

# ANÁLISE E SEQUENCIAMENTO DO CLONE GENÔMICO *PbE10* DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Ana Paula Rodrigues dos Santos\*, Simone C. B. Bandeira, Luciano A. S. Bernardes, Marina Passetto Nóbrega

Laboratório de Genética Molecular e Genomas – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D.  
Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova. São José dos Campos –SP  
\*aninha385@gmail.com

**Resumo:** O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico que sobrevive como levedura a 37°C e na forma de micélio a 25°C. No pulmão ocorre a transição do estado de micélio para o estado de levedura que é a forma patogênica. É o agente etiológico da Paracoccidioidomicose, uma doença endêmica da América Latina. No Brasil a maior parte dos afetados são trabalhadores rurais. Este trabalho vem mostrar o sequenciamento total, seguido da análise de um dos vários fragmentos do genoma deste fungo originado a partir da biblioteca genômica construída por digestão parcial com a enzima de restrição *Sau3A*.

**Palavras Chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, Paracoccidioidomicose e Fungos.

**Área de Conhecimento:** Biologia Molecular

## Introdução

Os fungos são organismos heterotróficos, eucarióticos, poucos sendo unicelulares [2], distinguem-se das plantas por apresentarem ausência de quaisquer pigmentos fotossintéticos; ausência de celulose na parede celular (os fungos apresentam quitina) e a presença do polissacarídeo de reserva (glicogênio) localizado no vacúolo [3].

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico [1], que se apresenta sob a forma miceliana à temperatura ambiente (23 a 28° C) e como levedura à temperatura de 35 a 37° C [4]. Este fungo é causador da paracoccidioidomicose, uma micose sistêmica que se apresenta na forma cutâneo-mucosa ou pulmonar [1].

A doença causada por este fungo característico de países da América Latina se distribui de forma heterogênea, mesmo dentro das áreas endêmicas. A maior incidência ocorre no Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela [5]. No Brasil, as áreas afetadas são as regiões subtropicais, principalmente onde as atividades agrícolas predominam, caracterizadas por serem regiões que usualmente possuem invernos curtos, grandes rios e verões chuvosos [6].

O fragmento genômico *PbE10* é originário das bibliotecas genômicas construídas por digestão parcial do DNA nuclear de Pb (PbnDNA) com a enzima de restrição *Sau3A*. Os fragmentos gerados foram selecionados na faixa de tamanho que variavam de 10 a 15 kb. Este “pool” purificado, foi ligado em vetor YEp351 aberto em *Bam*HI e clonado em *E. coli* DH10B. Com este clone isolado, purificamos seu pDNA e iniciamos o mapeamento do fragmento retido por digestões planejadas com as enzimas de restrição *Xba*I e *Eco*RI para conseguirmos com mais precisão qual

seria a estimativa de seu tamanho que apresentou-se em torno de 10088 bp [Fig. 1 *PbE10*].

Temos como principal objetivo localizar genes expressos no fragmento genômico *PbE10* do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* que estejam relacionados com sua virulência e patogenicidade, obtendo informações genômicas, o que auxilia em seu seqüenciamento completo.

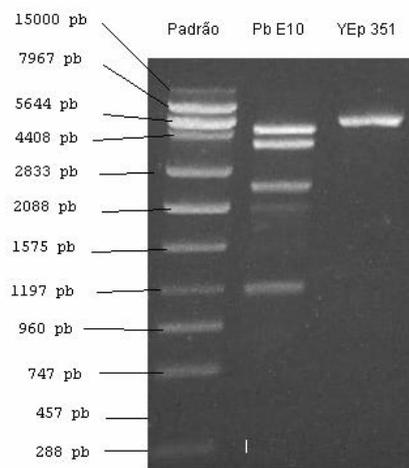


Fig.1 Estimativa do tamanho do fragmento

## Materiais e Métodos

**Inserção de transposon** - Técnica de sequenciamento através de inserção de transposon utilizando o Kit (EZ::TN™ < KAN-2 > Insertion Kit, EPICENTRE Technologies). Os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante (EPICENTRE Technologies).

