al.*, 1969). O fungo apresenta o polissacarídeo quitina em maior proporção em leveduras que em micélio (KUROKAWA *et al.*, 1998; SAN-BLAS *et al.*, 1987).

Os transcriptomas de dois isolados de *P. brasiliensis* (BASTOS *et al.*, 2007; FELIPE *et al.*, 2005; GOLDMAN *et al.*, 2003) contribuíram para uma melhor compreensão da transição dimórfica, da estrutura filamentosa para uma estrutura globular, em nível molecular. Sob o ponto de vista metabólico a forma leveduriforme mostrou uma ativação da via do glioxalato, um aumento no nível de transcritos relacionados à biossíntese de componentes de membrana/parede celulares bem como de proteínas de transdução de sinal. Esses eventos foram considerados adaptativos para a fase parasítica levando-se em consideração as condições de micro-ambiente no hospedeiro.

As análises transcricionais em células leveduriformes de *P. brasiliensis* derivadas de fígado de camundongos infectados identificaram diversos genes potencialmente relacionados à interação do fungo com o hospedeiro (COSTA *et al.*, 2007). Através de análise comparativa com o transcriptoma do fungo cultivado *in vitro* (FELIPE *et al.*, 2005) foram identificados novos genes super expressos ampliando ainda mais o conhecimento sobre as adaptações metabólicas realizadas por *P. brasiliensis* durante a infecção. Genes que codificam para proteínas envolvidas na via glicolítica, na fermentação alcoólica, na síntese de ácidos graxos, no ciclo do glioxalato (CG) e no metabolismo de nitrogênio foram identificados como super expressos, sugerindo que, durante o processo infectivo, *P. brasiliensis* é capaz de utilizar várias fontes de carbono, incluindo glicose e substratos do CG, com um metabolismo predominantemente anaeróbico, com a produção de etanol e a ativação do CG, do metabolismo do nitrogênio e da biossíntese de lipídios.

## 1.2 A doença Paracoccidioidomicose

A PCM é uma micose sistêmica, enfermidade de alta prevalência e morbidade que acomete parcelas da população com menor capacidade de acesso aos serviços de saúde, em áreas limitadas somente a alguns países da América Latina (BRUMMER *et al.*, 1993). No Brasil ocorrem aproximadamente 200 mortes por ano em virtude da PCM e o país lidera o número de casos descritos com 80%, seguido por Colômbia e Venezuela (COUTINHO *et al.*, 2002). No Brasil as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste apresentam o maior número de registros (Figura 2) (PANIAGO *et al.*, 2003; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006). De acordo com os registros do Ministério da Saúde, de 1980 a 1995 ocorreram no Brasil 3.181 casos de óbito, o que totaliza uma taxa de mortalidade por PCM de 1,45 casos por milhão de habitantes. Esses dados apontam a PCM como a oitava causa de mortalidade por doença infecciosa predominantemente crônica entre as doenças infecciosas e parasitárias, maior ainda que a mortalidade por leishmanioses e a mais alta taxa entre as micoses sistêmicas. Desta forma, a doença representa um importante problema de saúde pública devido ao seu alto potencial incapacitante e à quantidade de mortes prematuras que provoca (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

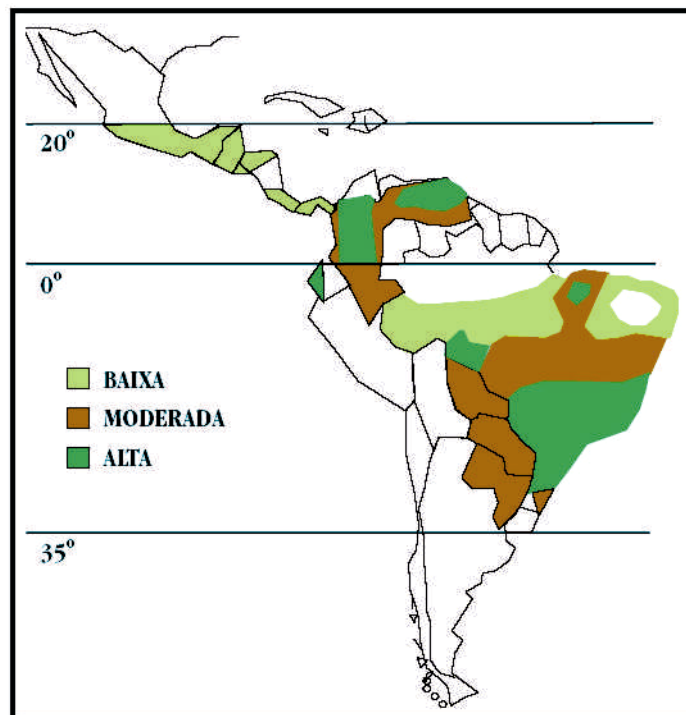


Figura 2 – Distribuição geográfica da PCM (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

A infecção se desenvolve primariamente nos pulmões pela inalação de propágulos do micélio e pode disseminar-se para vários órgãos e sistemas originando lesões secundárias nas mucosas, nos linfonodos, na pele e nas glândulas adrenais (SAN-BLAS *et al.*, 2002). A PCM foi também classificada em duas formas clínicas principais: a forma aguda ou juvenil e a forma crônica ou adulta. A forma juvenil acomete crianças e adultos jovens, progride rapidamente e é caracterizada pelo envolvimento marcante do sistema fagocitário mononuclear (fígado, baço, linfonodos e medula óssea). A forma adulta, mais freqüente em indivíduos do sexo masculino, com idade entre 30 e 50 anos, progride lentamente e pode levar meses ou anos até se estabelecer por completo. O trabalho com solo e plantações em área rural é fator ocupacional predisponente para a aquisição da PCM (FRANCO, 1987). A maior prevalência da doença em indivíduos do sexo masculino é justificada pela inibição da diferenciação de micélio para levedura, essencial para o estabelecimento da doença, pelo hormônio 17- $\beta$ -estradiol presente em mulheres em idade reprodutiva, uma vez que esta inibição foi demonstrada tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo* (ARISTIZABAL *et al.*, 1998; RESTREPO, A. *et al.*, 1984; SALAZAR *et al.*, 1988). Na Europa, nos Estados Unidos da América e na Ásia foram descritos alguns casos autóctones (AJELLO *et al.*, 1985; CHIKAMORI *et al.*, 1984; JOSEPH *et al.*, 1966). Foi descrito um longo período sem a manifestação de quaisquer sinais ou sintomas da doença, de 15,3 anos em média, no qual a PCM permanece em estado de latência, após o paciente ter contato com o parasito em área endêmica (BRUMMER *et al.*, 1993).

A PCM se apresenta sob o ponto de vista histopatológico, como uma infecção granulomatosa. A lesão granulomatosa deriva de reações de hipersensibilidade tardia contra antígenos do patógeno, visando a sua contenção. No granuloma vários tipos celulares são encontrados, entre eles os plasmócitos, eosinófilos e fibroblastos; entretanto o macrófago se apresenta como o tipo celular principal. Os macrófagos atuam liberando diversas substâncias potencialmente microbidas tais como o óxido nítrico, os radicais superóxido e o peróxido de hidrogênio (DE BRITO *et al.*, 1994; MOSCARDI-BACCHI *et al.*, 1994). *P. brasiliensis* é capaz de sobreviver e se multiplicar no interior de macrófagos não ativados (BRUMMER *et al.*, 1989).

## I.3 Aconitase

### I.3.1 Perspectiva histórica e generalidades

A enzima que catalisa a isomerização do ácido cítrico em ácido isocítrico foi descoberta por Martius & Kuoop (1937), pouco antes Krebs & Johnson (1937; KREBS *et al.*, 1980) terem postulado a via de oxidação do piruvato nos tecidos animais, por eles denominada ciclo do ácido cítrico e mais tarde ciclo de Krebs (CK). Apesar do nome recomendado “aconitato hidratase”, continua sendo usualmente denominada “aconitase” como pela primeira vez o fez Breusch em 1937, referindo-se ao aconitato formado como um produto intermediário e que normalmente não se dissocia da enzima durante o curso da reação (JOHNSON, 1939).

Por muitos anos os trabalhos com a aconitase se estagnaram devido a aparente instabilidade da enzima, que se apresentava como um grande empecilho para a maioria dos pesquisadores. Finalmente Morrison (1954) conseguiu purificar a enzima, a partir de extrato protéico derivado de coração de porco, preservando sua atividade catalítica pela adição do íon ferro reduzido e cisteína como agente redutor.

Ruzicka & Beinert (1978), trabalhando com aconitase purificada de coração de porco, anunciaram novas descobertas sobre a estrutura e o mecanismo de ação da enzima através de estudos com espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR- do inglês *Electron Paramagnetic Resonance*), o que representou um marco na construção do conhecimento sobre a aconitase. Deste ponto em diante, a aplicação de ferramentas espectroscópicas altamente discriminatórias conduziram a um rápido progresso (EMPTAGE *et al.*, 1983a; EMPTAGE *et al.*, 1983b), até a determinação de sua estrutura através da cristalização da proteína purificada seguida por difração de raios-x (ROBBINS *et al.*, 1989) e a ratificação da sua estrutura primária (ZHENG *et al.*, 1990).

O Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB - *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) posicionou a aconitase na classe das liases (Classe 4), onde são agrupadas todas as enzimas que catalisam a clivagem de ligações C-C, C-O, C-N, entre outras, através de hidrólise ou oxidação. Elas diferem das outras enzimas, pois têm dois substratos envolvidos em uma direção e apenas um na outra direção de reação. O comitê atribuiu à aconitase o número classificatório EC 4.2.1.3 e o nome sistemático “citrato [isocitrato] hidro-liase”. Alternativamente são também encontradas as denominações “aconitato hitratase” e “citrato hidro-liase”. A Figura 3 ilustra a reação de estereoisomerização do citrato para o isocitrato via cis-aconitato, catalisada pela aconitase.

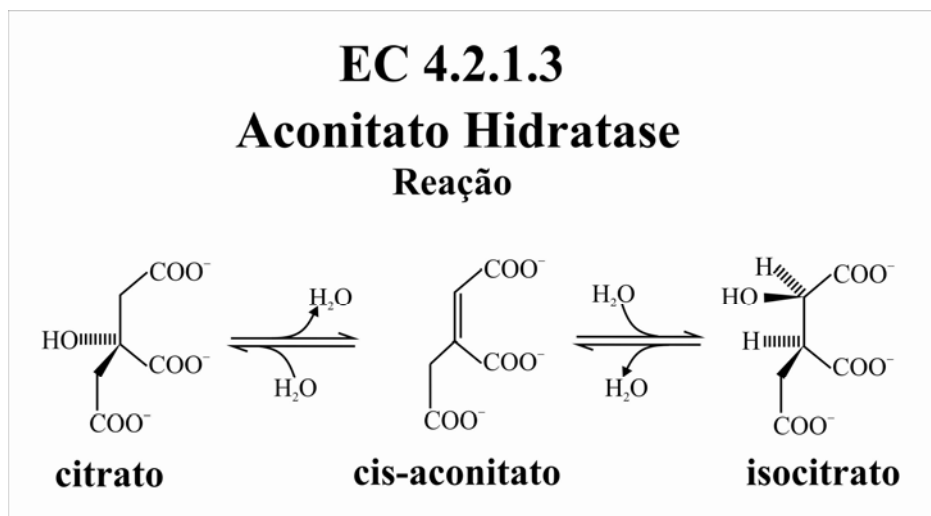


Figura 3. Reação catalisada pela aconitase. IUBMB 2003.

Adaptado de: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/misc/aconit.html>> Capturado em: 09/05/2009

### I.3.2 Aconitase: Uma proteína conjugada a um grupo ferro-enxofre

Em 1972 foi demonstrado que o ferro não é apenas requerido para a reação enzimática catalisada pela aconitase, mas que de fato ele é ligado àquela proteína. Naquela ocasião, porém foi relatado apenas um átomo de ferro por molécula (VILLAFRANCA).

A aconitase foi purificada de diferentes espécies de mamíferos, dos fungos *Candida lipolytica* e *Saccharomyces cerevisiae*, e a alta identidade em suas sequências de aminoácidos sugeria uma origem evolutiva comum. Em *S. cerevisiae* a aconitase é codificada por um gene nuclear e depois de traduzida é transportada para as mitocôndrias. Naquele organismo a enzima é composta de uma única cadeia polipeptídica com aproximadamente 80kDa. É uma proteína conjugada contendo um grupo prostético ferro-enxofre, que atua tanto na ligação do substrato no sítio ativo quanto na catálise da adição ou remoção de água (Figura 4). Na sua forma inativa o centro ferro-enxofre é um sistema Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>, enquanto que na forma ativa é um sistema Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> ligado covalentemente à proteína através de três resíduos de cisteína, sendo o quarto átomo de ferro fundamental na catálise (VILLAFRANCA, 1972). Estudos cristalográficos bem mais recentes com a aconitase de mitocôndrias extraídas do miocárdio de porco, revelaram a presença de três domínios estruturais empacotados em volta do grupo ferro-enxofre, e ainda um quarto domínio que é conectado por uma longa cadeia peptídica de forma a criar uma profunda fenda no sítio ativo (GRUER *et al.*, 1997).

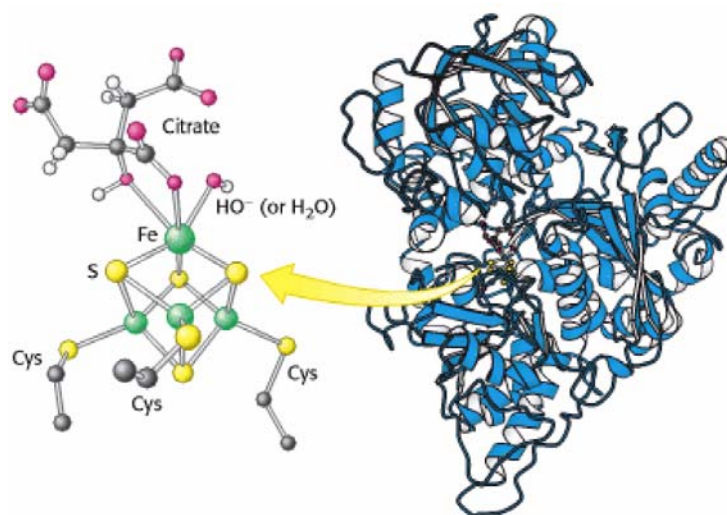


Figura 4. Ligação do Citrato ao complexo Ferro-Enxofre da Aconitase.  
Um dos átomos de ferro liga-se aos grupos carboxila e hidroxila do citrato.  
(BERG *et al.*, 2002)

### I.3.3 Aconitase enzima: funções metabólicas, reguladoras e localização celular

A glicose ocupa uma posição central no metabolismo de plantas, animais, e muitos microrganismos. A glicose pode ser polimerizada em compostos de elevada massa molecular, tais como amido ou glicogênio, permitindo o armazenamento celular de grandes quantidades de unidades de hexose, mantendo um nível de osmolaridade citosólica relativamente baixo. Quando as necessidades energéticas aumentam, a glicose pode ser liberada a partir desses polímeros intracelulares armazenados e utilizada para produzir ATP, quer por via anaeróbia ou aeróbia. A glicose é não só um excelente combustível, mas também um precursor notavelmente versátil, capaz de fornecer uma grande variedade de intermediários metabólicos para as vias biossintéticas. Nos animais e plantas vasculares a glicose pode seguir por três principais destinos: ela pode ser armazenada (como polissacarídeo ou sacarose); oxidada em um composto de três carbonos (piruvato) via glicólise, para fornecer ATP e intermediários metabólicos; ou oxidada através da via pentose fosfato para a síntese de ácidos nucleicos e NADPH (NELSON *et al.*, 2008). A enzima aconitase participa basicamente de dois processos metabólicos (Figura 5) que envolvem o catabolismo e o anabolismo da glicose, catalisando a conversão de citrato em isocitrato, no CK e no ciclo do glioxalato (CG), uma vez que a atividade extramitocondrial da mesma também foi relatada (VELOT *et al.*, 1999).

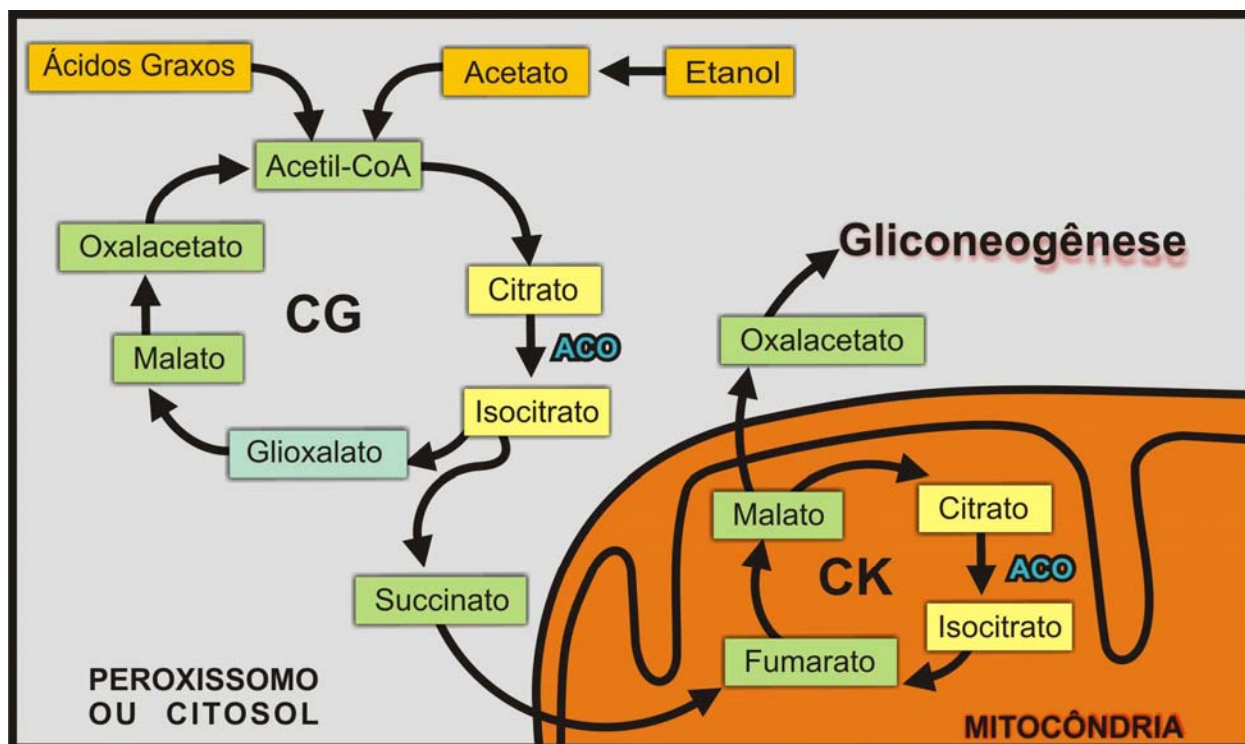


Figura 5. Aconitase (ACO) é uma enzima que catalisa a isomerização do citrato à isocitrato tanto no ciclo de Krebs (CK) quanto no ciclo do glioxalato (CG).

Adaptado de Alberts e colaboradores (2002).

Peroxisossomos são organelas citoplasmáticas presentes na maioria das células eucarióticas. Sua composição revela um elevado grau de plasticidade e os níveis de enzimas metabólicas podem variar muito entre os tipos celulares, estágios do desenvolvimento e as condições ambientais. Em células vegetais os peroxissomos estão envolvidos na conversão dos ácidos graxos, armazenados principalmente em sementes de plantas oleaginosas na forma de triglicerídios, em carboidratos através da beta-oxidação, gerando acetil-coenzima A que é assimilada pelo CG (MCCAMMON *et al.*, 1990).

O CG possibilita a síntese de unidades de ácidos dicarboxílicos com 4C a partir da acetil-CoA, um atalho em duas reações de descarboxilação quando comparado ao CK. Esses metabólitos intermediários com 4C podem ser usados na gliconeogênese e outras vias biossintéticas. O CG pode também utilizar compostos com 2C provenientes do acetato e do etanol bem como dos ácidos graxos (VELOT *et al.*, 1999).

A localização precisa da aconitase quando desempenha sua função no CG ainda permanece incógnita. Pistelli e colaboradores (1995), trabalhando com peroxissomos isolados de cotilédones senescentes de abóbora, verificaram que naquela organela não há produção de ácido cítrico enquanto o ácido isocítrico é convertido à malato pela ação das enzimas isocitrato liase (ICL, EC 4.1.3.1) e malato sintase (MLS, EC 2.3.3.9). A localização citosólica para a

aconitase foi proposta uma vez que sua atividade não foi encontrada em frações celulares de peroxissomos. A ausência de aconitase nos peroxissomos implica em um fluxo de ácidos orgânicos através da membrana dos peroxissomos, quando o CG é ativo. Alternativamente foi sugerido que a enzima não pode ser detectada, mesmo quando possivelmente se encontra ativa no interior dos peroxissomos, ou por apresentar-se em baixas concentrações ou ainda por ter sido inativada durante os processos de isolamento da organela.

