

SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENE ATP2 DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Pereira, T.M.¹, Moral, F.A.F.¹, Nóbrega, F.G.¹

¹Laboratório de Genética Molecular e Genomas – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D UNIVAP
Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, 12244-000, São José dos Campos – SP tatiana@univap.br

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, ATPase2, genes completos
Área do Conhecimento: II – Ciências Biológicas

Resumo - O *Paracoccidioides brasiliensis* (PB), agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), é um organismo pleomórfico dependente da temperatura para manifestar sua morfologia. Com a transição da fase micelial para a leveduriforme verifica-se alterações na função mitocondrial acompanhadas das alterações morfológicas caracterizando a forma infectante. Neste trabalho apresentamos a estratégia de sequenciamento completo do gene ATP2 com 513 aminoácidos, utilizando iniciadores internos e o alinhamento desta proteína de PB com a proteína correspondente de outros 8 organismos descritos, através da hipótese de homologia posicional da proteína por múltiplo alinhamento, dentro do programa Clustal X versão 1.81, analisando as regiões conservadas e as não-conservadas.

Introdução

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose profunda ocasionada por um fungo dimórfico, *Paracoccidioides brasiliensis* (PB), que se apresenta na forma leveduriforme em temperatura de 37°C ou no hospedeiro, e a forma de micélio, ou bolor, que cresce em temperatura ambiente (23 a 28°C) ou em seu habitat (solo), sendo por isso denominado termodimórfico (Lacaz, 1994). A ocorrência da PCM é mais freqüente em indivíduos do sexo masculino sendo reduzida em mulheres adultas devido aos hormônios femininos que inibiriam a transição do fungo da fase micelial para a leveduriforme (Loose *et al.*, 1983).

Sobre a distribuição geográfica e o comportamento epidemiológico da PCM, podemos inferir que é característico de países da América Latina, onde se distribui de forma heterogênea, mesmo dentro das áreas endêmicas. Estudos dessas áreas mostram que a PCM é encontrada em locais de floresta úmida (tropicais e subtropicais), com temperatura variando entre 17 a 24°C e com índice pluviométrico elevado (800 a 200mm/ano). Estas regiões apresentam invernos curtos, grandes rios e verões chuvosos (Restrepo, 1985).

Quanto a forma de contágio há evidências de que o fungo penetre no hospedeiro

através das vias aéreas superiores sob a forma de propágulo da sua fase micelial que são encontrados na natureza, provocando um complexo primário pulmonar, de onde poderia,

então, ocorrer a disseminação hematogênica ou linfática para outros órgãos (Franco, 1987).

No organismo do hospedeiro, sob a influência da temperatura corpórea eles são convertidos em levedura (Medoff *et al.*, 1987). Essa transição da fase micelial para a leveduriforme, é dividida em três estágios: declínio parcial da fosforilação oxidativa, nos níveis celulares de ATP, na taxa de respiração e na concentração de componentes da cadeia transportadora de elétrons; cessamento da respiração e o estágio de recuperação, culminando com a transformação celular para a forma de levedura (Medoff *et al.*, 1987). Com base nesses dados fizemos o sequenciamento completo e o alinhamento do ATP2, gene nuclear de PB relacionado ao complexo da ATP sintase. Esse complexo é o responsável pela transdução da energia do gradiente eletroquímico gerado pelo bombeamento de prótons para fora da membrana interna com energia derivada do transporte eletrônico sendo esta energia transformada em energia química da ligação ADP + fosfato inorgânico gerando ATP (Saraste, 1999). A ATP sintase é formada por dois componentes, cada um constituído por várias cadeias polipeptídicas (Figura 1). Um porção esférica, chamada de fator de acoplamento 1, contém os sítios de síntese de ATP. A segunda porção, que confere sensibilidade a oligomicina, fica embebida na membrana interna, constituindo um canal através do qual os prótons retornam a matriz mitocondrial.

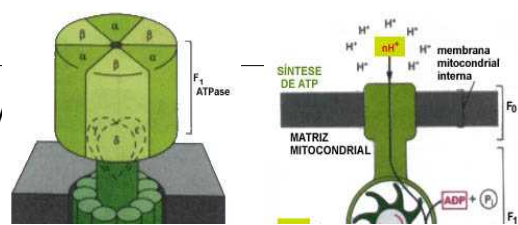


Figura 1: ATP sintase mostrando seus dois componentes (Fo e F1), juntamente com algumas das subunidades que a compõem (www.escolavesper.com.br/atp.htm)

É de grande interesse iniciar estudos genômicos de um fungo patogênico como o *P. brasiliensis*, para obter informações sobre a expressão gênica, organização do genoma, promotores, assim como complementar a descoberta de novos genes potencialmente importantes para compreender melhor a biologia deste organismo e sua patogenicidade.