**Meios de Cultura de Bactéria** – Para o cultivo da linhagem *E. coli* DH<sub>10</sub>B (*F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 oraD139 Δ(ora, leu) 7697 galU galK λ<sup>rpsL nupG</sup>*) 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 do fragmento *PbE10* utilizou-se o meio LB com adição de 50mg/L de ampicilina e 120 μl do antibiótico canamicina.

Sendo o clone *PbE10* originário da biblioteca que foi construída de uma população de insertos aleatório (digestão parcial do DNA nuclear de *Paracoccidioides brasiliensis* com a enzima Sau3A), ligada no plasmídeo tipo ponte YEp351 aberto por digestão com a enzima BamH1 e defosforilado. Preparado o pDNA do clone, fizemos várias digestões enzimáticas para estimarmos aproximadamente o tamanho do inserto retido. A análise destas digestões nos indicou um inserto em torno de 10.100 bp (Fig.1). Após esta análise fizemos “in vitro” a inserção de transposon (“Epicentre Technologies”) com o gene de resistência à canamicina. Após esta reação transformamos a bactéria *E. coli* (DH10B), fizemos a seleção dos clones com a inserção dos transposons em placas com adição de canamicina e isolamos os clones resistentes em placas de 96 clones. Os clones assim organizados são processados para recuperação de seus pDNAs. Os pDNAs purificados são seqüenciados e analisados. Sabemos que o transposon possui 1221bp e os “primers” (19pb) usados no sequenciamento, localizam-se nas extremidades do fragmento e estão voltados para o exterior do transposon.

Os clones da placa de transformação foram coletados e colocados em LA juntamente com 200μl de água destilada e deionizada e 120 μl do antibiótico canamicina, colocados para crescer na estufa à 37°C overnight. Com os pDNAs foram isolados através da técnica descrita por Holmes D.C., e Quigley M.,1981[8] com adaptação do método Marra, M.A., Kucaba, T.A., Hillier, L.W. and Waterston, R.H. -1999,[7] adaptado para microondas.

Estes foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Após análise foi realizada a PCR (Reação da cadeia da Polimerase) de seqüenciamento, onde utilizou-se 2 μl de água, 2μl de primer (492 F ou 493 R), 2μl do mix Amershan e 6μl do pDNA. O processo de amplificação é realizado tanto no termociclador PCR System 2400 da Perkin Elmer como no termociclador PCR PTC-100™ Programmable Thermal Controller que é programado da seguinte forma: 30 segundos a 96°C para a desnaturação inicial e em seguida inicia-se uma seqüência de mudanças de temperatura que se repete por 40 vezes: 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C para o

anelamento do “primer” com a fita molde e 4 minutos a 60°C para elongação da cadeia. Ao fim desses quarenta ciclos a amostra é resfriada a 4°C. Estas amostras então são precipitadas com adição de 5μl (1mg Glicogênio dissolvidos em 1ml 5M NH<sub>4</sub>OAc), 50μl de 100% etanol e deixando-se a -80°C que é deixado por 30 minutos ou “overnight”. Após este tempo de precipitação as amostras são centrifugadas por 30 minutos, 4000rpm, 4°C e o sobrenadante é desprezado. A amostra é então lavada duas vezes com 110μl de 80% etanol, e centrifugada por 15 minutos, a 4000rpm. O sobrenadante é então totalmente desprezado e totalmente seco no vácuo e redissolvido em 2μl de Formamida para o seqüenciamento no aparelho ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, desenvolvido pela Applied Biosystems/HITACHI.

Essas seqüências foram analisadas pelo software Phred com o parâmetro de qualidade >=20, o que nos gerou arquivos no formato FASTA. Para alinhar o arquivo FASTA, foi utilizado o software CAP3 e alternativamente utilizamos a ferramenta *SeqMan II* do programa computacional DNASTar, Inc.

## Resultados

Após a análise dos arquivos pelos programas computacionais, verificamos que algumas das seqüências no formato FASTA se sobrepuseram, formando vários contigs. Estes contigs foram alinhados até a formação de uma única seqüência consenso, que se refere ao tamanho do inserto de DNA, onde nos mostra que o clone *PbE10* possui 6.055 pb. A primeira análise feita com a seqüência consenso foi através da ferramenta *ORFFinder* do NCBI (National Center for Biological Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [Fig.2]. Os resultados demonstraram que este fragmento não apresenta nenhum domínio putativo, ou seja, não codifica nenhuma proteína completa, não apresentando nenhuma das ORFs em evidência.