Piekarska e colaboradores (2008) revisaram a atividade do CG em fungos e descreveram que ele é constituído por cinco enzimas, das quais duas são exclusivas para o ciclo, ou seja, ICL e MLS, enquanto as outras enzimas, citrato sintase (EC 2.3.3.1), aconitase (EC 4.2.1.3) e malato desidrogenase (EC 1.1.1.37), são partilhadas com o CK e muitas vezes são realizadas por isoenzimas. No genoma de *Candida albicans* os genes que codificam para *Icl*, *Mls* e citrato sintase existem em cópia única, enquanto existem três genes codificantes da malato desidrogenase e dois para aconitase. ICL e MLS são muitas vezes compartimentadas em peroxissomos; as outras etapas enzimáticas parecem ser extra-peroxissomais (quer citosólica ou mitocondrial). *Saccharomyces cerevisiae* parece ser uma exceção a esta regra: ICL é uma enzima citosólica e MLS está localizada quer no peroxissomo ou no citosol dependendo das condições de crescimento do microrganismo (MCCAMMON *et al.*, 1990). Estudos com mutantes de *S. cerevisiae* que não apresentam peroxissomos funcionais mostraram que os mesmos podem crescer em meio com etanol e acetato como única fonte de carbono. Esses dados em conjunto sugerem que, pelo menos em *S. cerevisiae*, o CG pode funcionar no citosol (KUNZE *et al.*, 2002).

O fenômeno da dupla localização de proteínas em células eucarióticas tem se apresentado mais abundante do que previamente relatado. Porém, a completa compreensão dos diversos mecanismos que determinam esta dupla localização de produtos simples de tradução permanece longe de ser alcançada (KARNIELY, 2005). Aconitase e fumarase são produtos de tradução única, e estão distribuídas entre o citosol e a mitocôndria em padrões extremamente diferentes. Mais de 50% das moléculas de fumarase estão localizadas no citosol (SASS *et al.*, 2001) enquanto a quantidade citosólica da aconitase é bem menor, dificilmente verificada através dos métodos diretos de detecção, uma situação que tem sido denominada “distribuição eclipsada” (SHLEVIN *et al.*, 2007). Ambas as enzimas apresentam uma sequência de endereçamento para mitocôndria na extremidade amino-terminal (MTS), que depois da translocação é clivada por uma peptidase mitocondrial de processamento. Somente após a clivagem do MTS na matriz mitocondrial é que uma subpopulação de moléculas sofre translocação retrógrada para o citosol. Isto resulta em uma dupla localização de proteínas

identicamente transformadas em dois locais distintos: mitocôndria e citosol. Mutantes de *S. cerevisiae* foram desenvolvidos, nos quais os MTS de aconitase e fumarase foram trocados entre si. A distribuição de ambas as proteínas foi afetada, um fato particularmente evidente para aconitase que exibiu uma alta quantidade de proteína processada no citosol. Desta forma ficou demonstrado que o MTS pode desempenhar um papel adicional: além de endereçar a proteína ele pode determinar o nível de movimento retrógrado das proteínas para o citosol (REGEV-RUDZKI *et al.*, 2009).

Diversas proteínas homólogas foram descritas como constituintes da família aconitase. Em eucariotos foram descritas duas isoenzimas da aconitase, cataliticamente ativas na isomerização do citrato a isocitrato, provavelmente localizadas em apenas dois compartimentos, na matriz mitocondrial e no citoplasma. A família aconitase ainda contém uma variedade de proteínas que incluem: as proteínas reguladoras de ferro (IRPs – do inglês *Iron Regulatory Proteins*); a isopropilmalato isomerase, uma enzima que catalisa o segundo passo na biossíntese da leucina; e a homoaconitase, que atua na via biossintética da lisina (GRUER *et al.*, 1997). Pitula e colaboradores (2004) propuseram três famílias de aconitases: a família aconitase B de procariotos (*acnB*), a família aconitase mitocondrial de eucariotos (*m-acon*) e a família aconitase A / proteínas reguladoras de ferro encontrada em procariotos e eucariotos (*acnA*/IRP). Em mamíferos há distintas aconitases mitocondriais e citoplasmáticas, membros das duas últimas famílias de genes anteriormente descritas.

A existência de diferentes funções das aconitases foi objeto de estudo em *Escherichia coli*, onde a *acnB* é preferencialmente expressa durante a fase de crescimento logarítmico enquanto a *acnA* é induzida durante a fase estacionária ou em resposta ao estresse oxidativo. Nos ensaios *in vivo* *acnA* mostrou-se resistente ao estresse oxidativo enquanto *acnB* mostrou-se altamente sensível a uma variedade de substâncias químicas oxidantes. Assim, a indução de *acoA* em condições de estresse oxidativo representaria um importante mecanismo para contornar um possível bloqueio no CK (VARGHESE *et al.*, 2003).

No contexto de suas múltiplas funções metabólicas a proteína aconitase foi analisada como uma enzima reguladora do CK em *Corynebacterium glutamicum* (KRUG *et al.*, 2005). Por ser constitutivamente secretora de L-glutamato esta bactéria apresenta um interessante potencial biotecnológico, o que é reforçado pelo seu emergente papel como um microrganismo modelo para a subordem dos actinomicetos *Corynebacterineae*, que inclui também o gênero *Mycobacterium*. O CK é de importância central para o metabolismo de *C. glutamicum* por fornecer energia e precursores biossintéticos. Quando este microrganismo utiliza como fonte de carbono propionato, citrato ou acetato a atividade da enzima aconitase apresenta-se até 4

vezes maior do que quando na presença de glicose, tendo sido demonstrada que esta variação resulta de regulação em nível transcricional. Em *C. glutamicum* imediatamente a jusante do gene da aconitase se encontra um gene codificante para um suposto regulador transcricional da aconitase (*acnR*). Em ensaios de supressão do gene *acnR* foi detectado um aumento da ordem de 5 vezes, tanto no nível de mRNA quanto no nível da atividade enzimática da aconitase, sugerindo que a proteína funciona como repressor transcricional da aconitase, presumivelmente por interferir com a ligação da RNA polimerase. Uma vez que as atividades da citrato sintase e da isocitrato desidrogenase foram previamente descritas como não aumentadas durante o crescimento em acetato, esses dados parecem indicar que a aconitase é um importante ponto de controle do CK em *C. glutamicum*.

O trabalho de Chen e colaboradores (2005), usando abordagens proteômicas com *S. cerevisiae*, mostrou que a aconitase está associada aos nucleóides das mitocôndrias, que são complexos de proteínas com o DNA mitocondrial (mtDNA). Neste novo contexto, a aconitase participaria na estabilização do mtDNA, talvez por remodelar reversivelmente os nucleóides e consequentemente influenciar na expressão de genes mitocondriais diretamente relacionados ao metabolismo celular. Anteriormente Kaufman e colaboradores (2000), em seus trabalhos com *S. cerevisiae*, purificaram nucleóides de mitocôndrias e analisaram as proteínas a eles associadas, objetivando a identificação de moléculas envolvidas em aspectos importantes na regulação do genoma mitocondrial. Foram identificadas 22 proteínas associadas aos nucleóides mitocondriais sendo que 12 destas proteínas aparentemente não eram relacionadas ao metabolismo do mtDNA, e na realidade eram enzimas bem conhecidas do metabolismo energético, entre elas a aconitase. Entretanto, um dos resultados mais interessantes apresentados no trabalho de Wang & Bogenhagen (2006) foi a aparente ausência da aconitase em nucleóides do mtDNA humano. Eles discutem o achado inferindo que este papel secundário da aconitase pode refletir pressões seletivas mais importantes para *S. cerevisiae* do que para células de mamíferos.

### I.3.4 Aconitase: a regulação dos níveis de ferro intracelular e o estresse oxidativo

O ferro é um elemento essencial para a maioria das formas de vida, mas também pode ser tóxico quando se apresenta em elevados níveis celulares. Sistemas regulatórios muito elaborados evoluíram a fim de manter as concentrações deste metal em níveis suficientemente seguros. Em metazoários, os principais controladores do transporte e armazenamento de ferro são duas IRPs denominadas IRP1 e IRP2 (VOLZ, 2008).

Patógenos intracelulares incluindo bactérias, parasitas e vírus envidam esforços tanto para enfrentar os desafios oxidativos iniciais nos macrófagos dos hospedeiros quanto para fazer seus próprios nichos, onde a aquisição de ferro constitui um evento crucial para a sobrevivência e crescimento intracelular (SCHAIBLE *et al.*, 2004). Na corrente sanguínea de mamíferos o ferro é transportado pela proteína transferrina (Tf). As células de todos os tecidos de mamíferos são capazes de importar o ferro circulante ligado à Tf através de um receptor de transferrina (TfR) (FRAZER *et al.*, 2003). Tf ao se ligar ao TfR nas membranas celulares, forma um complexo Tf-TfR, o qual é internalizado através de endocitose, mediada pela formação de uma vesícula endossomal. A acidificação da vesícula endocitada, pela ação de uma bomba de prótons, promove a liberação do ferro no citoplasma, através de uma mudança conformacional no complexo Tf-TfR. Uma vez no citoplasma, o ferro é incorporado à proteína ferritina, forma na qual ele é armazenado (HENTZE *et al.*, 2004).

Além de seu papel no CK e no CG, a aconitase funciona como uma proteína reguladora de ferro, por controlar expressão de ferritina e do receptor de transferrina em células de mamíferos (Figura 6). Este eficiente mecanismo de regulação da tradução dos mRNAs de ferritina e de receptor de transferrina envolve a participação de sequências de nucleotídeos não traduzíveis (UTR – do inglês *Untranslated Region*) situadas nas extremidades 5' ou 3' dos seus respectivos mRNAs, que pareiam entre si, formando uma estrutura secundária em forma de grampo na molécula do ribonucleotídeo, denominadas de elementos responsivos ao ferro (IRE, do inglês *Iron Responsive Element*). Os IREs, quando localizados na extremidade 5' do RNA, impedem estericamente a tradução e quando presentes na extremidade 3', promovem a estabilidade das moléculas de mRNA, tornando-as mais resistentes à degradação por nucleases e permitindo a síntese das proteínas (NARAHARI *et al.*, 2000). Outras IRPs foram relatadas, e todas elas são proteínas ligantes ao RNA que fixam-se aos IREs com alta afinidade (EISENSTEIN, 2000).

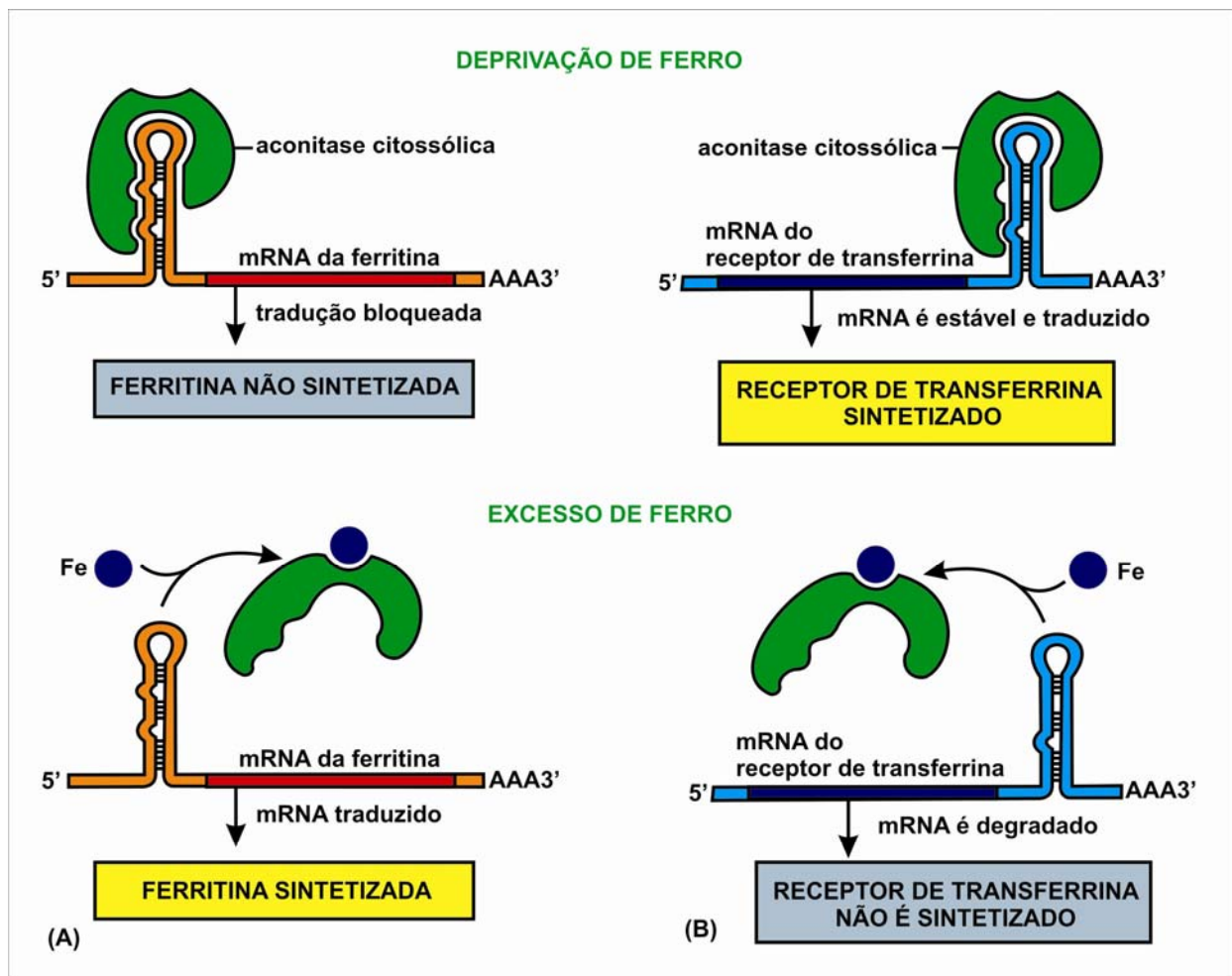


**Figura 6. Controles pós-transcricionais da síntese de ferritina e de receptor de transferrina.**

Em resposta a um aumento na concentração de ferro no citosol, a célula aumenta a síntese de ferritina, a fim de capturar o ferro extra (A) e diminui a síntese de receptores de transferrina, a fim de importar menos de ferro através da membrana plasmática (B). O controle pós-transcricional é mediado pela aconitase, capaz de reconhecer e se ligar às estruturas secundárias em forma de grampo nos mRNAs codificantes para ferritina e para receptores de transferrina. Ligando-se ao ferro, a aconitase sofre uma mudança conformacional e se dissocia do mRNA, permitindo a tradução da ferritina (A) e inibindo a síntese do receptor de transferrina (B) por expor o mRNA à ação de nucleases.

Adaptado de **Alberts e colaboradores, (2002).**

Walden e colaboradores (2006) descreveram detalhes sobre a mudança conformacional na aconitase citossólica em coelho. As diferenças estruturais entre IRP1, quando a proteína se apresenta complexada ao IRE do mRNA de ferritina, e a aconitase citossólica são maiores do que as anteriormente previstas a partir das estruturas estudadas da aconitase. Embora na

maioria das aconitases os domínios 1 e 2 formem um único núcleo conservado em IRP1 existem extensas alterações nos domínios 3 e 4. A molécula IRP1 adota uma forma de L no complexo com o IRE do mRNA de ferritina, com os domínios estruturais 3 e 4 dispostos perpendicularmente a partir de um núcleo central composto dos domínios 1 e 2. Estas alterações podem ser descritas como uma torção de um corpo rígido em relação ao núcleo (Figura 7). O domínio 4 gira em 32° e roda em 14Å. Isso elimina todas as interações entre os domínios 3 e 4 que estão presentes na aconitase citosólica. Em vez disso, a maioria destas superfícies são incorporadas nos dois sítios distintos de ligação ao IRE do mRNA.

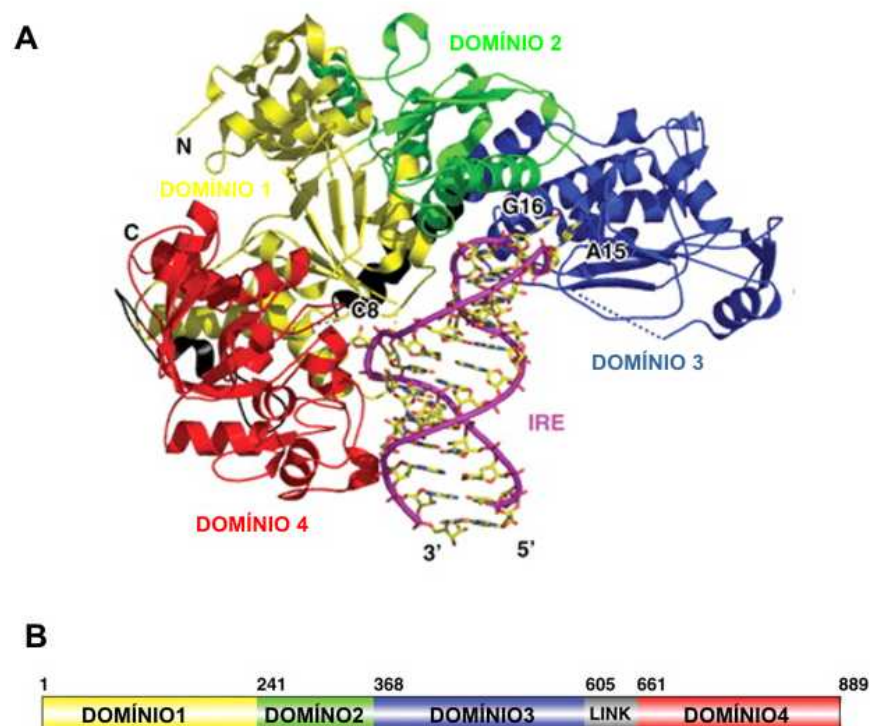


**Figura 7. Estrutura da IRP1 complexada ao IRE-RNA.**

(A) Diagrama do complexo IRP1:IRE-RNA mostrando no núcleo central os domínios 1 (amarelo) e 2 (verde), o domínio 3 (azul), linker (preto), e o domínio 4 (vermelho). O IRE-RNA é mostrado em roxo e amarelo.

(B) Esquema dos domínios da IRP1.

Os números representam aminoácidos das fronteiras nos domínios.

Adaptado de Walden e colaboradores (2006).

Em *E. coli*, duas aconitases denominadas AcnA e AcnB foram identificadas e a existência de uma terceira aconitase (AcnC) foi sugerida a partir dos experimentos com um

duplo mutante *acnAB* que ainda mostrou uma atividade residual de aconitase de 5% quando comparada ao tipo selvagem. O alinhamento das sequências mostraram que AcnA é 53% idêntica à IRP1 humana e 27.29% idêntica à aconitases mitocondriais, enquanto AcnB é apenas 15.17% idêntica à AcnA, IRPs e aconitases mitocondriais (TANG *et al.*, 1999).

Combinando eletroforese bidimensional de proteínas, espectrometria de massas e análises computacionais, Wong e colaboradores (1999), trabalhando com *Mycobacterium tuberculosis* cultivado em meio contendo diferentes concentrações de ferro, destacaram a aconitase entre dez proteínas que apresentaram um aumento do nível de expressão sob condições de altas concentrações de ferro, no contexto em que esse elemento inorgânico desempenha um papel crítico na fisiopatologia da tuberculose. Barluzzi e colaboradores (2002) demonstraram que excesso de ferro promove a exacerbação de meningite em um modelo animal de infecção cerebral por *Cryptococcus neoformans*. Há indícios que durante a infecção o ferro livre em tecidos e fluidos do hospedeiro vertebrado é mantido a níveis extremamente baixos. Assim, a aquisição deste micronutriente representa, no contexto do processo adaptativo, um importante fator de virulência. A influência da privação de ferro na expressão de proteínas ferro-enxofre tem sido documentada em vários outros sistemas e pode representar uma resposta conservada (EISENSTEIN, 2000; KILEY *et al.*, 2003). Lian e colaboradores (2005) em seu estudo sobre a influência da concentração de ferro avaliando o transcriptoma de *C. neoformans*, identificaram e quantificaram transcritos, através da técnica de Análise Serial de Expressão Gênica (SAGE – do inglês *Serial Analysis of Gene Expression*). Entre eles, etiquetas de sequências expressas (ESTs – do inglês *Expressed Sequence Tags*) de três genes codificantes para enzimas do CK, incluindo a proteína ferro-enxofre aconitase, além das proteínas desidrogenase succínica e malato desidrogenase, se mostraram hiperexpressas na condição de alta concentração de ferro. Foram identificados quatro genes que potencialmente codificam para a aconitase, embora apenas um deles tenha se mostrado hiperexpresso em condições de altos níveis de ferro.

Nos processos infecciosos, entre os intrincados mecanismos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, a resposta eficiente do patógeno contra o ataque oxidativo imposto pelas células fagocitárias do hospedeiro tem se mostrado essencial à sua sobrevivência. A aconitase foi também identificada como alvo para Intermediários Reativos do Nitrogênio (RNI), apontando para sua possível participação nos mecanismos de resistência ao estresse oxidativo e nitrosativo, fundamentais para a sobrevivência de patógenos fúngicos no hospedeiro, notadamente quando fagocitados por macrófagos e neutrófilos nos momentos iniciais da resposta imune inata após a infecção (MISSALL *et al.*, 2004).

Os macrófagos comumente sequestram o ferro em resposta à maioria dos agentes patogênicos a fim de evitar a infecção. O protozoário parasita *Leishmania donovani* parece utilizar uma nova estratégia para manipular os mecanismos de captação de ferro do hospedeiro e utiliza a retomada de ferro intracelular para o seu crescimento. Para isso, *L. donovani* intracelular sequestra o ferro diretamente da lábil coleção de ferro (LIP do inglês *Labile Iron Pool*) do macrófago, fazendo com que IRP1 e IRP2 sejam ativadas. As IRPs então interagem com IREs do receptor de transferrina (TfR1) aumentando a absorção de ferro pelo hospedeiro, suprindo este nutriente ao parasita (DAS *et al.*, 2009).

