

# CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E SEQUENCIAMENTO DE FRAGMENTOS GENÔMICOS DO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* B02 E C04.

Andréa de Godoy Csoknyai; Marina Passeto Nóbrega

Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos – SP, Brasil

**Resumo:** *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo patogênico, termo-dimórfico, agente etiológico da paracoccidiomicose; micose sistêmica prevalente na América Latina. Os clones Pb B02 e C04, obtidos de uma biblioteca genômica do laboratório de Biologia Molecular e Genoma da UNIVAP, foram seqüenciados totalmente, e essas informações e contribuem para a organização genômica do *Paracoccidioides brasiliensis*.

**Palavras – chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, transposon, genome.

**Área de conhecimento** – Ciências Biológicas

## INTRODUÇÃO

A citocromo c oxidase é a enzima terminal da cadeia transportadora de elétrons. Em *Saccharomyces cerevisiae* este complexo enzimático é constituído de onze subunidades sendo que as três maiores que formam o corpo catalítico da enzima (Cox1p, Cox2p e Cox3p) são codificadas pelo DNA mitocondrial e as oito subunidades restantes são codificadas pelo DNA nuclear, traduzidas no citoplasma e importadas para a organela. Além das subunidades estruturais outras dezenas de proteínas são necessárias para a montagem e manutenção da holoenzima funcional [1,2].

A proteína Cox15p está envolvida na montagem do grupo heme A do complexo da citocromo sendo necessária para a hidroxilação do heme O na síntese do heme A; grupo prostético essencial à citocromo oxidase [3]. O mutante nulo é viável e incapaz de crescer em meio com fontes de carbono não fermentáveis [4]. Aproximadamente vinte mil ESTs – Expressed Sequence Tags de *P. brasiliensis* estão disponíveis nos bancos de dados do GeneBank/NCBI [5,6,7]. O gene PbCOX15 de *P. brasiliensis* foi identificado in silico através de comparação de similaridade com a proteína ScCox15p de *S. cerevisiae* utilizando a ferramenta TBLASTn. O objetivo deste trabalho é mostrar a construção do recombinante pMGL4/PbCOX15 que será utilizado para a caracterização do gene PbCOX15. A caracterização consistirá em ensaios de complementação heteróloga capacidade respiratória do mutante aW303Δcox15/HIS de *Saccharomyces*

*cerevisiae* a través do gene PbCOX15 de *P. brasiliensis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Meios de Cultura de Bactéria – Para o cultivo da linhagem *E. coli* DH<sub>10</sub>B (*F mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*dlacZ*Δ*M15* Δ*lacX74 deoR recA1 endA1 oraD139* Δ(*ora, leu*) 7697 *galU galK λ<sup>r</sup> rpsL nupG*) utilizou-se o meio de cultura LB (1% Triptona; 0,5% Extrato de Levedura; 0,5% NaCl e 0,1%). Para a seleção dos transformantes com o recombinante pMGL4/PbCOX15 utilizou-se o meio LB com adição de 50mg/L de ampicilina.

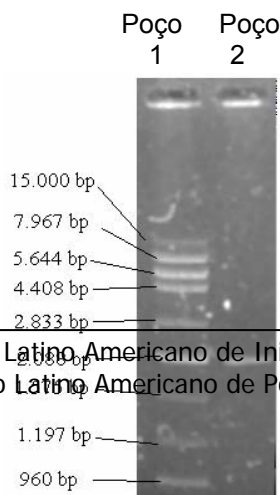
Identificação do PbCOX15 – A identificação do PbCOX15 foi realizada utilizando-se a ferramenta TBLASTn que comparou a seqüência da proteína ScCox15p de *S. cerevisiae* com o banco de dados públicos de ESTs de *Paracoccidioides brasiliensis* através da página <http://200.136.178.18/rstpb/analyse2.htm>. O sequenciamento completo do cDNA foi realizado pela técnica de inserção de transposons. A ORF correspondente ao gene PbCOX15 foi identificada através da ferramenta ORFFinder do NCBI.