Materiais e Métodos

A análise do clone ATP2 ("ESTs" - "Expressed Sequence Tags") gerado de mRNA preparado da fase leveduriforme de PB está clonado de maneira orientada no vetor pCMVSPORT6 da Invitrogen, foi feita buscando similaridade correspondente ao conjunto do gene de levedura reconhecidamente envolvido com a função da ATP sintase da membrana interna da mitocôndria, usando a proteína correspondente Atp2p (Yeast Proteome Database - Costanzo *et al.*, 2001). A seqüência de proteína desse gene, no formato FASTA, foi processada com a ferramenta BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool" Altschul *et al.*, 1997), usando o programa TBLASTN ("protein sequence against 6-frame nucleotide translated database sequences") disponível no portal do projeto na Internet de acesso restrito ("Pipeline *Paracoccidioides brasiliensis*" (<http://143.107.203.68/pbver2/default.html>)). Foram examinados todos os "hits" com E-value $\leq 10^{-5}$.

Usando iniciadores "reverse" e "forward" específicos do vetor de clonagem, foram feitas reações de sequenciamento em aparelho ABI 3100 de 16 capilares, segundo procedimento recomendado pela Applied Biosystems usando o conjunto para "cycle sequencing" – BigDye

Terminator". Sendo o clone ATP2 um gene grande com mais de 1500 bases, foram desenhados iniciadores internos para cobrir a parte interna das seqüências iniciais com o objetivo de formar um "contig" completo.

Foram desenhados dois iniciadores ("reverse" e "forward") utilizando o programa "OLIGO Primer Analysis Software" (Molecular Biology Insights, Inc). Após o sequenciamento completo do clone com o gene ATP2, suas seqüências foram analisadas com auxílio do programa Sequencher 3.1 (Gene Codes). A seqüência consenso foi submetida a ferramenta BLAST, usando o programa BLASTN, disponível no portal do NCBI ("National Center for Biotechnology Information").

O alinhamento do gene ATP2 de *Paracoccidioides brasiliensis* com outros organismos foi gerado através do algoritmo CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) dentro do programa BIOEDIT v.5.0.9 (Hall, 1999).

Resultados e Discussão

O sequenciamento completo do ATP2 foi concluído com um total de 12 seqüências, sendo 7 "forward" e 5 "reverse". Sendo assim obtivemos uma seqüência total de 513 aminoácidos para o gene ATP2 de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Analisando os "hits" obtidos tivemos similaridades de regiões com outros organismos como: *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), *Candida albicans* (*C. albicans*), *Neurospora crassa* (*N. crassa*), *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*), *Gibberella zeae* (*G. zeae*), *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*). Através de buscas no portal do NCBI obtivemos a seqüência do gene ATP2 de todos esses organismos.

O alinhamento múltiplo, mostrado abaixo parcialmente (Figura 2 e Figura 3), foi feito utilizando o programa Clustal X versão 1.81 (Thompson *et al.*, 1997), seguindo os valores sugeridos por Hall (2001).

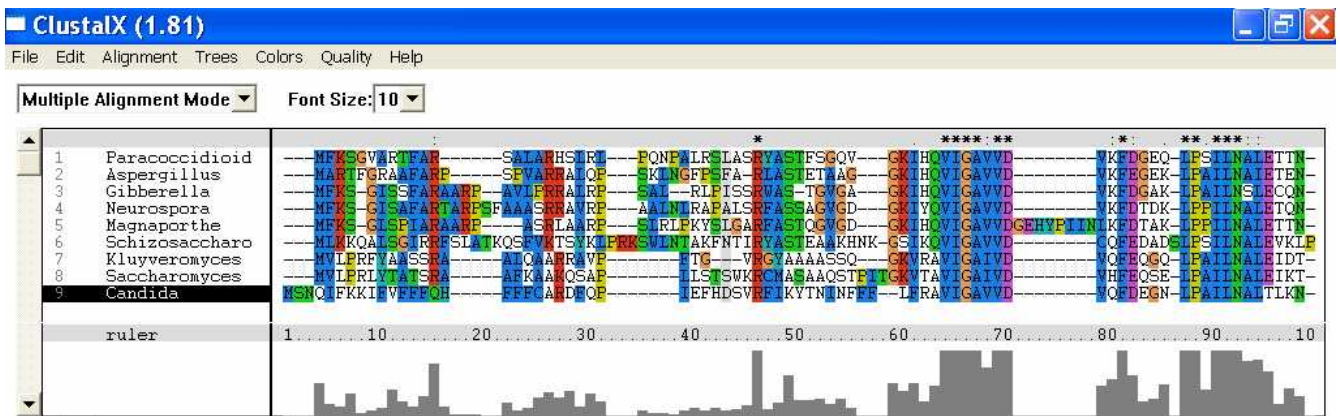


Figura 2: Alinhamento do fragmento inicial do gene ATP2 de *Paracoccidioides brasiliensis* com outros fungos similares, mostrando uma região não-conservada.