#### I.4 Aconitase de *P. brasiliensis*

Décadas antes da genômica e proteômica, através de experimentos clássicos de bioquímica, Kanetsuna & Carbonell (1966) observaram a atividade aumentada da aconitase, além de várias outras enzimas do CK, na forma leveduriforme quando comparada com a forma miceliana em *P. brasiliensis*. A aconitase de *P. brasiliensis* ainda não foi objeto de estudo isolado, e a inexistência de informações sobre seu papel na biologia do fungo foi o fato que motivou esse trabalho. O Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis*, desenvolvido por um consórcio de laboratórios da região Centro-Oeste do Brasil, resultou no seqüenciamento de 25.511 ESTs derivadas de bibliotecas de cDNA de levedura e micélio, abrangendo aproximadamente 80% do número total de genes estimados para este fungo (FELIPE *et al.*, 2005; FELIPE *et al.*, 2003). O trabalho possibilitou a detecção de genes diferencialmente expressos nas fases de *P. brasiliensis*. Foram enumerados genes que codificam para enzimas do CG em *P. brasiliensis*, uma vez que sua atividade tem sido informada como uma exigência de virulência fúngica em *C. albicans*, *C. neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. O perfil metabólico diferencialmente exibido por *P. brasiliensis* nas formas miceliana e leveduriforme foi então reportado.

A fase miceliana apresenta preferencialmente um metabolismo aeróbio, uma vez que genes que codificam enzimas da fosforilação oxidativa, como a isocitrato desidrogenase e succinil coenzima A sintase, se mostraram superexpressos. Por outro lado, a fase leveduriforme apresenta preferencialmente metabolismo anaeróbio. Nesta fase, os altos níveis de expressão da enzima álcool desidrogenase sugerem o favorecimento da fermentação alcoólica e consequente produção de etanol (FELIPE *et al.*, 2005).

A presumida capacidade do patógeno se desenvolver em parcial anaerobiose continuou sendo estudada. Várias enzimas das vias que provêem substratos durante o CG são hiperreguladas nas células leveduriformes, como a ICL e a MLS o que capacitaria o patógeno a utilizar fontes com dois átomos de carbono, na forma de acetato e etanol através do CG (FELIPE *et al.*, 2005). Este fenômeno também foi descrito para *C. albicans* durante sua fase intracelular, onde se acredita que as enzimas ICL e MLS exerçam uma função na mudança do metabolismo energético com a ativação do CG (LORENZ *et al.*, 2001). As enzimas citrato sintase, ACO, ICL e malato desidrogenase foram identificadas na biblioteca de cDNA obtida a partir de RNA de *P. brasiliensis* durante a diferenciação dimórfica de micélio para levedura, indicando que o CG também é funcional durante esse processo (BASTOS *et al.*, 2007).

Costa e colaboradores (2007), em seus estudos abordando o transcriptoma de *P. brasiliensis* de células leveduriformes derivadas de tecidos de camundongos infectados, mostraram que os transcritos envolvidos no metabolismo de carboidratos apresentaram níveis significativamente aumentados. Os dados encontrados sugerem que na infecção hepática as formas leveduriformes de *P. brasiliensis* exacerbam seu metabolismo anaeróbico, quando comparadas com as células leveduriformes cultivadas *in vitro*. O etanol pode se tornar uma fonte importante de carbono através do CG. Foi demonstrado que a enzima isocitrato liase é super expressa no fungo derivado de tecido infectado, o que sugere que compostos não fermentáveis são importantes para a produção de energia durante a infecção.

O ferro é elemento essencial para o crescimento de microrganismos e sua limitação é um dos mecanismos usados por macrófagos para controlar a multiplicação microbiana. A participação do ferro no mecanismo fungicida mediado pelo óxido nítrico (NO) na sua interação com os conídios do fungo *P. brasiliensis* foi estudada por Gonzalez e colaboradores (2007). A conversão de conídio-à-levedura foi inibida na ausência do ferro. Os autores sugerem que a reação do NO com ferro celular ou centros de ferro-enxofre pode resultar na inativação de enzimas essenciais, incluindo a aconitase, NADPH desidrogenase mitocondrial, succinato desidrogenase, ribonucleotídeo redutase e ubiquinona redutase.

## II- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS



## II.1 JUSTIFICATIVA

*P. brasiliensis* é o agente causador da PCM, a micose sistêmica mais prevalente na América Latina, com o maior número de relatos de casos no Brasil. Devido à sua alta prevalência e por interferir severamente com a qualidade de vida dos pacientes, a PCM é considerada um importante problema de saúde pública.

A aconitase foi inicialmente descrita como a enzima responsável pela catálise da isomerização do ácido cítrico em ácido isocítrico no ciclo de Krebs, que resulta na biossíntese de moléculas produtoras de energia e de precursores metabólicos essenciais no anabolismo de aminoácidos, ácidos graxos e carboidratos. Posteriormente a enzima foi relacionada ao ciclo do Glioxalato, uma via alternativa para o ciclo de Krebs capaz de fornecer os precursores para a gliconeogênese. Têm sido relatadas outras importantes funções para a aconitase não relacionadas ao metabolismo energético, entre elas o controle dos níveis de ferro intracelular, através de mecanismos de regulação pós-transcricional e a participação nos mecanismos de resistência ao estresse oxidativo e nitrosativo.

Em patógenos têm sido relatadas funções diversas para a aconitase, entre elas a participação no processo de mudança do metabolismo energético em resposta à anaerobiose com a ativação do ciclo do Glioxalato, nas adaptações frente ao estresse oxidativo, e na regulação dos níveis de ferro intracelular, sendo todas essas novas funções relacionadas com a exibição de fenótipo patogênico. A aconitase do fungo *P. brasiliensis* ainda não foi objeto de estudos. Devido à amplitude de possíveis funções da aconitase em *P. brasiliensis* a caracterização desta proteína foi apresentada no presente trabalho.

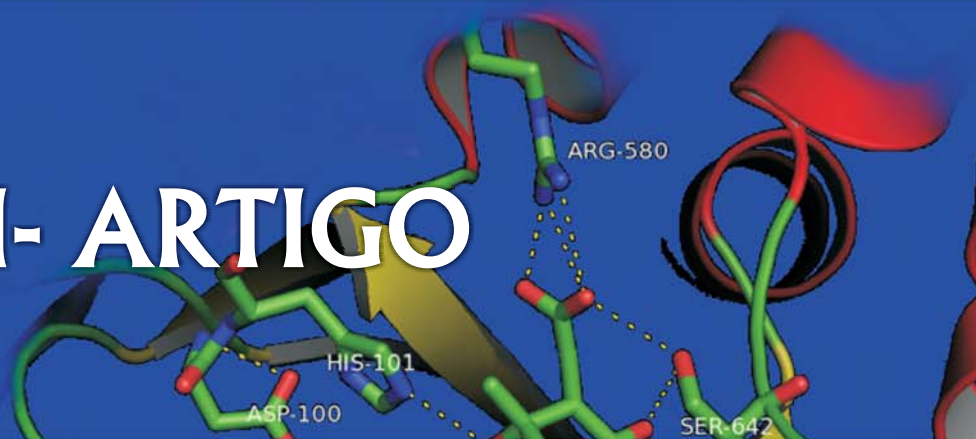
## II.2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral a caracterização estrutural e funcional da aconitase de *P. brasiliensis*.

Enumeramos a seguir os objetivos específicos e as estratégias utilizadas.

1.       ▶ Rastreamento e identificação *in silico* da aconitase de *P. brasiliensis* (*PbACO*) em bancos de dados.
2.       ▶ Obtenção da sequência completa do cDNA codificante para a enzima aconitase do fungo *P. brasiliensis*.
3.       ▶ Caracterização do gene completo que codifica a *PbACO*.
4.       ▶ Avaliar os níveis de transcritos de *PbACO* em diferentes condições.
5.       ▶ Clonagem e expressão heteróloga de fragmento representativo do cDNA e purificação de um fragmento polipeptídico recombinante da *PbACO* contendo epitopos antigênicos.
6.       ▶ Estudar a expressão da proteína *PbACO* em diferentes condições de cultivo.
7.       ▶ Determinar a localização celular da proteína *PbACO*.

# III- ARTIGO



1. COX5A-2 (PDB ID: 1COX)  
2. COX5A-2 (PDB ID: 1COX)  
3. COX5A-2 (PDB ID: 1COX)  
4. COX5A-2 (PDB ID: 1COX)  
5. COX5A-2 (PDB ID: 1COX)  
6. COX5A-2 (PDB ID: 1COX)  
7. COX5A-2 (PDB ID: 1COX)  
8. COX5A-2 (PDB ID: 1COX)  
9. COX5A-2 (PDB ID: 1COX)  
10. COX5A-2 (PDB ID: 1COX)

# Identification, Characterization and Regulation Studies of the Mitochondrial Aconitase of *Paracoccidioides brasiliensis*

Wesley de Almeida Brito<sup>1, 2</sup>, Tereza Cristina Vieira Rezende<sup>1</sup>, Ana Flavia Parente<sup>1</sup>, Carlos André Ornelas Ricart<sup>3</sup>, Marcelo Valle de Sousa<sup>3</sup>, Sônia Nair Bão<sup>3</sup> and Célia Maria de Almeida Soares<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 74.001-970, Goiânia, Goiás, Brazil; <sup>2</sup>Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Goiás, 75.132-400, Anápolis, Goiás, Brazil; <sup>3</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brazil.

## Abstract

A protein species preferentially expressed in yeast cells with a molecular mass of 80 kDa and isoelectric point (pI) of 7.79 was isolated from the proteome of *P. brasiliensis* and characterized as an aconitase (E.C. 4.2.1.3). Aconitase is an enzyme that catalyzes the isomerization of citrate to isocitrate in both the Krebs cycle (KC) and the glyoxylate cycle (GC). We report the cloning and characterization of the cDNA encoding the aconitase of *P. brasiliensis* (*PbACO*). The cDNA showed a 2337 bp open reading frame (ORF) and encoded a predicted protein with 779 amino acids. A polyclonal antibody against the purified recombinant *PbACO* was obtained in order to analyze the subcellular localization of the molecule in *P. brasiliensis*. The protein is present in the extracellular fluid, cell wall enriched fraction, membrane enriched fraction, mitochondria, cytosol and peroxisomes of yeast cells as demonstrated by western blot and immunocytochemistry analysis. The expression analysis of the *Pbaco* gene was performed through quantitative real time RT-PCR and results demonstrated an increasing expression during differentiation from mycelium to yeast cells. Real time RT-PCR assays was also used to evaluate the *Pbaco* expression when the fungus grows on media with acetate and ethanol as sole carbon sources and in different iron levels. The results demonstrated that *Pbaco* transcript is over expressed in acetate and ethanol as sole carbon sources and in high-iron conditions.

**Keywords:** *Paracoccidioides brasiliensis*, Aconitase, Recombinant protein, Mass spectrometry, Cellular localization, Carbon sources.

## Introduction

*Paracoccidioides brasiliensis* is the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM), the most prevalent systemic mycosis in Latin America, with the mostly of reported cases in Brazil. Due its high prevalence and severe interference in the patient's quality of life, PCM is considered an important public health problem. This fungus is found as mycelia (M) at 22 °C or in the environment and as yeast (Y) at 37 °C and in host tissues. On both *in vitro* experiments and in the establishment of infection the dimorphic transition from the mycelia to the yeast cells occurs by the temperature shifting involving the differential expression of several genes (Restrepo, 2006).

An increased expression of aconitase and several other enzymes was early described in yeast cells when compared to the mycelia phase of *P. brasiliensis* (Kanetsuna and Carbonell, 1966). The aconitase (ACO - EC 4.2.1.3 - citrate [isocitrate] hydro-lyase) was initially described as the enzyme that plays role in the second step of Krebs cycle (KC), catalyzing the citric acid to isocitric acid conversion, which results in molecules that produces energy and essential precursors for amino acids, fatty acids and carbohydrates anabolism. The ACO of *Saccharomyces cerevisiae* was one of the best characterized. The core of the enzyme is composed of a single polypeptide chain of approximately 80 kDa. It is a conjugate protein containing an iron-sulfur prosthetic group, which acts in both, substrate binding to active site and in catalysis. In its inactive form the iron-sulfur center is a Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub> system while the active form is a Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> system covalently bound to the protein by three cysteine residues. The fourth iron play role in catalysis (Villafranca and Mildvan, 1972). ACO also catalyses the conversion of citrate to isocitrate in glyoxylate cycle (GC) and also an extramithochondrial activity was reported for this enzyme (Velot, et al., 1999). The precise localization of ACO when it carries out its function in the GC still remains unknown. Studies with *S. cerevisiae*

mutants lacking functional peroxisomes showed that cells can grow with ethanol and acetate as the sole carbon sources. These data suggest that, at least in *S. cerevisiae*, the GC can work in the cytosol (Kunze, et al., 2002).

Several homologous proteins have been described as constituents of the ACO family. In eukaryotes it was described two ACO isozymes, catalytically active in isomerization of citrate to isocitrate, probably located in two compartments, the mitochondrial matrix and cytoplasm. The ACO family also contains a variety of proteins that comprise the iron regulatory proteins (IRPs), the isopropylmalate isomerase, an enzyme that catalyzes the second step in leucine biosynthesis, and homoaconitase, which acts on the biosynthetic lysine path (Gruer, et al., 1997).

In addition to its role in the KC and GC, the ACO functions as an iron regulatory protein (IRP) by controlling the expression of ferritin and transferrin receptor in mammalian cells. This efficient mechanism involves the participation of untranslated nucleotide sequences (UTRs) forming a secondary structure called iron responsive elements (IRE), at the 5' or 3' ends of ferritin and transferrin receptor mRNAs. The IREs when located at the 5' RNA sterically hinder the translation and when present in the 3' end promotes the mRNA stability, making them more resistant to degradation by nucleases and allowing protein synthesis (Narahari, et al., 2000).

There are few available data about the aconitase of *P. brasiliensis* and this fact has motivated this study. Analysis of the expressed sequence tags (ESTs) in the transcriptome of mycelium and yeast cells of *P. brasiliensis* revealed up regulated genes coding for GC enzymes in the fungal yeast phase (Felipe, et al., 2005). The ACO, citrate synthase (CS), isocitrate lyase (ICL) and malate dehydrogenase (MDH) transcripts were also identified in *P. brasiliensis* during differentiation from mycelium to yeast cells, pointing to an operating GC in this process (Bastos, et al., 2007). In *P. brasiliensis* yeast cells derived from mice infected tissues the transcripts encoding

enzymes involved in anaerobic metabolism were found in elevated levels suggesting that ethanol can become a major source of carbon and that the GC could be active during the infection process (Costa, et al., 2007).

In this work we characterized the mitochondrial aconitase from the proteome of yeast cells of *P. brasiliensis*. The complete cDNA was obtained. The predicted protein presented homology to other well characterized fungi ACOs and a typical mitochondrial target signal. In order to characterize the *PbACO* and begin to understand its putative functional roles it was produced a recombinant protein comprehending a partial open reading frame (ORF) of the cDNA and the corresponding polyclonal antibody was obtained. Western blotting analyses and immunoelectron microscopy were performed and the *PbACO* shown a widespread distribution, comprehending cell wall, membrane, cytosol, mitochondria and peroxisome enriched fractions. The protein is also present in the extracellular fluid. We also investigated the regulation of *PbACO* both, protein and transcript, during mycelium-to-yeast transition and also when the fungus was incubated in C2 carbon sources or in different iron levels. Our results suggest that transcript and protein were induced during mycelium-to-yeast transition and also when the fungus was incubated in C2 carbon sources or in high-iron conditions.

## **Material and Methods**

### **Growth of *P. brasiliensis***

*P. brasiliensis*, isolate Pb01 (ATCC MYA 826) was grown at 22 °C in the mycelium form or at 36 °C as yeast, in semisolid *Sabouraud* dextrose agar medium [4% (w/v) glucose, 1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.1% (w/v) brain-heart infusion and 1.2% (w/v) agar]. The cellular differentiation from mycelium to yeast cells was performed by changing the temperature of the culture from 22 to 36 °C as previously described (Bastos, et al., 2007). In some experiments the cells were harvested from the media above, washed with water and incubated at 36 °C in modified McVeigh-Morton (MMcM) (Restrepo and Jimenez, 1980), during 3 and 24 h, under shaking at 150 rpm. The standard carbon source 1.0% glucose (w/v) was replaced by 2.8% (w/v) potassium acetate and 3.0% (w/v) ethanol. Also, the availability of iron in the culture medium was controlled by addition of 50  $\mu$ M bathophenanthroline sulfonate (BPS) as chelant agent or 90  $\mu$ M ferrous ammonium sulfate (3x the standard concentration of iron). The cells were utilized for RNA (3 h) and protein extraction (24 h).

### **Protein extracts preparation**

Four kinds of protein extracts were produced, (1) a total cell homogenate, (2) culture supernatant of yeast cells, (3) membrane protein fraction of yeast cells and (4) cell wall protein fraction of yeast cells, described as follows:

1- A total cell homogenate of yeast cells and mycelium were obtained as described by Fonseca *et al*, (2001), by disruption of frozen cells using a pestle and mortar in the presence of N  $\alpha$ -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) (50  $\mu$ g/mL), 4-chloromercuribenzoic acid (1 mM), leupeptin (20 mM), phenylmethylsulfonyl fluoride (20 mM), iodoacetamine (5 mM) in homogenization buffer (2 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-

HCl, pH 8.8). The mixture was centrifuged at 12,000 *g* at 4 °C for 10 min, and the supernatant was stored at –80 °C. 2- Culture supernatant of yeast cells was obtained after 8 h incubation in liquid minimal medium. The cells were separated by centrifugation at 5.000 *g* for 15 min and the supernatants were obtained upon filtering (0,22µm). The culture supernatants (50mL) were dialyzed with water during 4 h. Secreted protein fraction was concentrated 100 times by precipitation with ice-cold acetone (v/v) during 16 h, centrifuged at 15,000 *g* for 15 min, washed with 70% ice-cold acetone and resuspended in 25 mM Tris-HCl pH 7,0 (500 µL). 3- *P. brasiliensis* yeasts cells were suspended in buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA and 4 mM DTT, disrupted using glass beads. Cell debris was separated by centrifugation at 3,500 *g*, the supernatant was further centrifuged at 100,000 *g* for 1 h and the sediment containing the membrane-enriched fraction was suspended in the same buffer (Grimaldi de Jimenez, et al., 1979). 4- The cell wall enriched fraction was extracted according to Castro et al. (2008). Yeast cells were frozen in liquid nitrogen and disrupted using a pestle and mortar. Ground material was lyophilized, weighed and resuspended in 25 µL Tris buffer (50 mM Tris–HCl, pH 7.8) for each milligram of dry weight, as described by Damveld et al. (2005). The supernatant was separated from the cell wall fraction by centrifugation at 10,000 *g* for 10 min at 4 °C. A new protein extraction was performed with Tris buffer. All the proteins samples above were precipitated by addition of 10% (v/v) trichloroacetic acid (TCA), washed with 100% acetone and processed for one or two-dimensional gel electrophoresis according to Laemmli (1970) and O’Farrel (1975), respectively. Protein concentrations of all the samples were measured by the Bradford method (Bradford, 1976) with bovine serum albumin (BSA) as the standard.

## **Spheroplasts production, subcellular fractionation and isolation of peroxisomes and mitochondria**

Yeast cells of *P. brasiliensis* ( $2 \times 10^8$  cells) were harvested, washed, and converted to spheroplasts by digestion with 400 U of lyticase (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO) at 30 °C for 24 h. Spheroplasts membranes were disrupted by homogenization with grinder (dounce homogenizer, tight pestle). Production of spheroplasts and their disruption was monitored by light microscopy as demonstrated in Supplementary Figure 1. Trypan blue was used to assess spheroplasts viability. All centrifugation procedures for spheroplasts and cell-free extracts were carried out at 4 °C and cells and extracts were kept on ice. The purified peroxisome and mitochondria fractions from yeast cells of *P. brasiliensis* were obtained using the Peroxisome Isolation and Yeast Mitochondria Isolation Kits (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO). The peroxisome and mitochondria enriched fractions were isolated from the spheroplasts homogenate by low and medium speed centrifugation (600 *g* for 10 min; 6,500 *g* for 10 min). Density gradient ultracentrifugation was accomplished in agreement with the suppliers using OptiPrep Density Gradient Medium (60 % (w/v) solution of iodixanol in water) at 25,000 *g* for 20 min. The layers containing the purified peroxisomes and mitochondrial fractions were collected and used immediately after preparation, in biochemical and Western blotting experiments. The presence of peroxisomes was determined by measuring the activity of the peroxisomal enzyme marker, catalase (Catalase Assay Kit, Sigma Aldrich) and the presence of mitochondria was determined by measuring the activity of the mitochondrial enzyme marker, cytochrome c oxidase (Cytochrome c Oxidase Assay Kit, Sigma Aldrich) according to the suppliers methods.

## **Two-dimensional gel electrophoresis**

Isoelectric focusing was carried out on 13-cm immobilized pH gradient gel strips, with a pH range of 3.0 to 11.0 (Immobiline DryStrip gels, GE Healthcare Biosciences). The strips were rehydrated in 8 M urea, 0.5% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), 0.5% (w/v) IPG buffer (GE Healthcare Biosciences), 0.2% (w/v) dithiotreitol (DTT), and traces of bromophenol blue containing 100 µg of protein extracts for 12 h at 20°C. Isoelectric focusing was performed using the Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System (GE Healthcare Biosciences) at 20 °C at 50 mA/strip in an increasing voltage gradient (500 V for 1 h, 1,000 V for 1 h, and 8,000 V for 8 h, accumulating a total of 64,000 V), according to the manufacturer instructions. Before the second dimension electrophoresis, the strips were equilibrated twice for 15 min in buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 0.002% (w/v) bromophenol blue in the presence of 10 mg/mL DTT in the first step and 25 mg/mL iodoacetamide in the second step. The second dimension was carried out on a SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical Unit (GE Healthcare Biosciences) at 20 °C on 12% polyacrylamide gels (13 x 16 cm) for 5 h at 100 V. The proteins were Coomassie blue or silver stained. The images of the gels were obtained by using the ImageScanner II equipment and analyzed with ImageMaster 2D Platinum software (GE Healthcare Biosciences).