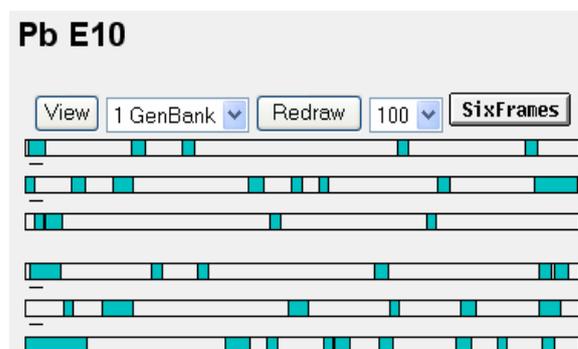


Fig. 2: Análise obtida da ferramenta ORFFinder

A análise posterior foi realizada através da ferramenta *BlastX* também do NCBI tendo como resultado um valor expressivo no E-value demonstrando homologia do fragmento *PbE10* a uma proteína hipotética de *Aspergillus nidulans* [Fig.3] e com uma RNA helicase *Hrh1* ATP-dependente de *Aspergillus fumigatus*.

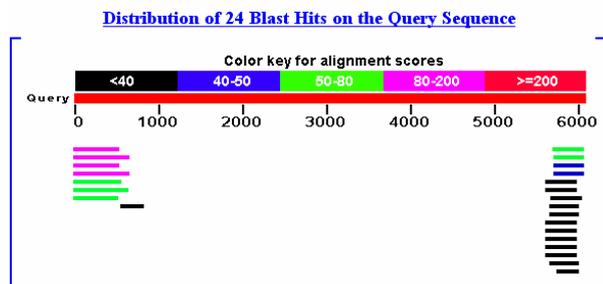


Fig. 3 Representação caracterizando a homologia do fragmento *PbE10* com os fungos *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus Fumigatus*

## Discussão

Ao contrário do apresentado após a dupla digestão realizada com as enzimas *XbaI* e *EcoRI*, onde tamanho aproximado do clone era estimado em torno de 10.088pb, este possui um tamanho de 6.055pb.

Após análise utilizando a ferramenta ORFFinder obteve-se então a esquematização de várias pequenas ORFs em diferentes fases de leitura e em nenhuma delas havia um domínio putativo que caracterizasse a presença de uma proteína completa. Já as análises obtidas após o uso da ferramenta *Blastx* comprovamos a identidade e similariedade do fragmento genômico *PbE10* com uma proteína hipotética de *Aspergillus nidulans* e uma RNA helicase *Hrh1* ATP-dependente de *Aspergillus fumigatus*.

## Conclusão

Com o seqüenciamento completo e análises realizadas com o clone *PbE10* de *Paracoccidioides brasiliensis*, verificamos que esta região do genoma do fungo apresenta grande homologia com uma proteína hipotética do fungo *Aspergillus nidulans* e com uma RNA helicase *Hrh1* ATP-dependente de *Aspergillus fumigatus*, mesmo não possuindo um domínio conversado.

## Referências Bibliográficas

[1] SAN-BLAS, G., and F. San-Blas. 1977. ***Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall**

**structure and virulence.** *Mycopathologia* **62**:77–81.

[2] RAVEN, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. ***Biologia vegetal***. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, 728p.

[3] SIDRIM, J.J.C., Moreira, J.L.B. ***Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 287p.

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

[5] RESTREPO-MORENO, A. (1993). **Paracoccidioidomycosis.** In: Murphy, J.W., Friedman, H. & Bendinelli, M. (eds). *Fungal Infections and Immune Responses*. Plenum Press, New York, pp. 251-276.

[6] RESTREPO, A. (1985). **The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved.** *J. Med. Vet. Mycol.* **23**: 323-334.

[7] MARRA M.A., Kucaba, T.A., Hillier, L.W. and Waterston, R.H. (1999) **High-throughput plasmid DNA purification for 3 cents per sample** *Nu. Ac. Res.* **27**:e37

[8] HOLMES, D. S. & Quigley, M. *Analyt. Biochem.* **114**, 193 (1981)