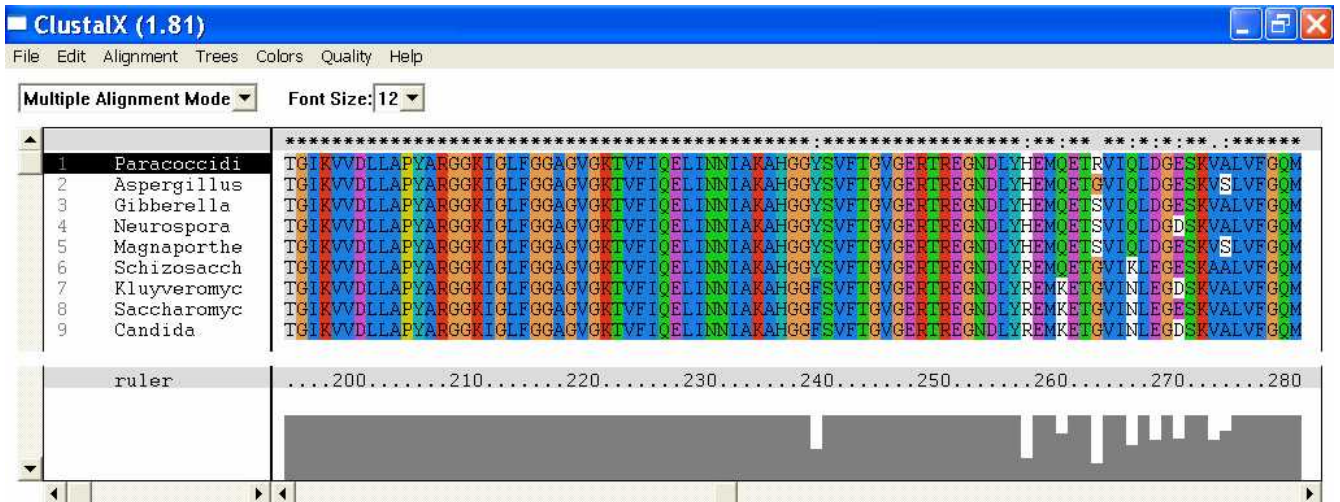


Figura 3: Alinhamento do fragmento mediano do gene ATP2 de *Paracoccidioides brasiliensis* com outros fungos similares, mostrando uma região altamente conservada.

Conclusão

Após o seqüenciamento completo do gene ATP2 de *Paracoccidioides brasiliensis*, foi possível constatar a diferença e a semelhança desse gene com outros fungos. Em *P. brasiliensis*, o ATP2 apresentou um total de 513 aminoácidos enquanto em *S. cerevisiae* apresenta 511 aminoácidos e em *N. crassa* 519 aminoácidos.

Além dessas observações em relação ao tamanho do gene, o fungo em questão também apresentou a similaridade esperada com a proteína de vários outros fungos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro concedido para a execução desse trabalho.

Referências

[1] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ Gapped. BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search Programs. **Nucl. Acids Res.** 25: 3389-3402. 1997.

[2] Costanzo, MC, Crawford, ME, Hirschman, JE, Kranz, JE, Olsen, P, Robertson, L.S Skrzypek, MS, Braun, BR, Hopkins, KL, Kondu, P, Lengieza, C, Lew-Smith, JE, Tillberg, M, Garrels, JI YPD™, PombePD™, and WormPD™: model organism volumes of the BioKnowledge™ library, an integrated resource for protein information. **Nucl. Acids Res.** 29: 75-9. 2001.

[3] Franco, M. Host parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.** 25: 5-18. 1987.

[4] Hall, B.G. Phylogenetics Trees Made Easy. A How to Manual for Molecular Biologists. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. Massachusetts. 179p. 2001.

[5] Lacaz CS. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its ethiologic agent. In Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G. Paracoccidioidomycosis. **Eds. CRC Press EUA**, pp. 1-11. 1994.