## **Protein identification by amino acid sequencing**

A protein species preferentially expressed in yeast cells with a molecular mass of 80 kDa and pI 7.79 was excised from the two-dimensional gels of the yeast *P. brasiliensis* proteome. The protein (200 pmoles) was eluted and digested with the endoproteinase Lys-C. The fragments were separated by reversed-phase high-performance liquid

chromatography (HPLC) and subjected to Edman's degradation. Database searches were performed in order to identify the obtained amino acids sequence.

### **Protein digestion and Mass Spectrometry**

The protein species above was cut from gels and the excised gel pieces were incubated and washed twice with 50% (v/v) acetonitrile (ACN). A volume of 15  $\mu\text{L}$  of 10 mM DTT in 50 mM ammonium bicarbonate was added to the dried gel pieces and the reaction was allowed to proceed at 56 °C for 1 h. The supernatant was removed and 50  $\mu\text{L}$  of 55 mM iodoacetamide was added to the gel pieces and reaction was allowed to proceed in the dark for 45 min at room temperature. After removal of the solution, the gel pieces were dehydrated in 50  $\mu\text{L}$  of 50 mM ammonium bicarbonate/ACN 100%, vortexed and left for 5 min. This step was repeated. The gel pieces were dried in a speed vacuum until dry. After, 50  $\mu\text{L}$  of 50 mM ammonium bicarbonate and 50  $\mu\text{L}$  of a 12.5 ng/nL modified trypsin solution were added and left at 4 °C for 45 min. After, 10  $\mu\text{L}$  of 50 mM ammonium bicarbonate was added, and digestion was performed at 37 °C overnight. Following, it was added 1  $\mu\text{L}$  of 2% (w/v) trifluoroacetic acid (TFA) and the mixture was centrifuged. The peptides were then spotted onto an AnchorChip™ MALDI target (Bruker Daltonics, Karlsruhe, Germany) and left to dry. The peptides were then eluted with 1  $\mu\text{L}$  of matrix solution [70% (v/v) ACN, 0.1% (w/v) TFA, and 10 mg/mL x-cyano-4- hydroxycinnamic acid]. After desalting, the MALDI target was washed with 0.1% (w/v) TFA for 10 s and left to dry. Tryptic peptide map was recorded on a Reflex IV MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) using the company's software packages (flexControl, XTOF). All mass spectra were calibrated externally using a standard peptide mixture (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Database searches for the identification of protein spots were carried out by submitting the monoisotopic peptide masses assigned to the Mascot software available

on-line (<http://www.matrixscience.com>) against the National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) database (NCBI nr). Monoisotopic masses of tryptic peptides were used to identify the proteins by Peptide Mass Fingerprinting (PMF).

### **Cloning a partial cDNA fragment, heterologous expression and purification of the recombinant Aconitase of *P. brasiliensis***

The cDNA coding a *P. brasiliensis* aconitase was obtained from a cDNA library derived from RNAs obtained of mycelium in transition to yeast cells (Bastos, et al., 2007). DNA sequencing was performed by using a MegaBACE 1000 sequencer (GE Healthcare, Amersham Biosciences). Blast database searches were performed using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul, et al., 1990). Multiple sequence alignments were performed using CLUSTAL X (Thompson, et al., 1997). Aiming the production of the polyclonal antibody, a fragment of the cDNA, which encodes amino acids 313–545 was cloned into pGEX-4T-3 (GE Healthcare). The oligonucleotides used are listed in Supplementary Table 1. The obtained plasmid (pGEX-4T-3-ACO) was sequenced in both strands and used to transform *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . The transformed *E. coli* cells were incubated in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with 100  $\mu$ g/mL of ampicillin, at 37 °C until the log phase was reached ( $A_{600}$ =0.6) and the recombinant protein was induced by addition of 0.5 mM IPTG for 4 h. The bacterial cells were harvested by centrifugation at 5,000 *g*, resuspended in PBS 1x and incubated with lysozyme (100  $\mu$ g/mL) before sonication (three times of 15 min). The soluble fraction of cell lysate, containing the recombinant fragment of the aconitase protein of *P. brasiliensis* (GST-PbACO), was applied to an affinity Glutathione Sepharose<sup>TM</sup> 4B Resin column (GE Healthcare) under non denaturing conditions. The fusion protein was

cleaved by thrombin protease addition (50 U/mL) and collected after 12 h of incubation. The purified recombinant protein was electrophoresed on a 12% SDS-PAGE, followed by Coomassie brilliant blue staining.

### **Polyclonal antibody production**

The purified polypeptide (300 µg) was used to produce a polyclonal antibody in BALB/c mouse. Mouse preimmune serum was obtained and stored at -20 °C. The immunization protocol consisted of an initial injection of 300 µg of the purified polypeptide in complete Freund's adjuvant and two subsequent injections of the same amount of the antigen in incomplete Freund's adjuvant. Each immunization was followed by an interval of 14 days. After 14 days of the third immunization, the serum containing a polyclonal antibody anti-*PbACO* was collected and stored at -20 °C.

### **Western blotting analysis**

The protein extracts resolved by one or two-dimensional gel electrophoresis were transferred to nylon membranes and checked by Ponceau S staining. After blocking with 5% (w/v) nonfat milk the membranes were incubated with the polyclonal antibody anti *PbACO* (diluted 1:10,000) for 2 h. Negative controls were obtained with mouse preimmune serum (diluted 1:1,000). After reaction with alkaline phosphatase anti-mouse IgG for 2 h, the reaction was developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate–nitroblue tetrazolium (BCIP-NBT).

## **Transmission electron microscopy and immunocytochemistry**

Ultrastructural and immunocytochemistry assays were carried out as described in Barbosa *et al*, (2006). Briefly, thin sections were prepared from yeast cells of *P. brasiliensis* fixed in 2% (v/v) glutaraldehyde, 2 % (w/v) paraformaldehyde, and 3% (w/v) sucrose in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2. The material was embedded in Spurr resin (Electron Microscopy Sciences, Washington, Pa). Ultrathin sections were stained with 3% (w/v) uranyl acetate, and lead citrate. For immunolabeling, the grids were incubated for 1 h with the antibody anti-*PbACO* or with mouse preimmune serum (diluted 1:100) and subsequently, with the anti-mouse IgG Au conjugated (5-nm average particle size; 1:20 dilution). After, grids were stained and observed with a Jeol 1011 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

## **RNA isolation and Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)**

RNA was isolated following the Trizol method (GIBCO<sup>TM</sup> Invitrogen Corporation) according to the supplier's recommendations. The RNA was precipitated with isopropyl alcohol, followed by RNase-free-DNase treatment. To verify the RNA integrity the samples were accessed by use of the  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  ratio, and the rRNA from each treatment was visualized on 1.2% (w/v) agarose gel electrophoresis. RNA samples were reverse transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies, Carlsbad, CA) and oligo (dT)15 primer. Real time PCR reactions were performed in StepOnePlus<sup>TM</sup> real time PCR (Applied Biosystems Inc.). The PCR thermal cycling conditions were as follows: 40 cycles at 95 °C for 15 s, 60 °C for 60 s. The SYBR Green PCR mix (Applied Biosystems Inc.) was used in PCRs and each cDNA sample was analyzed in triplicate with each primer pair. The standard curves were generated to confirm a single product, and PCR was performed using an aliquot of

cDNA of each sample, serially diluted (1:5 dilution of the original). The data were normalized to the 60S ribosomal protein L34 cDNA (Dantas, et al., 2009), which were amplified in each set of PCRs experiments. The quantification of relative expression was performed according to the relative standard curve method (Bookout, et al., 2006). Statistical significance was determined by Student's t test, with  $p < 0.05$  considered statistically significant. The oligonucleotides utilized in all experiments are listed in Supplementary Table 1.

## Results

### Identification of the aconitase of *P. brasiliensis*

A protein species preferentially expressed in yeast cells with a molecular mass of 80 kDa and isoelectric point (pI) of 7.79 was isolated from the proteome of *P. brasiliensis* (Supplementary Figure 2). This protein was submitted to digestion with endoproteinase Lys-C and an internal peptide, obtained through high performance liquid chromatography (HPLC), was characterized by automated Edman degradation. Database searches were performed and the major peptide obtained (SFDISLSHTFNEPQLQXFK) was identified as a homologue of aconitase in *P. brasiliensis*. Comparative analysis was performed between the peptide and sequences of mitochondrial aconitases from several fungi available in database. The identity values of 84% to 72% were observed (Supplementary Table 2).

The complete cDNA coding *PbACO* was obtained from a cDNA library derived from RNA obtained from mycelium to yeast transition (Bastos, et al., 2007) [<http://192.168.0.5/phorestwww>]. The deduced amino acid sequence presented 779 residues, with molecular mass of 84.8 kDa and pI of 6.97 (Supplementary Figure 3). In the sequence analysis of the deduced *PbACO* protein it was found a mitochondrial targeting signal (MTS) (residues 1-27) according to MitoProt II (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>), with a probability of exporting to mitochondria of 0.9064. Homology analysis between *PbACO* deduced amino acid sequence and related sequences searched in NCBI database showed identity values ranging from 88% to 92% and similarity of 95% to aconitases of *Ajellomyces capsulatus* (Gene Bank accession number EDN08767), *Coccidioides posadasii* (ABH10644), *Coccidioides immitis* (EAS36375) and *Aspergillus oryzae* (BAE57596) (data not shown).

**Heterologous expression, purification of the recombinant *PbACO*, polyclonal antibody production, specific recognition of *P. brasiliensis* aconitase by the polyclonal antibody and comparative analysis of the *Pbaco* gene expression in the mycelium and yeast phases.**

Aiming the production of polyclonal antibody, a fragment of the cDNA which encodes amino acids 313–545 of the *P. brasiliensis* aconitase was cloned. After induction with IPTG, a 50 kDa fusion protein was detected in bacterial lysates, corresponding to the predicted mass of the 24 kDa peptide fused to the GST (Figure 1A, lane 3). The fusion protein was purified through affinity chromatography from bacterial lysates (Figure 1A, lane 4) and was cleaved with thrombin protease (Figure 1A, lane 5). Total protein extract obtained from *E. coli* cells and the purified recombinant fragment of *PbACO* overproduced in *E. coli*, were electrophoresed, blotted onto membranes and reacted with the polyclonal antibody anti-*PbACO* (Figure 1B, lanes 2-3). No cross-reactivity was detected when the fusion protein GST-*PbACO* were incubated with the mouse pre-immune serum (Figure 1B, lane 1). The purified recombinant fragment of *PbACO* was recognized as a single protein species of 24 kDa by the polyclonal antibody (Figure 1B, lane 3).

Total protein extracts of *P. brasiliensis* yeast cells and mycelium were electrophoresed (Figure 1C, lanes 1-2), blotted onto membranes and reacted with the polyclonal antibody anti-*PbACO* (Figure 1C, lanes 3-6). A single protein species was detected in the total protein extract of mycelium (Figure 1C, lane 4) and of yeast cells that showed a stronger reaction (Figure 1C, lane 6). No cross-reactivity was detected when the same samples were incubated with the mouse pre-immune serum (Figure 1C, lanes 3, 5).

Comparative analyses of *Pbaco* gene expression were performed by qRT-PCR in the fungal phases. It was observed increased expression of the *Pbaco* gene at the yeast morphology (Figure 1D).

## **Two-dimensional Western blotting analysis and mass spectrometry**

The specific polyclonal antibody anti-*PbACO* was used in two-dimensional western blotting procedures with total protein extracts of mycelium and yeast cells of *P. brasiliensis*. Three isoforms (pIs 7.52, 7.65 and 7.79) of *PbACO* protein with molecular mass of 80 kDa was detected in two-dimensional Western blotting assays in both, yeast cells (Figure 2 panels A, B) and mycelium (Figure 2 panels C, D). No reaction was detected in the same assays when the membranes were incubated with the pre-immune serum (data not shown). The three spots identified by the specific polyclonal antibody anti-*PbACO* were used in MALDI-TOF analysis. A representative spectrum of the tryptic fragments of *PbACO* protein is shown in Figure 2E, illustrating the mass values from the trypsin autolysis products. The table 1 summarizes the comparisons between fifteen representative mass values obtained for the detected peptides and the peptides mass values obtained by theoretical digestion of the predicted *PbACO*, with 19 % of sequence coverage.

## **Cellular localization of the *P. brasiliensis* aconitase**

The cellular localization of the aconitase was early approached by immunoelectron microscopy using the specific polyclonal antibody anti-*PbACO* (Figure 3). In mycelium and yeast cells the gold particles were diffused distributed from the cytoplasm to cell wall but it's clearly more abundant in yeast cells (Figure 3C). Protein dual localization in mitochondrial and cytosol could be verified (Figure 3C). Control sample exposed to the pre-immune serum was free of label (data not shown). In order to confirm these results the obtained several cellular fractions were evaluated by Western blotting analyses with the same specific polyclonal antibody anti-*PbACO*. The obtained spheroplasts of *P. brasiliensis* yeast cells were used in order to isolate the peroxisome

and mitochondria purified fractions by density gradient ultracentrifugation. The gradient fractions were analyzed for enzymatic activities of the mitochondrial and peroxisomal marker enzymes cytochrome c oxidase and catalase, respectively (data not shown). A single protein species was detected in secreted proteins purified from culture filtrates, cell wall, membrane, mitochondrial and peroxisomal purified fractions (Figure 3E). Western blotting analysis corroborates the broad distribution of *P. brasiliensis* aconitase.

### **Carbon sources and availability of iron affect both *PbACO* protein levels and *Pbaco* gene expression**

To elucidate the effect of nutrients in *PbACO* protein and gene expression, *P. brasiliensis* yeast cells were grown on minimal medium containing glucose, potassium acetate or ethanol as sole carbon sources and in presence of high iron concentration or iron absence by addition of a chelant agent in liquid minimum medium. The protein extracts were subjected to one-dimensional gel electrophoresis analysis and stained with Coomassie blue (Figure 4A). The samples were blotted onto nylon membranes and analyzed by immunoblotting (Figure 4B). A protein corresponding of 80 kDa was obtained in all conditions. However, significant differences can be observed. A higher protein level was found in cells growing in the presence of potassium acetate or ethanol when compared to the protein level in yeast cells growing in glucose. The addition of iron also promoted higher protein accumulation (Figure 4B). No cross-reactivity to the mouse preimmune serum was evidenced with the samples (data not shown). RNAs were extracted from yeast cells in the same conditions above and used in qRT-PCR analyses. *PbL34* transcript was amplified as a control. The *Pbaco* transcript levels in the presence of glucose and in iron depletion were reduced when compared to other carbon sources and in high iron levels (Figure 4C) corroborating the observed protein levels. Higher

transcript level was observed in yeast cells grown in the presence of acetate and ethanol as carbon sources compared to glucose (Figure 4C). The addition of iron also promoted increased transcript level.

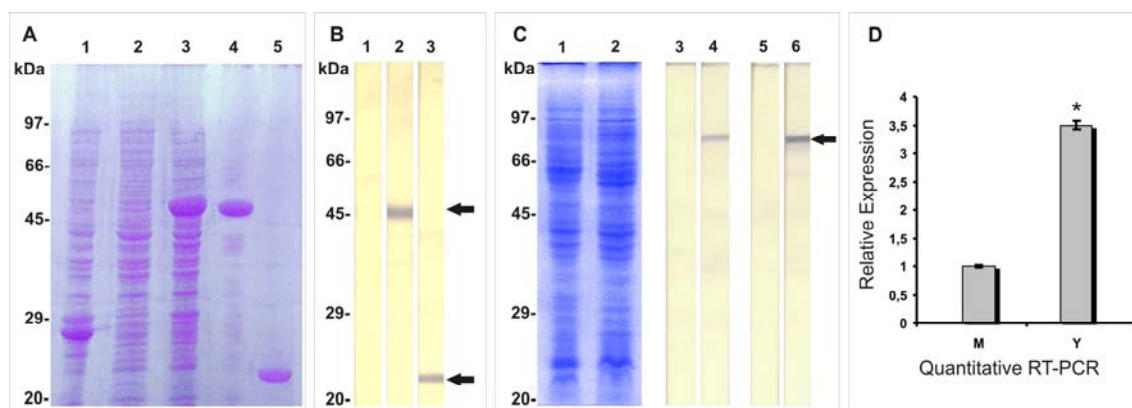


**Fig. 1. Heterologous expression, purification of the recombinant *PbACO*, polyclonal antibody production, specificity of polyclonal antibody against *PbACO* and comparative analysis of the *Pbaco* gene expression in the mycelium and yeast phases.**

(A) *E. coli* DH5α cells harboring the pGEX-4T-3-ACO plasmid were grown at 37 °C to an A600 of 0.6 and harvested before (lane 2) and after 4h of incubation with 0.5 mM IPTG (lane 3). Induced *E. coli* cells harboring the pGEX-4T-3 (lane 1). After induction with IPTG, a 50 kDa fusion protein was detected in bacterial lysates. The fusion protein was purified using glutathione-sepharose 4B at 4 °C and subsequently cleaved by the addition of thrombin protease (50 U/mL) (lanes 4 and 5).

(B) The fusion and the purified recombinant proteins were electrophoretically separated and transferred to nitrocellulose membranes. Lane 1- Preimmune serum reaction with fusion protein. Both proteins (lanes 2 and 3) were detected by the polyclonal antibody anti-*PbACO* (diluted 1:10,000). After reaction with alkaline phosphatase anti-mouse immunoglobulin G (IgG), the reaction was developed with (BCIP–NBT). Molecular size markers are indicated.

(C) The total protein extracts (30 µg) from mycelium (lanes 1, 3 and 4) and yeast cells (lanes 2, 5 and 6) of *P. brasiliensis* were fractionated by one-dimensional gel electrophoresis (12% SDS-PAGE) and stained using Coomassie blue (Lanes 1 and 2) or transferred to nylon membranes. The membranes were probed with the mouse preimmune serum (lanes 3 and 5) or the anti-*PbACO* polyclonal antibody (lanes 4 and 6). Molecular size markers are indicated.

(D) Comparative analyses of the *Pbaco* gene expression by qRT-PCR. *Pbaco* gene expression was examined in the mycelium and yeast phases. The data were normalized to the 60S ribosomal protein L34 transcript expression. The quantification of relative expression was performed according to the relative standard curve method and statistical significance was determined by Student's t test (\*p < 0.05).

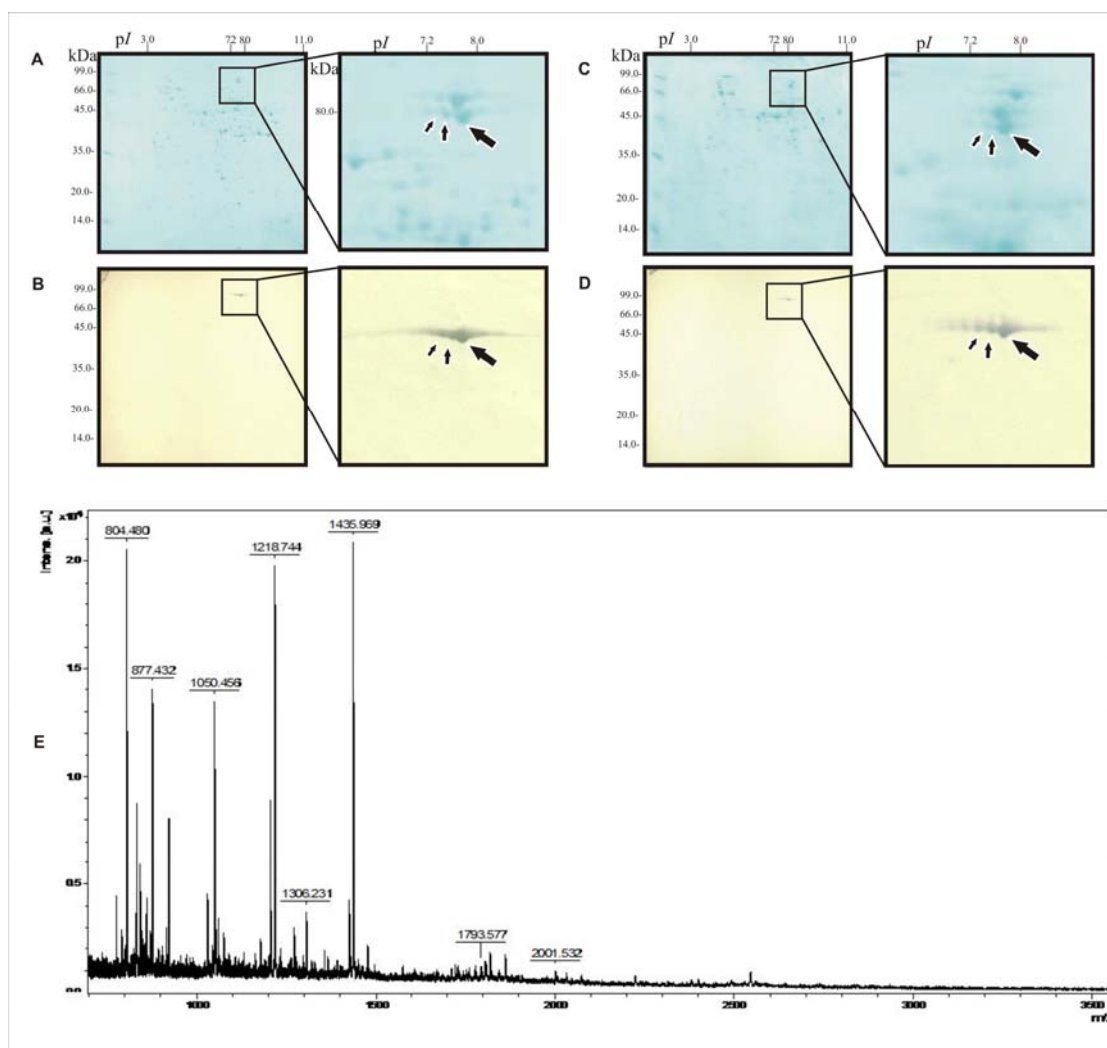


**Fig. 2. Two-dimensional Western blotting analysis and mass spectrometry.**

Two-dimensional gel electrophoresis of total protein extracts from *P. brasiliensis* yeast cells (A and B) and mycelium (C and D). The proteins were stained by Coomassie blue (A and C) or blotted on nylon membrane and reacted to the polyclonal *PbACO* antibody (B and D). The square areas of interest in the gels and in the membranes were enlarged and shown at the right of each panel. The arrows indicate the *PbACO* protein. Numbers to the left of figures refer to the molecular mass. At the top are indicated the isoelectric points. E- Peptide mass fingerprinting of trypsin digested *PbACO* isoform with pI of 7.79. Fifteen peaks were observed and the obtained sequences were submitted to analysis in database.