Construção do Recombinante pMGL4/PbCOX15 – A análise física de restrição da seqüências completa do cDNA foi realizada utilizando-se a ferramenta NEBCUTTER disponível no site da New England Biolabs <http://www.neb.com>. A digestão do plasmídeo para a remoção da ORF completa do PbCOX15 foi realizada utilizando-se as enzimas *SacI* e *KpnI* de acordo com o protocolo do fabricante (New

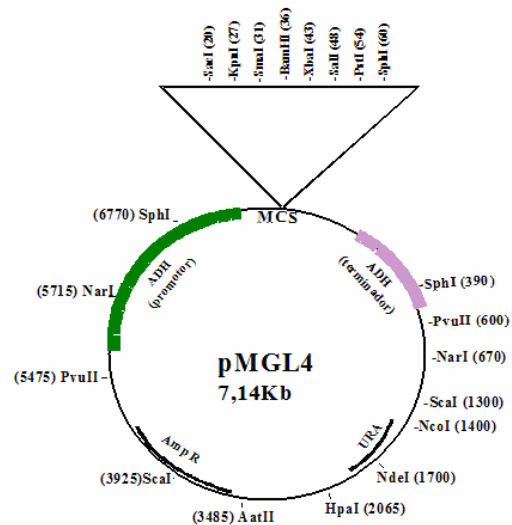
England Biolabs). Após confirmação da digestão por análise em gel 1% agarose (Fig. 1) a mistura de digestão foi aplicada em gel preparativo 1% agarose e a banda de DNA de interesse contendo o fragmento do gene *SacI/COX15/KpnI*, foi separada por eletroforese a 150V em tampão 1X TBE (80mM Tris; 113mM ácido bórico e 2,5mM EDTA, pH entre 8,0 a 8,3). Após eletroforese a banda de DNA de aproximadamente 2088bp referente ao gene COX15 de *P. brasiliensis* foi extraída do gel por eletroeluição [500V; 5minutos em tampão 0,1x TBE (8mM Tris; 11,3mM ácido bórico e 0,25mM EDTA, pH entre 8,0 a 8,3)]. Após eletroeluição fez-se uma extração v/v Fenol, seguida de duas extrações v/v Éter. O fragmento de DNA foi precipitado com 1/20 de 5M NaCl; 5µg de glicogênio e 2,5x o volume total de etanol absoluto. Esta solução foi incubada a -80°C por 30 minutos seguido de centrifugação a 13000 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 80% etanol; 1mM EDTA centrifugando-se nas mesmas condições acima. Após as lavagens o precipitados de DNA foi seco a vácuo e ressuscitado em 10µl de 10mM Tris pH7, 5; 1mM EDTA.

O plasmídeo pMGL4 (Fig 2) foi linearizado por digestão dupla enzimática com *SacI* e *KpnI* seguido de desfosforilação de suas extremidades 5' com a enzima CIP -Calf Intestine Phosphatase e purificado como descrito acima para o fragmento contendo o gene PbCOX15.

A ligação do fragmento de DNA correspondente ao gene PbCOX15 de *P. brasiliensis* (*SacI/PbCOX15/KpnI*) no vetor pMGL4 linearizado em *SacI/KpnI* foi realizada utilizando-se o Kit de ligação Fast Link™ DNA Ligation kit (EPICENTRE TECHNOLOGIES). Utilizamos 5µl da mistura de ligação para transformação em *E. coli* DH10B competente pelo método de CaCl<sub>2</sub> [8]. Os pDNAs dos transformantes de *E. coli* foram extraídos de acordo com o protocolo descrito em Sambrook e Russel, 2001 (Fig. 3) e a seleção do recombinante foi realizada por sequenciamento.



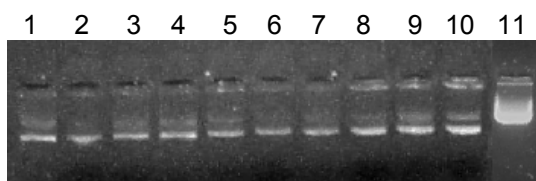
**FIGURA 01:** Dupla digestão com *SacI/KpnI* do pBluescript SK- phagemid contendo o inserto de cDNA correspondente ao gene PbCOX15. Poço 01 corresponde ao padrão de peso molecular de DNA; Poço 2 corresponde a digestão onde a 1° banda corresponde ao plasmídeo e a 2° ao fragmento contendo o gene PbCOX15.