**TABLE 1 - Identification of *PbACO* by peptide mass fingerprinting\*.**

| Tryptic peptide mass (Da)                       |                                                | Identified amino acid sequence                                    |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Experimental data<br>( <i>in-gel</i> digestion) | Expected data<br>( <i>in silico</i> digestion) |                                                                   |
| 1,076.5471                                      | 1,075.5398                                     | <sup>54</sup> <b>K.MAENLDIVR.S</b> <sup>62</sup>                  |
| 1,204.6705                                      | 1,203.6632                                     | <sup>65</sup> <b>R.LNRPLTYAEK.I</b> <sup>74</sup>                 |
| 2,021.8971                                      | 2,020.8899                                     | <sup>75</sup> <b>K.IMYSHLDDPHEQDIHR.G</b> <sup>90</sup>           |
| 848.3866                                        | 847.3793                                       | <sup>309</sup> <b>R.MYDYLK.A</b> <sup>314</sup>                   |
| 1,033.5596                                      | 1,032.5523                                     | <sup>318</sup> <b>K.RQAIGDFAR.S</b> <sup>326</sup>                |
| 877.4736                                        | 876.4663                                       | <sup>319</sup> <b>R.QAIGDFAR.S</b> <sup>326</sup>                 |
| 833.4468                                        | 832.4395                                       | <sup>327</sup> <b>R.SYAHSLR.E</b> <sup>333</sup>                  |
| 1,434.7750                                      | 1,433.7677                                     | <sup>418</sup> <b>K.SLFTVTPGSEQIR.A</b> <sup>430</sup>            |
| 1,424.7074                                      | 1,423.7001                                     | <sup>468</sup> <b>K.KGEANSIVSSYNR.N</b> <sup>480</sup>            |
| 1,296.6167                                      | 1,295.6094                                     | <sup>469</sup> <b>K.GEANSIVSSYNR.N</b> <sup>480</sup>             |
| 2,525.1128                                      | 2,524.1055                                     | <sup>605</sup> <b>R.GHLDNISNNMLIGAINAENGEANK.V</b> <sup>628</sup> |
| 1,218.6293                                      | 1,217.6220                                     | <sup>634</sup> <b>K.TGEYGPVPATAR.D</b> <sup>645</sup>             |
| 1,724.8514                                      | 1,723.8441                                     | <sup>654</sup> <b>K.WVIGDWNYGEGSSR.E</b> <sup>668</sup>           |
| 922.4968                                        | 921.4895                                       | <sup>669</sup> <b>R.EHAALPR.H</b> <sup>676</sup>                  |
| 1,050.6552                                      | 1,049.6479                                     | <sup>677</sup> <b>R.HLGGLAIITR.S</b> <sup>686</sup>               |

\* Data refers to the isoforms with *pI* of 7.79.

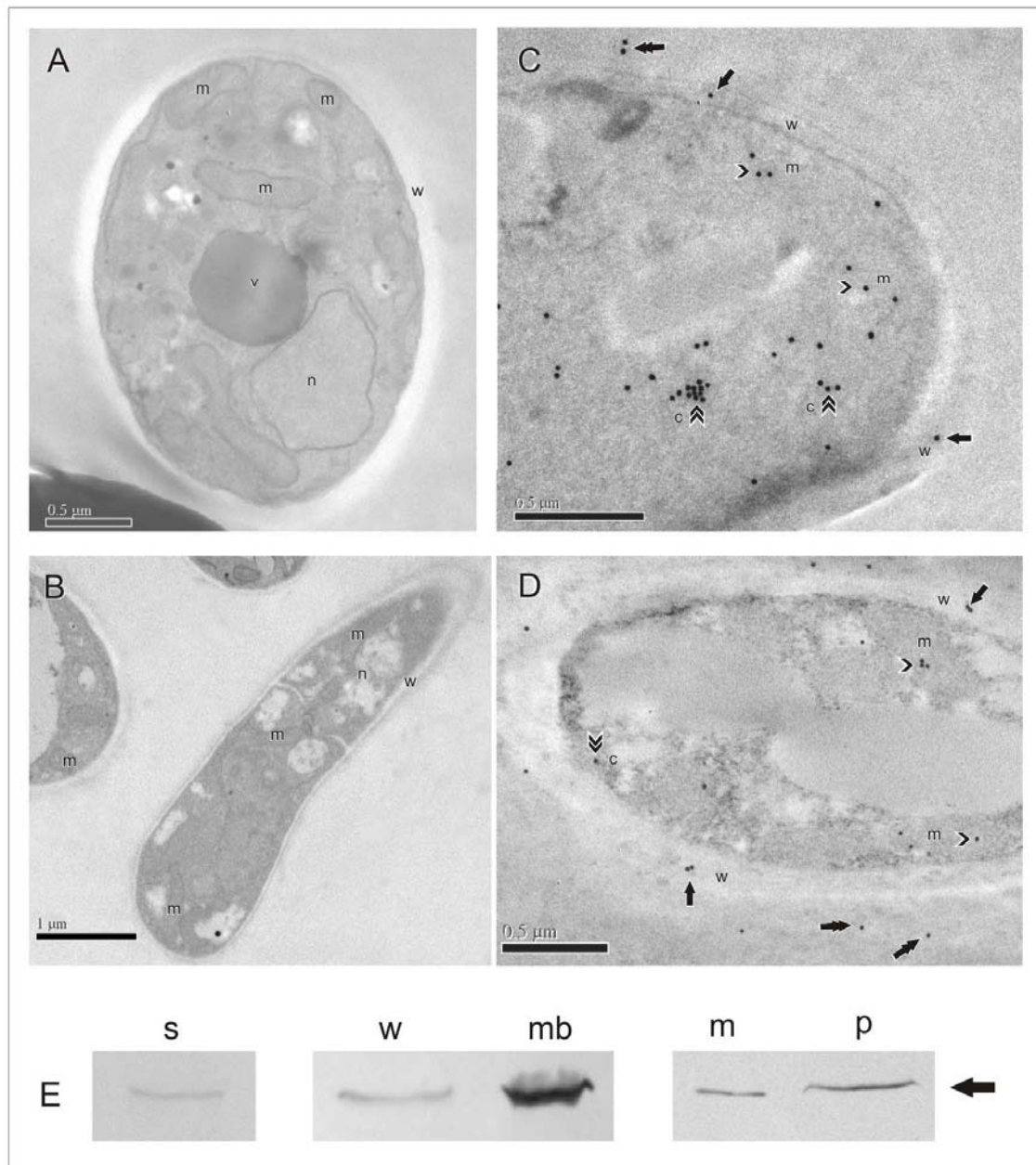


**Fig. 3. Immunoelectron microscopy detection of the *PbACO* and Western blotting analysis of cell fractions and secreted proteins obtained from culture filtrates.**

Transmission electron microscopy of yeast cells (A and C) and mycelium (B and D). v: cytoplasmic vacuole, n: nucleus, w: cell wall, m: mitochondria and c: cytosol. The gold particles were indicated in double arrows (secreted), single arrow (w: cell wall), arrowheads (m: mitochondria) and double arrowheads (c: cytosol). Bars 0,5  $\mu$ m (A, C and D) and 1,0  $\mu$ m (B). E- Western blotting analysis: protein extracts were fractionated by SDS-PAGE, blotted onto nylon membranes and reacted with the polyclonal antibody anti-*PbACO*. s- secreted proteins obtained from culture filtrates; w- cell wall enriched fraction; mb- membrane enriched fraction; m- mitochondrial purified fraction and p- peroxisomal purified fraction.

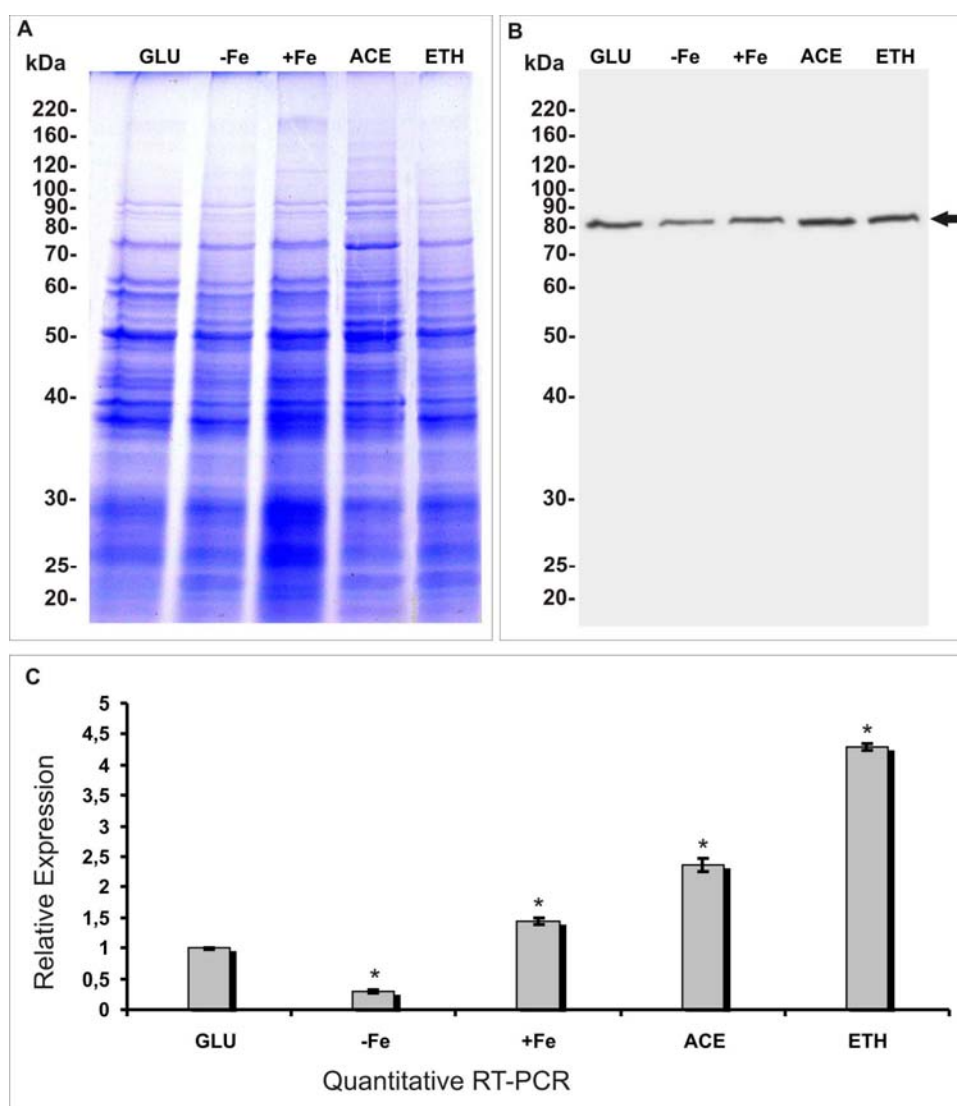
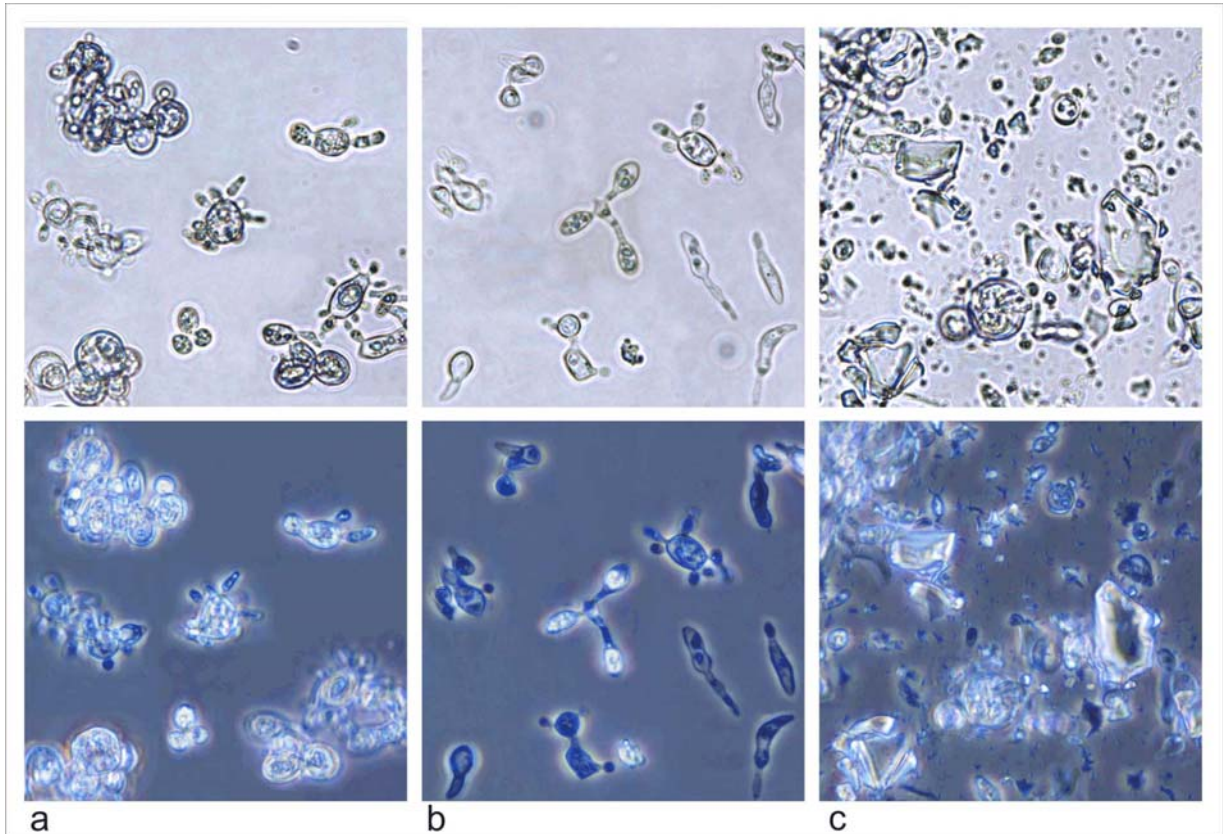


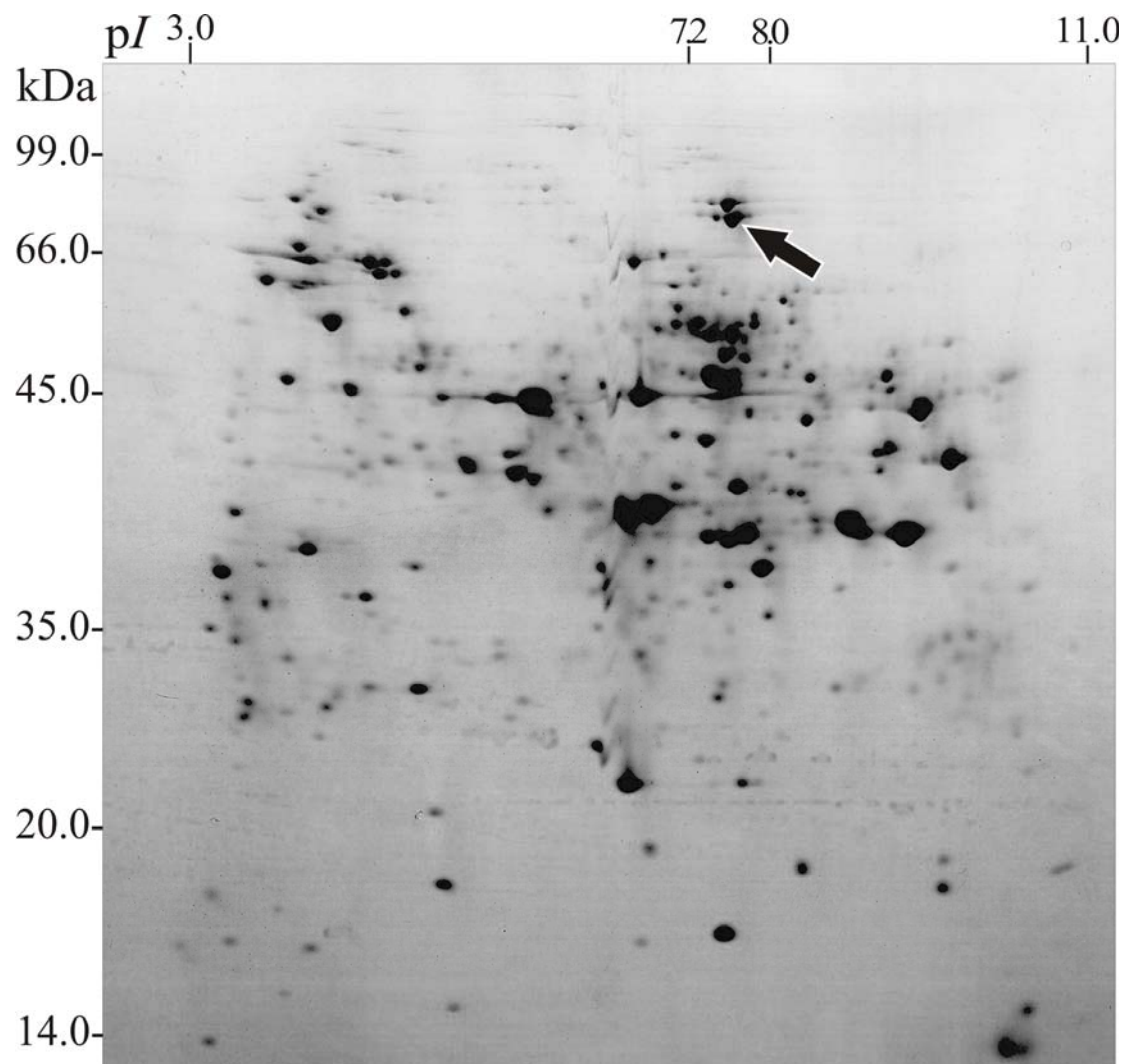
**Fig. 4. Carbon sources and availability of iron affect both *PbACO* protein levels and *PbAco* gene expression.**

*P. brasiliensis* yeast cells were incubated at 36°C, during 3h for RNA extraction and 24h for protein extraction, with glucose as standard carbon source (GLU). The availability of iron in the culture medium was controlled by addition of 50 $\mu$ M bathophenanthroline sulfonate (BPS) as chelant agent (-Fe) or 90 $\mu$ M ferrous ammonium sulfate (+Fe). The standard carbon source was replaced by potassium acetate (ACE) and ethanol (ETH). The total protein extracts (30 $\mu$ g) were fractionated by one-dimensional gel electrophoresis (12% SDS-PAGE) and stained using Coomassie blue (A) or transferred to nylon membranes and probed with anti-*PbACO* polyclonal antibody (B). Numbers the left of figures refer to the molecular mass standard. A single protein species of 80 kDa was detected in all extracts. C- *Pbaco* gene expression was examined by qRT-PCR under the same conditions above. The data were normalized to the 60S ribosomal protein L34 transcript. The quantification of relative expression was performed according to the relative standard curve method and statistical significance was determined by Student's t test (\*p < 0.05).



**Supplementary Figure 1 – *P. brasiliensis* spheroplasts production and cell lyses.**

a- *P. brasiliensis* yeast cells collected from *Sabouraud* dextrose liquid medium. b- Spheroplasts obtained at 30°C by lysing the cells in 400 U of lyticase for 24 h. c- Spheroplasts membranes disrupted by homogenization with grinder (dounce homogenizer, tight pestle). The pictures were taken by light microscopy without (higher panels) and with a blue interference filter (lower panels). (Magnification X 400).



**Supplementary Figure 2. Fractionation of *P. brasiliensis* yeast cells protein extracts by two-dimensional gel electrophoresis.**

The arrow indicates a protein species preferentially expressed in yeast cells with a molecular mass of 80 kDa and pI 7.79 that was excised from the gel and digested with the endoproteinase Lys-C. High performance liquid chromatography (HPLC) was used in order to obtain an internal peptide that was characterized by automated Edman degradation. Database searches were performed and the major peptide obtained (SFDISLSHTFNEPQLQXFK) was identified as an aconitase. Molecular size markers are indicated. At the top the isoelectric points are indicated.

```

1 M C Y R C P K K A L N N L L G A R S L A T V S E N P L L D K K V E M
1 ATGTGTACC GGTGTCCAA AAAAGCACTA AATAACCTTC TGGTGCTCG GAGCCTGGCA ACTGTACGG AGAATCCCTC GCACAAAAAG GTCAGATGT
TACACAATGG CCACAGGGTT TTTTCGTGAT TTATTGGAAG ACCCACGAGC CTCGGACCGT TGACAGTCGG TCTTAGGAGA TCGTGTITTTT CAGCTCTACA

34 C N Y E K G N Y I N Y K K M A E N L D I V R S R L N R P L T Y A E K
101 GCAATTATGA GAAGGGCAAC TACATCAACT ACAAGAATG GGCAGAGAAC CTAGATATTG TCCGAAGCAG ACTGAACCCG CCCTTAACGT ACCGTGAGAA
CGTTAATACT CTTCCCGTTG ATGTAGTTGA TGTCTTCTA CCGTCTCTTG GATCTATAAC AGGCTTCGTC TGACTTGGCG GGAATTGCA TGCAGACTCTT

68 I M Y S H L D D P H E Q D I H R G K S Y L K L R P D R V A C Q D A
201 GATCATGTAC TCTCACCTTG AGCATCTCA TGAACAAGAT ATCCACCGCG GAAAATCATA TCTCAAGCTG CGGCCAGACC GTGTGGCTTG TCAAGACGCC
CTAGTACATG AGAGTGAAC TGCTAGGAGT ACTTGTCTTA TAGTGTGGCG CTTTTAGTAT AGAGTTTCAG GCCGCTCTGG CACACCGAAC AGTCTCGGG

101 T A Q M A I L Q F M S A G M P S V A T P A S V H C D H L I E A Q V
101 TGGCGGAGA AGATCTTGGC AGAGCTAACG AGATCAACAA GGAAGTATAC GACTTTCTCT CCACATCTCG CTGTGCTGAG GTCTCAGTTG TCTGGAAACC
TGACGGTCTT ACCGTAAGA AGTCAAATAC AGCGGACCTT ACGGGAGACA ACGATGAGGA CGGTACACAG TGACGCTGTT GAACTAGTCT CAGTCTCAAC

134 G G K D L A R A N E I N K E V Y D F L S T S C A K Y N I G F W K P
401 GTGGCGAGAA AGATCTTGGC AGAGCTAACG AGATCAACAA GGAAGTATAC GACTTTCTCT CCACATCTCG CTGTGCTGAG GTCTCAGTTG TCTGGAAACC
CACCGCTCTT TCTAGAACGG TCTCGATTGC TCTAGTTGTT CCTTCATATG CTGAAGAGA GGTGTAGGAC GCGATTATA TTGTAACTTA AGACTTTGG

168 G S G I I H Q I L L E N Y A F P G G L M I G T D S H T P N G G G L
501 CGGTTCGGGT ATTATCCACT AGATTCTCTT CGAAACTATG GCTTCTCCCG GAGGTCTCAT GATTGGAAC GACTCCATA CCCCACAGG TGGTGGCTT
GCCAAGGCC TAATAGGTAG TCTAAGAGGA GCTTTTGATA CGAAAGGGC CTCCAGAGTA CTAACCTTGA CTGAGGATAT GGGGTTGGC ACCACAGAA

201 G M A A I G V G G A D A V D V M A G L P W E L K A P K V I G V R L
601 GGTATGGCTG CGATTGGTGT TGGCGGTGCT GACGCCGTG ACGTCAATGG TGGTCTCCCG TGGGAATTGA AAGCTCCCAA AGCTATTGGT GTGAGACTCT
CCATACCGAC GCTAACCAAC ACCGCCACGA CTGCGCGACG TGCAGTACCG ACCAGAGGGG ACCCTTAAC TTCGAGGGTT TCGAAGCA CACTCTGAGA

234 S G E L S G W T S P K D I I L K V A G I L T V K G G T G A I I E Y H
701 CTGGTGATTT GTCCGGATGG ACCTCTCCCA AGGATATCAT CTTGAAGGTC GCTGGAATCC TTACTGTCAA GGGTGGTACT GGTGCTATTA TCGATACCA
GACCACTTAA CAGCCCTACC TGGAGAGGGT TCCTATAGTA GAACTTCCAG CGACCTTAGG AATGACAGT AATGACAGT CCACATATAT CCAGATATGT

268 G P G N S L S C T G M G T I C N I G A E I G A T T S V F P F N D
801 CGGCCCTGGT GTCAACTCTC TCTCTTGCAC TGGTATGGGC ACCATCTCTA ACATAGGTGC TGAATTCGGT GCTACCACTT CCGTCTTCCC CTTCAACGAC
GCCGGGACCA CAGTTGAGAG AGAGAACCTG ACCATACCCG TGGTAGACAT TGTATCCACG ACTTTAGCCA CGATGGCTGA GATGGCTGAA GAGTGGTCTG

301 R M D Y L A T K R Q A I G D F A R S Y A H S L R E D E G A E Y
901 CGCATCTACG ACTACCTCAA GGCACACAAA CGCCAGCCCA TTGGTCACTT TGGCAGATCT TATGCCACA GCCTCCGAGA GGACGAGGGC GCTGAGTACG
GCGTACATGC TGATGGAGTT CCGGTGGTTT CCGGTCCGGT AACCACTGAA ACGGTCTAGA ATACGGGTGT CCGAGGCGCT CCGTCTCCCG CAGCTATGC

334 D Q L I E I N L S E L E P H I N G P F T P D L A T P I S K F K D A V
1001 ATCAATGTAT CGAGATCAAC TTGTCTGAAC TTGAACCCCA TATCAACGGC CCAATCAACC CCAATTGGC AACCCTATC TCCAAGTGA AGGATGCTGT
TAGTTAATA GCTCTAGTTG AACAGACTTG AACTTGGGGT ATAGTTGCCG GGTAAAGTGG GGTAAACCG TTGGGATAG AGGTTCAAGT TCCTACGACA

368 K E N G W P E L K V G L I G S C T N S S Y E D M S R A A S I A R
1101 CAAGGAAAC GGTGGCCAG AGGAGCTGAA GGTCCGCTTG ATTGGTCTT GCACCAACTC CTCCTATGAG GATATGTCCC GAGCCGCTT TATCGCCCGG
GTTCTTTTG CCGACCGGTC TCCTCGACTT CCAGCCGAAC TAACAAGAA CGTGGTTGAG GAGGATACCT CTATACAGGG CTCGGCGAAG ATAGCGGGCC

401 D A L D H G I K A K S F T V T P G S E Q I R A T I E R D G Q K
1201 GATGCTCTGG ACCACGGCAT CAAGGCCAAG TCTCTCTTCA CCGTTACCCC CCGTTCTGAG CAGATCCGCG CAACCAATGA RCGGGATGGT CAGCTGAAGA
CTACGAGACC TGGTGCCGTA GTTCCGGTTC AGAGAGAAGT GGCATGGGG GCAAGACTC GTCTAGCGCG GTTGTAACT CCGCCTACCA GTGCACTTCT

434 T L E F G G V I L A N A C G P C I G Q W D R R D V K K G E A N S I
1301 CCCTTGAGGA ATTTGGCGGT GTCATCTCTG CCAATGCTTG CCGTCTTTCG ATTGGACAGT GGAATCGTGC GGAATGTGAAG AAGGGCGAGG CTAACCTCAT
GGGACACTCT TAAACCGCCA CAGTAGGAAC GTTACGAAAC GCCAGGAACG TAACTGTCA CCCTAGCAGC CCTACACTTC TTCCCGCTCC GATTGAGGTA

468 V S S Y N R N F T G R N D A N P A T H A F V T S P D L V T M S P I
1401 CGTCTCTTCC TACAACGAA ACTTCACTGG ACCTAATGAT GCCAACCTG CTACCAACGC CTTCTGTCAC TCTCTGATC TCGTGTGCG AATGACTATC
CGAGCAAGG ATGTTGGCTT TGAAGTACC TGCATTACTA CCGTTGGGAC GATGGGTGCG GAAGCAGTGG AGAGGACTAG AGCAACAGCG TTAATGATAG

501 A G T L N F N P L T D T L K D K D G K E F K L K E P T G A G L P A
1501 CGCGGAACCC TGAACCTCAA CCGCTTGACC GACACCTCA AAGACAAGGA TGGCAAGGAG TTCAAGCTCA AGGAGCCAAC AGGTGCTGGA CTACACGCCA
CGCCTTGGG ACTTGAAGTT GGGGAACTGG CTGTGGGAGT TTCTGTCTCT ACCGTCTCCT AAGTTCGAGT TCCTCGTTTG TCACGACCT GATGTGCGGT

534 N G Y D P G R D T Y Q A P P K D R S S I S V A V S P T S D R L Q I L
1601 ACGGATATGA CCCAGGCCGT GACACTTACC AGGCCCCACC AAAGGACCGA TCTTCGATT CCGTTGCTGT CTCCTCCACT AGTACCGCTT TCCAGATCTT
TGCTTACTT GGTTCGCGCA CTGTGGATGG TCCGGGTGG TTCTCTGGCT AGAAGCTAAA GGCACAGACA GAGGGGGTGA TCACCTGGAG AGGCTTAGGA

568 K A F Q P W D G K D A I G I P I L I N A Q G K T T T D H I S M A G
1701 TAAAGCTTTT CAGCCATGG ATGGAAGGA TGCTATTGGA ATCCCAATCT TGATCAACGC TCAAGGCAAA ACCACCACTG ACCACTATCT CATGGTGGG
ATTTCGAAAA GTCCGTACCC TACCTTCTCT ACGTAACTCT TAGGTTAGTA ACTAGTTGCG AGTTTCGTTT TGGTGGTAC TGGTGTAGAG GTACCGACCC

601 F W L K Y R G H L D N I S N N M L I G A I N A E N G E A N K V K N
1801 CCCTGGTTGA AATACCGTGG CCATCTCGAC AATCTCTCCA ACAATATGTT GATTGGTGCC ATTAACGCTG AGAACGCGA GGGCAACAG CTCAAGACT
GGGACCAACT TTATGGCACC GGTAGAGCTG GTTGTGACAA CTAACCAAGG TAATTGGGAC TCTTGTGCT CCGTGTGTT CAGCTTTCTTA

634 F K T G E Y G P V P A T A R D Y K A R G I K W L V I G D W N Y G E G
1901 TCAAGACCGG CGAATATGGC CCGGTCCCGC CACTGCGCG TGATTACAAG GCCAGAGGAA TCAATGGCT CGTCATCGGT GACTGGAAC CGGCGAAGG
AGTTCTGGCC GCTTATACCG GGCAGGGGCG GTTGACGGCG ACTAATGTTC CCGTCTCTT AGTTTACCGA GCAGTAGCCA CTGACCTTGA TGCCGCTTCC

668 S S R E H A A L E P R H L G G L A I I T R S F A R I H E T N L K K K
2001 AAGTCCCGA GAACACGCTG CCTCGAGCC CAGACATCTT GCGGTCTCG CCATTATCAC CAGAAGCTTT GCCGCTATCC ACGAAACCAA CTTGAAGATG
TTGAGGGGCT CTTGTGCGAC GGGAGCTCGG GTCTGTAGAA CCGCCAGAGC GGTAAATAGT GTCTTCGAAA CCGGCATAGG TGCTTTGGTT GAATCTCTTC

701 Q G M L P L T F T D P A D Y D R I R P D D T V D L M C T E L A V G
2101 CAGGATATGC TTCTCTTAC CTTCACTGAC CCAGCCGACT ACGACCGCAT CCGGCCCGTA GACACCGTTG ACCTGATGTG CACCGAGCTC CCGCTTGGCA
GTCCATACG AAGGAGAATG GAAGTGACTG GGTCCGCTGA TGCTGGCGTA GCGCGGCTA CTGTGGCAAC TGGACTACAC GTGGCTCGAG CGGCAACCGT

734 K P I T L R V H P K N G K S F D I S L S H T F N E P Q L Q W F R D G
2201 AGCCCATCAC CCTCCGCTC CACCCCAAGA ACGGCAAGTC ATTGATATC TCCTCTTCCC ACACCTTCAA CGAGCCACAG CTTCACTGTT TCAAGATGG
TCGGGTAGT GAGGCGCAG GTGGGTTCT TGCCGTTAG TAAGCTATAG AGGAGAGGG TGTGGAAGTT GCTCGGTGTC GAAGTCACGA AGTCTCTACC

768 S A L N T M A K Q R A S @
2301 AAGCGCCCTG AACACCATG CCAAGCAACG TGCGTCTTAG
TGCGGGGAC TTGTGGTACC GGTTCGTTGC ACGCAGAATC

```

**Supplementary Figure 3 – The cDNA and predicted amino acid sequence encoding *PbACO*.** The cDNA coding ACO was obtained as described. The deduced amino acid sequence is shown above the nucleotide sequence. The numbering of the amino acid sequence begins at the methionine encoded by the first initiation codon and ends at the first termination codon, both in bold italics. The peptide indicated by white block (residues 376-387) is described as a signature pattern for ACO. The peptide highlighted in grey (residues 747-765) correspond to the first identified peptide of the *PbACO*, mentioned in the Figure 1. Pointed with arrows are shown the amino acid residues presumably related with the active-site (V133, E136, V271, Y303, K307, E374, L412, L432 and E436 ). A mitochondrial targeting signal is underlined (residues 1-27).

**Supplementary Table 1 – Oligonucleotides**

| Oligonucleotide                         | Sequence (5' → 3')                |
|-----------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>qRT-PCR</b>                          |                                   |
| L34-Sense                               | CGGCAACCTCAGATACCTTC              |
| L34-Antisense                           | GGAGACCTGGGAGTATTCACG             |
| Aco-Sense                               | GGATGCTGTCAAGGAAAACGG             |
| Aco-Antisense                           | CGGGGGTAACGGTGAAGAGAG             |
| <b>Heterologous Protein Expression</b>  |                                   |
| Aco-Sense- <i>Sall</i> <sup>b</sup>     | <u>GTCGAC</u> GCCATTGGTGACTTTGC   |
| Aco-Antisense- <i>NotI</i> <sup>a</sup> | <u>GCGGCCGC</u> GCCTGGTAGGTGTCACG |

<sup>a</sup> *NotI* restriction site underlined; <sup>b</sup> *Sall* restriction site underlined

**Supplementary Table 2 – Amino acid sequence alignment of the 80 kDa protein of *P. brasiliensis* with homologues**

| Organism                      | Amino acid sequence |                                                | <i>e</i><br>Value | Identity<br>(%) | Similarity<br>(%) |
|-------------------------------|---------------------|------------------------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| <i>Ajellomyces capsulatus</i> | 732                 | SFDISLSHTFNESQIQWFK 750<br>SFDISLSHTFNE Q+Q FK | 8e-06             | 84              | 89                |
| <i>Coccidioides posadasii</i> | 754                 | FDVSLSHTFNESQLQWFK 771<br>FD+SLSHTFNE QLQ FK   | 3e-05             | 83              | 88                |
| <i>Coccidioides immitis</i>   | 754                 | FDVSLSHTFNESQLQWFK 771<br>FD+SLSHTFNE QLQ FK   | 3e-05             | 83              | 88                |
| <i>Neosartorya fischeri</i>   | 749                 | FDISLNHTFNESQIEWFK 766<br>FDISL+HTFNE Q++ FK   | 0.003             | 72              | 88                |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>  | 755                 | FDISLNHTFNESQIEWFK 772<br>FDISL+HTFNE Q++ FK   | 0.003             | 72              | 88                |

The species (cited with binomial name) and the respective GenBank accession numbers were as following: *Ajellomyces capsulatus* (EDN08767); *Coccidioides posadasii* (ABH10644); *Coccidioides immitis* (EAS36375); *Neosartorya fischeri* (EAW16536) and *Aspergillus fumigatus* (EAL89133). + Indicates similar amino acids and nonconservative substitutions are unfilled.

## Discussion

Salem-Izacc and coworkers (1997) in preliminary proteomics studies, aiming to identify differentially expressed proteins in yeast and mycelial phases of *P. brasiliensis*, found a prominent protein of 80kDa, pI 7.79 preferentially expressed in the yeast phase. This work began with the isolation of this protein from the two-dimensional gel and its characterization by partial sequencing of an internal peptide. Comparative studies in databases revealed high homology with mitochondrial aconitase in various fungi.

ACO acts as an enzyme that catalyzes the isomerization of citric acid in isocitric acid both in KC and in the GC, well-established pathways of energetic metabolism. The GC allows the synthesis of dicarboxylic acids with 4 carbon atoms (C4) from acetyl-CoA, a shortcut of two decarboxylation reactions when compared to KC. These intermediate metabolites of C4 can be used in gluconeogenesis and other biosynthetic pathways. The GC can also use compounds with C2 (as acetate and ethanol) and fatty acids as carbon source (Velot, et al., 1999). Felipe et al (2005) reported a possible shift in the energetic metabolism profile presented by *P. brasiliensis* in mycelia and yeast stages, from aerobic to anaerobic, with the deactivation of KC and activation of GC, respectively. Bastos et al (2007) suggested that the GC can be activated during the dimorphic differentiation of mycelium to yeast in *P. brasiliensis*, since the transcripts of citrate synthase, aconitase, isocitrate lyase and malate dehydrogenase were identified in the transcriptome of *P. brasiliensis* during the dimorphic transition. Also in yeast cells of *P. brasiliensis* derived from tissues of infected mice the transcripts coding for enzymes involved in anaerobic metabolism were found at high levels, suggesting that ethanol can become a major carbon source and that the GC can be active during the infection process (Costa, et al., 2007). All these data motivated the present study.

In this work the sequence coding to *PbACO* was obtained from a cDNA library constructed from RNA extracted during the dimorphic transition of *P. brasiliensis*

(Bastos, et al., 2007). The analysis of the predicted *PbACO* revealed a protein consisting of 779 amino acids, 84.8 kDa and pI of 6.97. The predicted protein was highly homologous to aconitases from other fungi. All the amino acids corresponding to the catalytic domain of mitochondrial aconitase were found as well as the protein signature. The identification of a mitochondrial targeting signal with a high probability of exporting to mitochondria indicates that *PbACO* possibly plays its metabolic role in KC. The observed differences in the molecular mass between the predicted and the native protein are consistent with the predicted protein without the first 27 residues corresponding to the mitochondrial targeting signal.

A purified recombinant protein corresponding to amino acid residues 313 to 545 of the *PbACO* was obtained and used for polyclonal antibodies production in mice. The analysis carried out by Western blotting showed that the obtained antibody was able to recognize both, the recombinant protein of 24 kDa and the native protein as a specie of 80 kDa in the extracts of yeast cells and mycelium of *P. brasiliensis*, with stronger reaction with yeast cells extracts. Analysis by qRT-PCR showed that the transcript of *Pbaco* increases significantly in yeast cells, suggesting a differential metabolism in fungal stages, as suggested by Felipe et al (2005).

The antibody produced was efficient in the recognition of *PbACO* by two-dimensional Western blotting assays. Mass spectrometry analysis identified the protein as an aconitase of *P. brasiliensis*. The observed differences in the isoelectric points between the predicted and the native protein suggest the apoprotein, [3Fe-4S] and [4Fe-4S] forms of *PbACO*, as demonstrated by Zheng et al (1990).

Immunolocalization assays were performed using the polyclonal anti-aconitase antibody, either by transmission electron microscopy or by Western blotting with protein extracts from cell fractions. Electron microscopy assays showed that the protein has a similar localization in yeast cells and in mycelium, being more abundant in yeast

cells of *P. brasiliensis*, confirming the data obtained by Western blotting and qRT-PCR. The expected double location in mitochondria and cytosol was confirmed for the *PbACO*. Spheroplasts of *P. brasiliensis* were efficiently produced and purified mitochondria and peroxisomes fractions were obtained. Western blotting assays performed with proteins from several cell fractions confirmed the presence of *PbACO* secreted in the culture filtrate, cell wall, membrane, mitochondria and peroxisomes. In eukaryotic cells the phenomenon of dual localization of proteins has been described (Karniely and Pines, 2005). Mutants of *S. cerevisiae*, in which MTS from ACO and fumarase were exchanged, showed an altered distribution of both proteins, indicating that in addition to protein addressing, the MTS may determine the level of retrograde movement of proteins to the cytosol (Regev-Rudzki, et al., 2009).

*P. brasiliensis*, isolate *Pb01*, contains two distinct aconitase genes according analyses in the *Pb01* structural genome from the Broad Institute of MIT and Harvard ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis.1/MultiHome.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis.1/MultiHome.html)). The another aconitase gene encodes a predicted protein with 799 amino acids and the alignment of the deduced amino acid sequences between the two *P. brasiliensis* aconitases showed 57% identity (Data not shown).

Vesicular secretion is an important mechanism used by many fungi to transport molecules from the intracellular to the extracellular spaces (van Meer and Sprong, 2004). In *H. capsulatum* and *C. neoformans* it have been identified putative cytosolic proteins in secretory vesicles (Albuquerque, et al., 2008; Nosanchuk, et al., 2008; Rodrigues, et al., 2008). Studies performed in our laboratory showed the presence of proteins with predicted cytoplasmic localization in other cellular compartments of *P. brasiliensis* cells, such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - GAPDH (Barbosa, et al., 2006) and triosephosphate isomerase - TPI (Pereira, et al., 2007), both located in the cytoplasm and in cell wall. The fact that the enzyme aconitase has been

found in secreted vesicles by *H. capsulatum* (Albuquerque, et al., 2008) corroborate our finding of the *PbACO* location in cell wall and beyond, in the extracellular space.