**FIGURA 02:** Vetores de expressão em *Saccharomyces cerevisiae*. O vetor de expressão pMGL4 foi construído a partir do vetor "ponte" YEp352 a partir de inserção do promotor e terminador do gene de alta expressão em levedura ADH1 (Álcool desidrogenase). Estes vetores foram construídos pela Dra. MOIRA GLERUM da Universidade de Alberta no Canadá.

"Primers" Para Sequenciamento - As extremidades do inserto de cDNA correspondente ao gene PbCOX15 foram sequenciadas utilizando-se os primers: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (forward) e 5' - ATTAACCCTCACTAAAGGA-3' (Reverse) e para o sequenciamento da região interna (realizado pela técnica de inserção de transposons) utilizamos os primers: 5'-

ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-  
 3'(forward) e 5'-  
 GCAATGTAACATCAGAGAATTTTGAG 3'  
 (reverse).



**FIGURA 03:** Análise de 1µl da extração de pDNA dos transformantes de DH<sub>10</sub>B com o recombinante pMGL4/PbCOX15 coletados aleatoriamente localizados nos poços de 1 a 10 e plasmídeo pMGL4 sem inserto no poço 11.

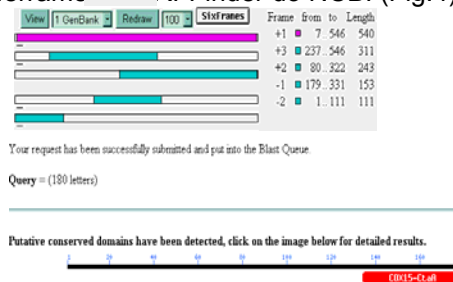
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

**Identificação do Gene PbCOX15** - Para identificarmos o gene PbCOX15 de *Paracoccidioides brasiliensis* utilizamos a sequência da proteína ScCox15p de *S. cerevisiae* com sonda para buscar in silico nos bancos de dados públicos, através de comparação de similaridade, sequências de ESTs de *P. brasiliensis* representantes que apresentassem alto grau de similaridade com a proteína de *S. cerevisiae*. Identificamos duas ESTs que apresentavam boa similaridade à proteína de ScCox15p (EST006267 e EST007018). Os clones correspondentes a estas ESTs foram solicitados ao banco de origem e nos foi gentilmente cedidos pela Dra. Sueli Felipe, coordenadora do projeto de sequenciamento [5,6] que sequenciou e depositou no GeneBank/NCBI estas ESTs. Para a caracterização do gene PbCOX15 escolhemos para a realização dos trabalhos o clone correspondente a EST EST006267.

**Sequenciamento do cDNA Completo do PbCOX15** - Devido ao número de aminoácidos que constitui esta proteína de *S. cerevisiae* esperávamos que o cDNA correspondente a este gene de *P. brasiliensis* fosse constituído por no mínimo 2kb. Para realizarmos o sequenciamento completo do cDNA optamos por utilizar a técnica de sequenciamento através de inserção de transposons utilizando o Kit (EZ::TN™ < KAN-2 > Insertion Kit, EPICENTRE Technologies). Os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante (EPICENTRE Technologies). A sequência completa do cDNA correspondente ao gene PbCOX15 é constituída por aproximadamente 2088bp.

**Construção do Recombinante pMGL4/PbCOX15** - A sequência completa do cDNA do PbCOX15 foi submetida à análise física de restrição utilizando a ferramenta nebcutter disponível no site da New England Biolabs. Embora na região do cDNA não existisse sítios apropriados para excisão da ORF completa orientada (5' e 3') para clonagem no vetor de expressão específico de *S. cerevisiae* pMGL4 (Fig. 2), foi possível excisar a ORF direcionada utilizando os sítios *SacI* e *KpnI* presentes na sequências adjacentes, que compreende as extremidades da inserção do plasmídeo pBluescript Sk-phagemid onde o cDNA foi originalmente clonado.