Increased expression of genes coding for GC enzymes in *P. brasiliensis*, both in the process of cell differentiation and in the initial events of the infection establishment has been reported. The reaction catalyzed by aconitase provides the substrate for the ICL. In *P. brasiliensis* the gene that encodes the ICL was more expressed both during the differentiation of mycelium to yeast cells and in yeast cells derived from infected tissues (Bastos, et al., 2007; Costa, et al., 2007). High level of transcripts was also reported for the gene that encodes malate synthase of *P. brasiliensis* (*Pbmls*) when the fungus is grown in the presence of two carbon atoms sources (2C) (Zambuzzi-Carvalho, et al., 2009). Our results demonstrated a significant increase in levels of accumulated *PbACO* and *Pbaco*, when *P. brasiliensis* was cultured in medium containing acetate and ethanol instead of glucose as carbon source.

The free iron in tissues and fluids of vertebrate hosts is maintained at extremely low levels. The influence of iron deprivation on expression of iron-sulfur proteins has been documented in several systems and may represent a conserved response (Eisenstein and Ross, 2003; Kiley and Beinert, 2003). An increased expression of the ACO under high concentration of iron was reported in *M. tuberculosis* (Wong, et al., 1999) and in *C. neoformans* (Lian, et al., 2005). *Leishmania donovani* seems to be able to manipulate the mechanisms of iron absorption from the host for their growth through the IRPs activation (Das, et al., 2009). The mitochondrial aconitase of *P. brasiliensis* presented at both the transcriptional as translational levels, significant induction in conditions of high iron concentrations and significant repression in lack of iron. These results reinforce the questioning of the possible role of *PbACO* in the regulation of iron levels mechanisms.

## References

- Albuquerque, P. C., Nakayasu, E. S., Rodrigues, M. L., Frases, S., Casadevall, A., Zancoppe-Oliveira, R. M., Almeida, I. C. and Nosanchuk, J. D. (2008). Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes, pp. 1695 - 1710.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-10.
- Barbosa, M. S., Bao, S. N., Andreotti, P. F., de Faria, F. P., Felipe, M. S., Feitosa, L. S., Mendes-Giannini, M. J. and Soares, C. M. (2006). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* 74, 382-9.
- Bastos, K. P., Bailao, A. M., Borges, C. L., Faria, F. P., Felipe, M. S., Silva, M. G., Martins, W. S., Fiuza, R. B., Pereira, M. and Soares, C. M. (2007). The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* 7, 29.
- Bookout, A. L., Cummins, C. L., Mangelsdorf, D. J., Pesola, J. M. and Kramer, M. F. (2006). High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 15, Unit 15 8.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.

Castro, N. S., Barbosa, M. S., Maia, Z. A., Bao, S. N., Felipe, M. S., Santana, J. M., Soares Mendes-Giannini, M. J., Pereira, M. and de Almeida Soares, C. M. (2008). Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* PbDfg5p, a cell-wall protein implicated in filamentous growth. *Yeast* 25, 141-54.

Costa, M., Borges, C. L., Bailao, A. M., Meirelles, G. V., Mendonca, Y. A., Dantas, S. F., de Faria, F. P., Felipe, M. S., Molinari-Madlum, E. E., Mendes-Giannini, M. J., Fiuza, R. B., Martins, W. S., Pereira, M. and Soares, C. M. (2007).

Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology* 153, 4194-207.

Damveld, R. A., Arentshorst, M., VanKuyk, P. A., Klis, F. M., van den Hondel, C. A. and Ram, A. F. (2005). Characterisation of CwpA, a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall mannoprotein in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Fungal Genet Biol* 42, 873-85.

Dantas, S. F., Vieira de Rezende, T. C., Bailao, A. M., Taborda, C. P., da Silva Santos, R., Pacheco de Castro, K. and Maria de Almeida Soares, C. (2009). Identification and characterization of antigenic proteins potentially expressed

- during the infectious process of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 11, 895-903.
- Das, N. K., Biswas, S., Solanki, S. and Mukhopadhyay, C. K. (2009). *Leishmania donovani* depletes labile iron pool to exploit iron uptake capacity of macrophage for its intracellular growth. *Cell Microbiol* 11, 83-94.
- Eisenstein, R. S. and Ross, K. L. (2003). Novel roles for iron regulatory proteins in the adaptive response to iron deficiency. *J Nutr* 133, 1510S-6S.
- Felipe, M. S., Andrade, R. V., Arraes, F. B., Nicola, A. M., Maranhao, A. Q., Torres, F. A., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M. J., Campos, E. G., Moraes, L. M., Andrade, P. A., Tavares, A. H., Silva, S. S., Kyaw, C. M., Souza, D. P., Pereira, M., Jesuino, R. S., Andrade, E. V., Parente, J. A., Oliveira, G. S., Barbosa, M. S., Martins, N. F., Fachin, A. L., Cardoso, R. S., Passos, G. A., Almeida, N. F., Walter, M. E., Soares, C. M., Carvalho, M. J. and Brigido, M. M. (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* 280, 24706-14.
- Fonseca, C. A., Jesuino, R. S., Felipe, M. S., Cunha, D. A., Brito, W. A. and Soares, C. M. (2001). Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 3, 535-42.
- Grimaldi de Jimenez, G., Yegres, F. and San-Blas, F. (1979). Liberation of protoplasts from the yeast-like form of *Paracoccidioides brasiliensis* by enzymatic treatment. *Sabouraudia* 17, 279-85.

- Gruer, M. J., Artymiuk, P. J. and Guest, J. R. (1997). The aconitase family: three structural variations on a common theme. *Trends Biochem Sci* 22, 3-6.
- Kanetsuna, F. and Carbonell, L. M. (1966). Enzymes in glycolysis and the citric acid cycle in the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 92, 1315-20.
- Karniely, S. and Pines, O. (2005). Single translation - dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. *EMBO Rep* 6, 420-5.
- Kiley, P. J. and Beinert, H. (2003). The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6, 181-5.
- Kunze, M., Kragler, F., Binder, M., Hartig, A. and Gurvitz, A. (2002). Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. *Eur J Biochem* 269, 915-22.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lian, T., Simmer, M. I., D'Souza, C. A., Steen, B. R., Zuyderduyn, S. D., Jones, S. J., Marra, M. A. and Kronstad, J. W. (2005). Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 55, 1452-72.

- Narahari, J., Ma, R., Wang, M. and Walden, W. E. (2000). The aconitase function of iron regulatory protein 1. Genetic studies in yeast implicate its role in iron-mediated redox regulation. *J Biol Chem* 275, 16227-34.
- Nosanchuk, J. D., Nimrichter, L., Casadevall, A. and Rodrigues, M. L. (2008). A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. *Commun Integr Biol* 1, 37-39.
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-21.
- Pereira, L. A., o, S., nia, N., Barbosa, M., nica, S., da Silva, J. L. M., Felipe, M. S. S., de Santana, J. M., Mendes-Giannini, M. J., S, de Almeida Soares, C. and lia, M. (2007). Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Research* 7, 1381-1388.
- Regev-Rudzki, N., Battat, E., Goldberg, I. and Pines, O. (2009). Dual localization of fumarase is dependent on the integrity of the glyoxylate shunt. *Mol Microbiol* 72, 297-306.
- Restrepo, A. (2006). *Coccidioides immitis* rixford et gilchrist 1895, y *Paracoccidioides brasiliensis* (splendore 1912) almeida 1930: dos hongos patógenos restringidos al Continente Americano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 30, 367-386.
- Restrepo, A. and Jimenez, B. E. (1980). Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol* 12, 279-81.

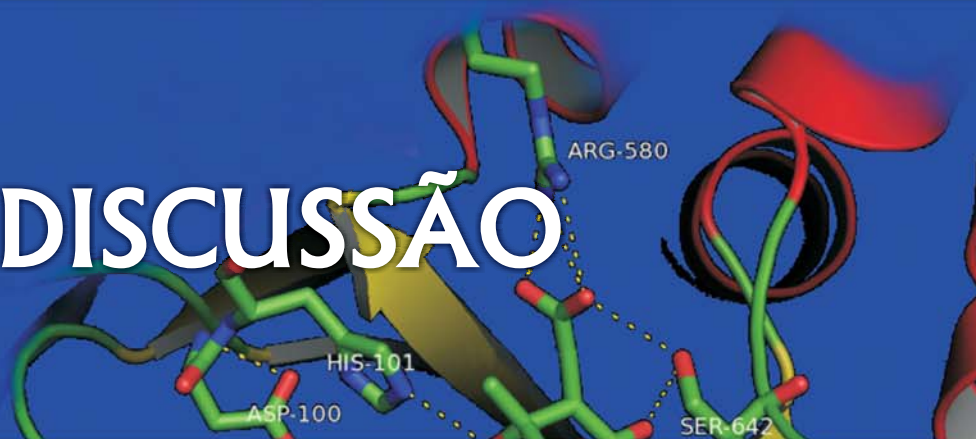
- Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C. and Casadevall, A. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 7, 58-67.
- Salem-Izacc, S. M., Jesuino, R. S., Brito, W. A., Pereira, M., Felipe, M. S. and Soares, C. M. (1997). Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in stage-specific forms and during cellular differentiation. *J Med Vet Mycol* 35, 205-11.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-82.
- van Meer, G. and Sprong, H. (2004). Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr Opin Cell Biol* 16, 373-8.
- Velot, C., Lebreton, S., Morgunov, I., Usher, K. C. and Srere, P. A. (1999). Metabolic Effects of Mislocalized Mitochondrial and Peroxisomal Citrate Synthases in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 38, 16195-16204.
- Villafranca, J. J. and Mildvan, A. S. (1972). The mechanism of aconitase action. 3. Detection and properties of enzyme-metal-substrate and enzyme-metal-inhibitor bridge complexes with manganese(II) and iron(II). *J Biol Chem* 247, 3454-63.

Wong, D. K., Lee, B. Y., Horwitz, M. A. and Gibson, B. W. (1999). Identification of fur, aconitase, and other proteins expressed by *Mycobacterium tuberculosis* under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Infect Immun* 67, 327-36.

Zambuzzi-Carvalho, P. F., Cruz, A. H., Santos-Silva, L. K., Goes, A. M., Soares, C. M. and Pereira, M. (2009). The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. *Med Mycol*, 1-12.

Zheng, L., Andrews, P. C., Hermodson, M. A., Dixon, J. E. and Zalkin, H. (1990). Cloning and structural characterization of porcine heart aconitase. *J Biol Chem* 265, 2814-21.

# IV- DISCUSSÃO



#### IV. DISCUSSÃO

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo polimórfico que transita entre a fase miceliana, com hifas septadas e ramificadas, e a fase leveduriforme, com células esféricas ou ovais apresentando múltiplos brotamentos. O fenômeno de diferenciação é observado *in vitro* exclusivamente pela mudança da temperatura de incubação de 26 °C para 36 °C. Esta habilidade de transição se constitui em condição essencial para o estabelecimento da infecção, uma vez que conídios ou fragmentos de hifas se convertem à morfologia leveduriforme horas após terem sido inalados pelo hospedeiro humano (ARISTIZABAL *et al.*, 1998). Salem-Izacc e colaboradores (1997) em estudos iniciais de proteômica, buscando a identificação de proteínas diferencialmente expressas nas fases miceliana e leveduriforme, verificaram que uma proeminente proteína de ponto isoelétrico (pI) 7,79 e massa molecular de 80kDa era preferencialmente expressa na forma leveduriforme de *P. brasiliensis*. O presente trabalho iniciou-se com o isolamento desta proteína a partir do gel de eletroforese bidimensional e sua caracterização parcial pelo sequenciamento de um peptídeo interno. Estudos comparativos da sequência polipeptídica obtida em bancos de dados revelaram alta homologia com a aconitase mitocondrial de diversos organismos.

ACO atua como uma enzima que catalisa a isomerização do ácido cítrico em ácido isocítrico tanto no CK quanto no CG, vias bem estabelecidas do metabolismo energético. O CG permite a síntese de ácidos dicarboxílicos com 4 átomos carbonos (4C) a partir de acetil-CoA, um atalho de duas reações de descarboxilação quando comparado ao CK. Estes metabólitos intermediários de 4C podem ser usados na neoglicogênese e em outras vias biossintéticas. O CG também pode usar compostos com 2C (como acetato e etanol) e os ácidos graxos como fonte de carbono (VELOT *et al.*, 1999). Felipe e colaboradores (2005) reportaram uma possível mudança no perfil do metabolismo energético apresentado por *P. brasiliensis* em suas distintas fases miceliana e leveduriforme, de aeróbico para anaeróbico, com a desativação do CK e ativação do CG, respectivamente. Bastos e colaboradores (2007) a partir de análises transcricionais sugeriram que o CG pode estar ativado durante o processo de diferenciação dimórfica de micélio para levedura em *P. brasiliensis*, uma vez que os cDNAs codificantes para as enzimas citrato sintase, aconitase, isocitrato liase e malato desidrogenase foram identificados no transcriptoma de *P. brasiliensis* durante a transição dimórfica. Também

em células leveduriformes de *P. brasiliensis* derivadas de tecidos de camundongos infectados os transcritos codificantes para as enzimas envolvidas no metabolismo anaeróbio foram encontrados em níveis elevados, sugerindo que o etanol pode se tornar uma importante fonte de carbono e que o CG pode estar ativo durante o processo de infecção (COSTA *et al.*, 2007). Esses dados somados à prévia identificação de expressão preferencial da *PbACO* na fase leveduriforme motivaram o presente estudo.

No presente trabalho a sequência codificante para *PbACO* foi obtida de uma biblioteca de cDNA construída a partir de RNA extraído durante a transição dimórfica de *P. brasiliensis* (BASTOS *et al.*, 2007). A análise da predita *PbACO* revelou uma proteína constituída de 779 aminoácidos, 84,8kDa e *pI*=6,97, dados consistentes com os registrados para ACOs já descritas em outros sistemas. A proteína predita homologia com aconitases de outros fungos, somando-se o fato de terem sido encontrados todos os aminoácidos correspondentes ao domínio catalítico de aconitases mitocondriais bem como a assinatura da proteína. O peptídeo interno da aconitase de *P. brasiliensis*, inicialmente sequenciado a partir do fragmento obtido pela digestão com endopeptidase Lys-C da proteína isolada do gel bidimensional, foi encontrado na íntegra. A identificação de um peptídeo sinal para mitocôndria com uma alta probabilidade de exportação indica que *PbACO* possivelmente desempenha em *P. brasiliensis* o seu papel metabólico no CK.

Objetivando a caracterização da aconitase de *P. brasiliensis* foi produzida e purificada uma proteína recombinante, correspondente aos resíduos de aminoácidos 313 a 545 da *PbACO*. A proteína recombinante foi utilizada para a produção de anticorpo policlonal em camundongos. As análises realizadas por *Western blotting* mostraram que o anticorpo foi capaz de reconhecer tanto a proteína recombinante quanto uma espécie protéica de 80kDa no extrato de células leveduriformes e de micélio de *P. brasiliensis*, sendo que a reação foi claramente mais intensa com o extrato de células leveduriformes. As análises por qRT-PCR mostraram que o transcrito de *PbACO* aumenta significativamente durante a conversão de micélio para levedura. Este fato sugere a participação do gene em uma possível mudança no metabolismo energético das leveduras de *P. brasiliensis*, talvez pela ativação do CG a fim de viabilizar a manutenção da forma leveduriforme em condições de anaerobiose. O anticorpo produzido também foi eficiente no reconhecimento da *PbACO* em ensaios de *Western blotting* a partir de géis bidimensionais. Foi confirmada a massa molecular de 80kDa e o *pI* de 7,79. A confirmação desses dados foi realizada por meio de espectrometria de massas e os resultados identificaram a proteína subtraída do gel bidimensional como a aconitase mitocondrial de *P. brasiliensis*.

Ensaio de imunolocalização da proteína foram realizados utilizando o anticorpo policlonal anti-aconitase, tanto por meio de microscopia eletrônica de transmissão quanto através de *Western blotting* com extratos protéicos de diferentes frações celulares. Os resultados dos experimentos com microscopia eletrônica mostraram que a proteína apresenta uma localização similar em células leveduriformes e em micélio, porém é mais abundante em células leveduriformes de *P. brasiliensis*, ratificando os resultados anteriores obtidos por *Western blotting* e por qRT-PCR. A esperada dupla localização entre mitocôndria e o citosol foi confirmada para a PbACO, porém a proteína também foi encontrada na parede celular e no espaço extracelular. Esferoplastos de *P. brasiliensis* foram eficientemente produzidos e frações celulares purificadas de mitocôndrias e peroxissomos foram obtidas. Os ensaios de *Western blotting* realizados com proteínas de diferentes frações celulares confirmaram a presença da PbACO secretada no filtrado de cultura, na parede celular, na membrana citoplasmática, nas mitocôndrias e nos peroxissomos.

Nas células eucarióticas o fenômeno da dupla localização de proteínas tem se mostrado mais abundante do que relatado inicialmente. No entanto, o completo entendimento dos vários mecanismos subjacentes a esta dupla de localização de produtos simples de tradução continua longe de ser alcançado (KARNIELY, 2005). Mutantes de *S. cerevisiae*, em que MTS da ACO e Fumarase foram trocados, mostraram uma distribuição alterada para ambas as proteínas, fato particularmente verdadeiro para ACO que exibiu uma extraordinária quantidade de proteínas processadas no citosol. Esses dados apontaram que, além de endereçarem a proteína MTS podem determinar o nível de movimento retrógrado de proteínas para o citosol (REGEV-RUDZKI *et al.*, 2009).

Os trabalhos com peroxissomos isolados de cotilédones senescentes de abóbora mostraram que naquela organela não há produção de ácido cítrico quando o ácido isocítrico é convertido a malato por ação da isocitrato liase (ICL, EC 4.1.3.1) e malato sintase (MLS, CE 2.3.3.9). Foi proposta a localização citosólica para a ACO uma vez que a sua atividade não foi encontrada em frações de peroxissomos. A ausência da ACO em peroxissomos implica em um fluxo de ácidos orgânicos através da membrana dos peroxissomos quando o CG estiver ativo. Alternativamente foi sugerido que a enzima pode não ser detectável, até mesmo quando ela está ativa nos peroxissomos, possivelmente por se apresentar em baixas concentrações ou mesmo ter sido inativada durante o processo de isolamento da organela (PISTELLI *et al.*, 1995). Nossos resultados obtidos com o anticorpo policlonal específico anti-aconitase de *P. brasiliensis* apontam, pela primeira vez em fungos, a localização peroxissomal desta enzima.

A secreção de fatores de virulência é um mecanismo utilizado por diferentes agentes patogênicos. Os fungos possuem paredes celulares complexas e exigem complexos mecanismos de secreção ainda não totalmente conhecidos. A secreção vesicular é um importante mecanismo que muitos fungos utilizam objetivando o transporte de moléculas do espaço intracelular para o espaço extracelular (VAN MEER *et al.*, 2004). Nos fungos *H. capsulatum* e *C. neoformans* foram identificadas algumas proteínas, presumidamente citoplasmáticas, em vesículas de secreção (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008; NOSANCHUK *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008). Várias dessas moléculas presentes nas vesículas são enzimas da via glicolítica tais como frutose1,6-bifosfato, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e triose fosfato isomerase. Trabalhos recentes realizados em nosso laboratório mostraram a presença de proteínas com localização citoplasmática predita em outros compartimentos celulares de *P. brasiliensis*, como a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) (BARBOSA *et al.*, 2006) e a triosefosfato isomerase (TPI) (PEREIRA *et al.*, 2007), ambas localizadas no citoplasma e na parede celular. O fato de a enzima aconitase ter sido encontrada em vesículas secretadas por *H. capsulatum* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008), corrobora nosso resultado da localização da aconitase de *P. brasiliensis* na parede celular e fora dela, no espaço extracelular. O papel dessas proteínas secretadas por fungos através de vesículas não está bem definido, embora muitas dessas proteínas terem sido identificadas como fatores de virulência e as vesículas denominadas “bolsas de fatores de virulência” no contexto das interações entre fungos patogênicos e seus hospedeiros (NOSANCHUK *et al.*, 2008).

O aumento da expressão de genes que codificam para enzimas do CG em *P. brasiliensis*, tanto no processo de diferenciação celular como nos eventos iniciais para o estabelecimento da infecção tem sido reportado. A reação catalisada pela aconitase fornece o substrato para a enzima ICL. Em *P. brasiliensis* o gene que codifica a ICL se mostrou mais expresso tanto durante o processo de diferenciação de micélio para levedura quanto em tecidos infectados (BASTOS *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2007). Elevado nível de transcritos também foi reportado para o gene que codifica a malato sintase de *P. brasiliensis* (*Pbmls*) quando o fungo é cultivado na presença de fontes com dois átomos de carbono (2C) (ZAMBUZZI-CARVALHO *et al.*, 2009). Nossos resultados obtidos através *Western blotting* e de qRT-PCR apontam para um expressivo aumento tanto nos níveis de *PbACO* acumulada quanto nos níveis de transcritos de *Pbaco*, quando *P. brasiliensis* é cultivado em meio contendo acetato e etanol em relação a condição de presença de glicose como fonte de carbono. Esses resultados reforçam a hipótese de que em leveduras de *P. brasiliensis* o comportamento anaeróbio é

exacerbado na mudança do metabolismo de carboidrato para produção de etanol, como descrito no transcriptoma *in vitro* (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>).