Após a digestão, o fragmento *SacI/PbCOX15/KpnI* foi isolado em gel preparativo 1% agarose, extraído por eletroeluição e purificado por precipitação com etanol. O fragmento *SacI/PbCOX15/KpnI* purificado foi ligado no vetor pMGL4 previamente linearizado com as enzimas *SacI* e *KpnI* e tendo as extremidades 5' desfosforiladas com a enzima CIP –Calf Intestine Phosphatase. A mistura de ligação foi inserida por transformação em *E. coli* DH<sub>10</sub>B competente. Coletamos 10 clones aleatoriamente para extração do pDNA(Fig.3). A seleção do recombinante pMGL4/PbCOX15 foi realizada por sequenciamento e identificada através da ferramenta TBLASTn e a ORF correspondente ao gene foi identificada pela ferramenta PfamRFFinder do NCBI (Fig.4).



**FIGURA 04:** ORF em rosa demonstrando a presença do gene PbCOX15 .

## CONCLUSÃO

Como as técnicas de indução de mutações bem como a de transformação do *P. brasiliensis* com DNA exógeno ainda não estão estabelecidas umas das alternativas é utilizar o organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* para se estudar a função dos genes de *P. brasiliensis* através de ensaios de complementação heteróloga em

mutantes específicos de *S. cerevisiae*. Portanto para o estudo do gene *PbCOX15*, construímos o recombinante *pMGL4/PbCOX15* como uma das etapas de caracterização deste gene de *P. brasiliensis*.

## AGRADECIMENTOS

A Dra. Sueli Felipe por nos fornecer as ESTs correspondentes ao gene *PbCOX15*.

A Dra. Moira Glerum por nos fornecer os vetores de expressão.

A Cynthia L. Le Bourlegat pelo apoio técnico e a FAPESP pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

[1]Taanman, J; Capaldi, R.A. Purification of yeast cytochrome c oxidase with a subunit composition resembling the mammalian enzyme. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.22481-22485, 1992.

[2] Shoubridge EA. Cytochrome c oxidase deficiency. **Am J Med Genet.** V.106, n.1, p.46-52, 2001.

[3]Barros, H. M; Nobrega, F.G; Tzagoloff, A. Mitochondrial Ferredoxin Is Required for Heme A Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.12, p.9997–10002, 2002.

[4]Glerum, D.M; Muroff, I; Jin, C; Tzagoloff, A. COX15 codes for a mitochondrial protein essential for the assembly of yeast cytochrome oxidase. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.30, p.19088-19094, 1997.

[5] Felipe, M. S. S; Andrade, R. V; Petrofeza, S. S; Maranhão, A. Q; Torres, F. A. G; Albuquerque, P; Arraes, F. B. M; Arruda, M; Azevedo, M. O; Baptista, A. J; Bataus, L. A. M; Borges, C. L; Campos, E. G; Cruz, M. R; Daher, B. S; Dantas, A; Ferreira, M. A. S. V; Ghil G. V; Jesuino, R. S. A; Kyaw, C. M; Leitão, L; Martins, C. R; L. Moraes, M. P; Neves, E. O; Nicola, A. M;

Alves, E. S; Parente, J. A; Pereira, M; Poças-Fonseca, M. J; Resende, R; Ribeiro, B. M; Saldanha, R. R; Santos, S. C; Silva-Pereira, I; Silva, M. A. S; Silveira, E; Simões, I. C; Soares, R. B. A; Souza, D. P; De-Souza, M. T; Andrade, E. V; Xavier, M. A. S; Veiga, H. P; Venancio, E. J; Carvalho, M. J. A; Oliveira, A. G; Inoue, M. K; Almeida, N. F; Walter, M. E. M. T; Soares, C. M. A; Brýgido, M. M.. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. **Yeast**, v.20; p.263–271, 2003.

[6]Felipe Ms, Andrade Rv, Arraes Fb, Nicola Am, Maranhao Aq, Torres Fa, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca Mj, Campos Eg, Moraes Lm, Andrade Pa, Tavares Ah, Silva Ss, Kyaw Cm, Souza Dp, Network P, Pereira M, Jesuino Rs, Andrade Ev, Parente Ja, Oliveira Gs, Barbosa Ms, Martins Nf, Fachin Al, Cardoso Rs, Passos Ga, Almeida Nf, Emilia M T Walter M, Soares Cm, Jose A Carvalho M, Brigido Mm. **Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells.** J Biol Chem., v.280, n° 26,p. 24706–24714, 2005.

[7] 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**, v.2, n.1, p.34-48, 2003.

[8] Sambrook, J; Russell, D.W. **Molecular Cloning-a laboratory manual** Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.