Em várias doenças infecciosas o ferro livre nos tecidos e fluidos dos hospedeiros vertebrados é mantido em níveis extremamente baixos. Assim, a capacidade de aquisição de ferro pelos patógenos tem sido relatada como um importante fator de virulência. A influência da privação de ferro na expressão de proteínas ferro-enxofre tem sido documentada em vários sistemas e pode representar uma resposta conservada (EISENSTEIN, 2000; KILEY *et al.*, 2003). Um aumento do nível de expressão da ACO sob alta concentração de ferro foi relatado em *M. tuberculosis* e foi proposto que a proteína deve desempenhar um papel fundamental na fisiopatologia da tuberculose (WONG *et al.*, 1999). Também foi demonstrado que o excesso de ferro promove a exacerbação de meningite em um modelo animal de infecção cerebral por *C. neoformans* (BARLUZZI *et al.*, 2002) sendo que a expressão da ACO naquele patógeno apresenta-se aumentada quando ele se encontra em condições de alta concentração de ferro (LIAN *et al.*, 2005). *Leishmania donovani* parece ser capaz de manipular os mecanismos de absorção de ferro do hospedeiro para o seu crescimento por meio da ativação de IRPs (DAS *et al.*, 2009). A aconitase mitocondrial de *P. brasiliensis* apresentou, tanto em nível transcricional quando traducional, significativa indução em condições de altas concentrações de ferro e significativa repressão em condições de ausência de ferro. Esses resultados reforçam o interesse na possível participação da aconitase mitocondrial de *P. brasiliensis* nos mecanismos de regulação dos níveis de ferro intracelular.

# V- CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS



## V. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A complexidade biológica de *P. brasiliensis* inclui os eventos moleculares que possibilitam sua sobrevivência ao interagir com o hospedeiro humano. A proteína aconitase, inicialmente relacionada apenas ao metabolismo energético, tanto em procaritos quanto em eucariotos, tem sido descrita como uma molécula multifuncional também envolvida nos mecanismos de virulência incluindo aqueles relacionados com a evasão aos sistemas de defesa do hospedeiro.

Neste trabalho a aconitase mitocondrial de *P. brasiliensis* (*PbACO*) foi investigada pela primeira vez. O cDNA completo foi obtido. A proteína predita apresentou homologia com aconitases mitocondriais de outros fungos. Um anticorpo policlonal específico anti-*PbACO* foi produzido. Análises por *Western blotting* e imunocitocalização foram executadas e *PbACO* mostrou uma ampla distribuição incluindo o citosol, mitocôndria, peroxissomos, parede e espaço extracelular. Foram investigadas a influência da diferenciação celular micélio-levedura, da disponibilidade de fontes com dois átomos de carbono e de diferentes concentrações de ferro na regulação transcricional e traducional da *PbACO*. Nossos resultados sugerem que a transcrição e o acúmulo da proteína foram induzidos durante a transição micélio-levedura e também quando o fungo foi incubado com acetato ou etanol como fontes de carbono ou em altas concentrações ferro, sendo todos esses eventos considerados cruciais para a exibição de um fenótipo patogênico.

Entre as perspectivas geradas pela análise dos resultados deste estudo enumera-se:

- Caracterizar enzimaticamente a aconitase mitocondrial de *P. brasiliensis*.
- Estudar as prováveis interações da *PbACO* com outras proteínas de *P. brasiliensis* utilizando a metodologia de duplo-híbrido.
- Ampliar o conhecimento do papel funcional da *PbACO* utilizando a metodologia de RNA interferente.
- Deleção do gene *Pbaco* e comparação da virulência entre o mutante e o isolado selvagem.
- Caracterização estrutural da *PbACO* através de métodos cristalográficos e modelagem molecular.
- Caracterizar e avaliar o papel funcional do outro gene codificante para aconitase presente no genoma de *P. brasiliensis*.

# VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJELLO, L.; POLONELLI, L. Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. **Eur J Epidemiol** 1(3): 160-165, 1985.

ALMEIDA, A. J.; MATUTE, D. R.; CARMONA, J. A.; MARTINS, M.; TORRES, I.; MCEWEN, J. G.; RESTREPO, A.; LEO, C.; LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F. Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis. **Fungal Genet Biol** 44(1): 25-31, 2007.

ARISTIZABAL, B. H.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infect Immun** 66(11): 5587-5591, 1998.

BARBOSA, M. S.; BAO, S. N.; ANDREOTTI, P. F.; DE FARIA, F. P.; FELIPE, M. S.; FEITOSA, L. S.; MENDES-GIANNINI, M. J.; SOARES, C. M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infect Immun** 74(1): 382-389, 2006.

BARLUZZI, R.; SALEPPICO, S.; NOCENTINI, A.; BOELAERT, J. R.; NEGLIA, R.; BISTONI, F.; BLASI, E. Iron overload exacerbates experimental meningoencephalitis by *Cryptococcus neoformans*. **J Neuroimmunol** 132(1-2): 140-146, 2002.

BASTOS, K. P.; BAILAO, A. M.; BORGES, C. L.; FARIA, F. P.; FELIPE, M. S.; SILVA, M. G.; MARTINS, W. S.; FIUZA, R. B.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC Microbiol** 7: 29, 2007.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infect Immun** 57(8): 2289-2294, 1989.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. *Paracoccidioidomycosis*: an update. **Clin Microbiol Rev** 6(2): 89-117, 1993.

CARRERO, L. L.; NINO-VEGA, G.; TEIXEIRA, M. M.; CARVALHO, M. J.; SOARES, C. M.; PEREIRA, M.; JESUINO, R. S.; MCEWEN, J. G.; MENDOZA, L.; TAYLOR, J. W.; FELIPE, M. S.; SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol** 45(5): 605-612, 2008.

CHEN, X. J.; WANG, X.; KAUFMAN, B. A.; BUTOW, R. A. Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. **Science** 307(5710): 714-717, 2005.

CHIKAMORI, T.; SAKA, S.; NAGANO, H.; SAEKI, S.; LACAZ CDA, S.; RODRIGUES, M. C.; CASSAGUERRA, C. M.; BRACCIALLI, M. L. *Paracoccidioidomycosis* in Japan. Report of a case. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 26(5): 267-271, 1984.

CONTI-DIAZ, I. A. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 49(2): 131-134, 2007.

CORREDOR, G. G.; PERALTA, L. A.; CASTANO, J. H.; ZULUAGA, J. S.; HENAO, B.; ARANGO, M.; TABARES, A. M.; MATUTE, D. R.; MCEWEN, J. G.; RESTREPO, A. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Med Mycol** 43(3): 275-280, 2005.

COSTA, M.; BORGES, C. L.; BAILAO, A. M.; MEIRELLES, G. V.; MENDONCA, Y. A.; DANTAS, S. F.; DE FARIA, F. P.; FELIPE, M. S.; MOLINARI-MADLUM, E. E.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FIUZA, R. B.; MARTINS, W. S.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. **Microbiology** 153(Pt 12): 4194-4207, 2007.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica** 18(5): 1441-1454, 2002.

DAS, N. K.; BISWAS, S.; SOLANKI, S.; MUKHOPADHYAY, C. K. Leishmania donovani depletes labile iron pool to exploit iron uptake capacity of macrophage for its intracellular growth. **Cell Microbiol** 11(1): 83-94, 2009.

DE BRITO, T.; FRANCO, M. F. Granulomatous inflammation. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 36(2): 185-192, 1994.

EISENSTEIN, R. S. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. **Annu Rev Nutr** 20: 627-662, 2000.

EMPTAGE, M. H.; DREYERS, J. L.; KENNEDY, M. C.; BEINERT, H. Optical and EPR characterization of different species of active and inactive aconitase. **J Biol Chem** 258(18): 11106-11111, 1983a.

EMPTAGE, M. H.; KENT, T. A.; KENNEDY, M. C.; BEINERT, H.; MUNCK, E. Mossbauer and EPR studies of activated aconitase: development of a localized valence state at a subsite of the [4Fe-4S] cluster on binding of citrate. **Proc Natl Acad Sci U S A** 80(15): 4674-4678, 1983b.

FEITOSA, L. S.; CISALPINO, P. S.; SANTOS, M. R.; MORTARA, R. A.; BARROS, T. F.; MORAIS, F. V.; PUCCIA, R.; SILVEIRA, J. F.; CAMARGO, Z. P. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol** 39(1): 60-69, 2003.

FELIPE, M. S.; ANDRADE, R. V.; PETROFEZA, S. S.; MARANHÃO, A. Q.; TORRES, F. A.; ALBUQUERQUE, P.; ARRAES, F. B.; ARRUDA, M.; AZEVEDO, M. O.; BAPTISTA, A. J.; BATAUS, L. A.; BORGES, C. L.; CAMPOS, E. G.; CRUZ, M. R.; DAHER, B. S.; DANTAS, A.; FERREIRA, M. A.; GHIL, G. V.; JESUINO, R. S.; KYAW, C. M.; LEITAO, L.; MARTINS, C. R.; MORAES, L. M.; NEVES, E. O.; NICOLA, A. M.; ALVES, E. S.; PARENTE, J. A.; PEREIRA, M.; POCAS-FONSECA, M. J.; RESENDE, R.; RIBEIRO, B. M.; SALDANHA, R. R.; SANTOS, S. C.; SILVA-PEREIRA, I.; SILVA, M. A.; SILVEIRA, E.; SIMOES, I. C.; SOARES, R. B.; SOUZA, D. P.; DE-SOUZA, M. T.; ANDRADE, E. V.; XAVIER, M. A.; VEIGA, H. P.; VENANCIO, E. J.; CARVALHO, M. J.; OLIVEIRA, A. G.;

INOUE, M. K.; ALMEIDA, N. F.; WALTER, M. E.; SOARES, C. M.; BRIGIDO, M. M. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. **Yeast** 20(3): 263-271, 2003.

FELIPE, M. S.; ANDRADE, R. V.; ARRAES, F. B.; NICOLA, A. M.; MARANHÃO, A. Q.; TORRES, F. A.; SILVA-PEREIRA, I.; POCAS-FONSECA, M. J.; CAMPOS, E. G.; MORAES, L. M.; ANDRADE, P. A.; TAVARES, A. H.; SILVA, S. S.; KYAW, C. M.; SOUZA, D. P.; PEREIRA, M.; JESUINO, R. S.; ANDRADE, E. V.; PARENTE, J. A.; OLIVEIRA, G. S.; BARBOSA, M. S.; MARTINS, N. F.; FACHIN, A. L.; CARDOSO, R. S.; PASSOS, G. A.; ALMEIDA, N. F.; WALTER, M. E.; SOARES, C. M.; CARVALHO, M. J.; BRIGIDO, M. M. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem** 280(26): 24706-24714, 2005.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol** 25(1): 5-18, 1987.

FRANCO, M.; SANO, A.; KERA, K.; NISHIMURA, K.; TAKEO, K.; MIYAJI, M. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 31(3): 151-157, 1989.

FRAZER, D. M.; ANDERSON, G. J. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? **Blood Cells Mol Dis** 30(3): 288-297, 2003.

GARCIA, N. M.; DEL NEGRO, G. M.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T.; DE ASSIS, C. M.; LACAZ CDA, S. [Paracoccidioides brasiliensis, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*)]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 35(3): 227-235, 1993.

GOLDMAN, G. H.; DOS REIS MARQUES, E.; DUARTE RIBEIRO, D. C.; DE SOUZA BERNARDES, L. A.; QUIAPIN, A. C.; VITORELLI, P. M.; SAVOLDI, M.; SEMIGHINI, C. P.; DE OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, R.; BATISTA, W. L.; FERREIRA, L. E.; MOREIRA, J. C.; BOGOSSIAN, A. P.; TEKAIA, F.; NOBREGA, M. P.; NOBREGA, F. G.; GOLDMAN, M. H. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. **Eukaryot Cell** 2(1): 34-48, 2003.

GONZALEZ, A.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Role of iron in the nitric oxide-mediated fungicidal mechanism of IFN-gamma-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 49(1): 11-16, 2007.

GRUER, M. J.; ARTYMIUK, P. J.; GUEST, J. R. The aconitase family: three structural variations on a common theme. **Trends Biochem Sci** 22(1): 3-6, 1997.

HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell** 117(3): 285-297, 2004.

JOHNSON, W. A. Aconitase. **Biochem J** 33(6): 1046-1053, 1939.

JOSEPH, E. A.; MARE, A.; IRVING, W. R., JR. Oral South American blastomycosis in the United States of America. Report of a case. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 21(6): 732-737, 1966.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M. Enzymes in glycolysis and the citric acid cycle in the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol** 92(5): 1315-1320, 1966.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M.; MORENO, R. E.; RODRIGUEZ, J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol** 97(3): 1036-1041, 1969.

KARNIELY, S. P., O. Single translation--dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. **EMBO Rep** 6(5): 420-425, 2005.

KAUFMAN, B. A.; NEWMAN, S. M.; HALLBERG, R. L.; SLAUGHTER, C. A.; PERLMAN, P. S.; BUTOW, R. A. In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97(14): 7772-7777, 2000.

KILEY, P. J.; BEINERT, H. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. **Curr Opin Microbiol** 6(2): 181-185, 2003.

KREBS, H. A.; JOHNSON, W. A. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. **FEBS Lett** 117 Suppl: K1-10, 1980.

KRUG, A.; WENDISCH, V. F.; BOTT, M. Identification of AcnR, a TetR-type repressor of the aconitase gene acn in *Corynebacterium glutamicum*. **J Biol Chem** 280(1): 585-595, 2005.

KUNZE, M.; KRAGLER, F.; BINDER, M.; HARTIG, A.; GURVITZ, A. Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. **Eur J Biochem** 269(3): 915-922, 2002.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERACOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 40(3): 125-135, 1998.

LACAZ, C. S.; E., P.; MARTINS, J. E. C. Paracoccidioidomycosis. In: \_\_\_\_\_. **Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier Editora, 1991. 248-261.

LIAN, T.; SIMMER, M. I.; D'SOUZA, C. A.; STEEN, B. R.; ZUYDERDUYN, S. D.; JONES, S. J.; MARRA, M. A.; KRONSTAD, J. W. Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol** 55(5): 1452-1472, 2005.

LORENZ, M. C.; FINK, G. R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature** 412(6842): 83-86, 2001.

MARTIUS, C.; KUOOP, F. Der physiologische Abbau der Citronensäure. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**. 246(1-2)1937.

MATUTE, D. R.; SEPULVEDA, V. E.; QUESADA, L. M.; GOLDMAN, G. H.; TAYLOR, J. W.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol** 44(6): 2153-2157, 2006.

MCCAMMON, M. T.; VEENHUIS, M.; TRAPP, S. B.; GOODMAN, J. M. Association of glyoxylate and beta-oxidation enzymes with peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol** 172(10): 5816-5827, 1990.

MISSALL, T. A.; LODGE, J. K.; MCEWEN, J. E. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. **Eukaryot Cell** 3(4): 835-846, 2004.

MORRISON, J. F. The purification of aconitase. **Biochem J** 56(1): 99-105, 1954.

MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J Med Microbiol** 40(3): 159-164, 1994.

NARAHARI, J.; MA, R.; WANG, M.; WALDEN, W. E. The aconitase function of iron regulatory protein 1. Genetic studies in yeast implicate its role in iron-mediated redox regulation. **J Biol Chem** 275(21): 16227-16234, 2000.

NEMECEK, J. C.; WUTHRICH, M.; KLEIN, B. S. Global control of dimorphism and virulence in fungi. **Science** 312(5773): 583-588, 2006.

NOSANCHUK, J. D.; NIMRICHTER, L.; CASADEVALL, A.; RODRIGUES, M. L. A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. **Commun Integr Biol** 1(1): 37-39, 2008.

PANIAGO, A. M.; AGUIAR, J. I.; AGUIAR, E. S.; DA CUNHA, R. V.; PEREIRA, G. R.; LONDERO, A. T.; WANKE, B. [Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul]. **Rev Soc Bras Med Trop** 36(4): 455-459, 2003.

PEREIRA, L. A.; O, S.; NIA, N.; BARBOSA, M.; NICA, S.; DA SILVA, J. L. M.; FELIPE, M. S. S.; DE SANTANA, J. M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; S; DE ALMEIDA SOARES, C.; LIA, M. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS Yeast Res** 7: 1381-1388, 2007.

PISTELLI, L.; DE BELLIS, L.; ALPI, A. Evidences of glyoxylate cycle in peroxisomes of senescent cotyledons. **Plant Science** 109(1): 13-21, 1995.

PITULA, J. S.; DECK, K. M.; CLARKE, S. L.; ANDERSON, S. A.; VASANTHAKUMAR, A.; EISENSTEIN, R. S. Selective inhibition of the citrate-to-isocitrate reaction of cytosolic aconitase by phosphomimetic mutation of serine-711. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101(30): 10907-10912, 2004.

REGEV-RUDZKI, N.; BATTAT, E.; GOLDBERG, I.; PINES, O. Dual localization of fumarase is dependent on the integrity of the glyoxylate shunt. **Mol Microbiol** 72(2): 297-306, 2009.

RESTREPO. *Coccidioides immitis* rixford et gilchrist 1895, y *Paracoccidioides brasiliensis* (splendore 1912) almeida 1930: dos hongos patógenos restringidos al Continente Americano. **Rev. Acad. Colomb. Cienc.** 30(116): 367-386, 2006.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, E. P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun** 46(2): 346-353, 1984.

RESTREPO, A.; TOBÓN, A. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: \_\_\_\_\_. **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. G. L. Mandell, Bennett, J.E., Dollin, R. Elsevier Churchill Livingstone, 2005. 3062–3068.

RICCI, G.; MOTA, F. T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R. C.; BORRA, R. C.; FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Med Mycol** 42(4): 379-383, 2004.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO SDE, M.; GRIESE, J.; THEODORO, R. C.; MACORIS, S. A.; DA SILVA, R. J.; BARROZO, L.; TAVARES, P. M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Med Mycol** 46(1): 35-40, 2008.

ROBBINS, A. H.; STOUT, C. D. Structure of activated aconitase: formation of the [4Fe-4S] cluster in the crystal. **Proc Natl Acad Sci U S A** 86(10): 3639-3643, 1989.

RODRIGUES, M. L.; NAKAYASU, E. S.; OLIVEIRA, D. L.; NIMRICHTER, L.; NOSANCHUK, J. D.; ALMEIDA, I. C.; CASADEVALL, A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryot Cell** 7(1): 58-67, 2008.

RUZICKA, F. J.; BEINERT, H. The soluble "high potential" type iron-sulfur protein from mitochondria is aconitase. **J Biol Chem** 253(8): 2514-2517, 1978.

SALEM-IZACC, S. M.; JESUINO, R. S.; BRITO, W. A.; PEREIRA, M.; FELIPE, M. S.; SOARES, C. M. Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in stage-specific forms and during cellular differentiation. **J Med Vet Mycol** 35(3): 205-211, 1997.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F.; RODRIGUEZ, L. E.; CASTRO, C. J. [A model of dimorphism in pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*]. **Acta Cient Venez** 38(2): 202-211, 1987.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol** 40(3): 225-242, 2002.

SASS, E.; BLACHINSKY, E.; KARNIELY, S.; PINES, O. Mitochondrial and cytosolic isoforms of yeast fumarase are derivatives of a single translation product and have identical amino termini. **J Biol Chem** 276(49): 46111-46117, 2001.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. Iron and microbial infection. **Nat Rev Microbiol** 2(12): 946-953, 2004.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO F DE, Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop** 39(3): 297-310, 2006.

SHLEVIN, L.; REGEV-RUDZKI, N.; KARNIELY, S.; PINES, O. Location-Specific Depletion of a Dual-Localized Protein. **Traffic** 8: 169-176, 2007.

TANG, Y.; GUEST, J. R. Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by *Escherichia coli* aconitases. **Microbiology** 145 ( Pt 11): 3069-3079, 1999.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; DE CARVALHO, M. J.; FERNANDES, L.; PAES, H. C.; HAHN, R. C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol** 52(2): 273-283, 2009.

THEODORO, R. C.; BAGAGLI, E.; OLIVEIRA, C. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. **Fungal Genet Biol** 45(9): 1284-1291, 2008.

VAN MEER, G.; SPRONG, H. Membrane lipids and vesicular traffic. **Curr Opin Cell Biol** 16(4): 373-378, 2004.

VARGHESE, S.; TANG, Y.; IMLAY, J. A. Contrasting sensitivities of *Escherichia coli* aconitases A and B to oxidation and iron depletion. **J Bacteriol** 185(1): 221-230, 2003.

VELOT, C.; LEBRETON, S.; MORGUNOV, I.; USHER, K. C.; SRERE, P. A. Metabolic Effects of Mislocalized Mitochondrial and Peroxisomal Citrate Synthases in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry** 38(49): 16195-16204, 1999.

VILLAFRANCA, J. J. M., A. S. The mechanism of aconitase action. 3. Detection and properties of enzyme-metal-substrate and enzyme-metal-inhibitor bridge complexes with manganese(II) and iron(II). **J Biol Chem** 247(11): 3454-3463, 1972.

VOLZ, K. The functional duality of iron regulatory protein 1. **Curr Opin Struct Biol** 18(1): 106-111, 2008.

WALDEN, W. E.; SELEZNEVA, A. I.; DUPUY, J.; VOLBEDA, A.; FONTECILLA-CAMPS, J. C.; THEIL, E. C.; VOLZ, K. Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. **Science** 314(5807): 1903-1908, 2006.

WANG, Y.; BOGENHAGEN, D. F. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. **J Biol Chem** 281(35): 25791-25802, 2006.

WONG, D. K.; LEE, B. Y.; HORWITZ, M. A.; GIBSON, B. W. Identification of fur, aconitase, and other proteins expressed by *Mycobacterium tuberculosis* under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Infect Immun** 67(1): 327-336, 1999.

ZAMBUZZI-CARVALHO, P. F.; CRUZ, A. H.; SANTOS-SILVA, L. K.; GOES, A. M.; SOARES, C. M.; PEREIRA, M. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 is required in the glyoxylate cycle and in the allantoin degradation pathway. **Med Mycol**: 1-12, 2009.

ZHENG, L.; ANDREWS, P. C.; HERMODSON, M. A.; DIXON, J. E.; ZALKIN, H. Cloning and structural characterization of porcine heart aconitase. **J Biol Chem** 265(5): 2814-2821, 1990.