

## Organização Genômica de *Paracoccidioides brasiliensis*; Sequenciamento do Clone PbB08 .

Aline C.F. Barbosa\*; Simone C. Bandeira; Luciano A. Bernardes; Marina P. Nobrega

Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos – SP, Brasil \*alinefbarbosa@uol.com.br

**Resumo:** *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) agente etiológico da paracoccidioidomicose; micose endêmica da América Latina; é um fungo termo-dimórfico. Um dos principais organismos de estudo do Laboratório de Genética Molecular e Genomas da UniVap. Este fungo apresenta sua forma micelial a 25°C e leveduriforme a 37°C. Uma biblioteca de fragmentos genômicos originários de uma digestão parcial do DNA nuclear (*P. brasiliensis*) com a enzima de restrição Sau3A foi construída em vetor do tipo ponte YEp351 aberto por digestão com a enzima BamH1 e defosforilado. Esta biblioteca foi clonada por transformação em *E.coli* (linhagem DH10B) e um dos clones gerado o Pb B08, foi isolado, caracterizado e totalmente seqüenciado pela técnica de transposon para sequenciamento. O clone PbB08 de 6.754 pares de bases contem numa de suas extremidades a região carboxi terminal da família de proteínas (enzimas) Tiamina Pirofosfatase (TPP) que participa do metabolismo de tiaminas, na outra extremidade também uma região carboxi terminal de uma proteína hipotética do tipo TatD\_DNAse. Entre os genes uma longa região.

**Palavras – chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, transposon, clone Pb B08

**Área de conhecimento** – Genética, Biologia Molecular.

### Introdução

Os fungos são organismos eucarióticos os quais se dividem em dois tipos: leveduras e fungos filamentosos. As leveduras crescem como células únicas que se reproduzem por brotamento assexual, já os fungos filamentosos crescem como filamentos longos, chamados de hifas, e formam um emaranhado como uma esteira que são os micélios [1] Este microorganismo, muitas vezes, possui duas formas diferentes de se apresentar na natureza (levedura e micélio). Os fungos capazes de se transformar de micélio para levedura são chamados dimórficos e essa transição pode ser causada por diferentes fatores ambientais como a modificação do pH, da temperatura, dos níveis de glicose, dentre outros [2].

Primeiramente descrito por Adolfo Lutz em 1908 [3], o *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é um fungo termo-dimórfico, o qual se apresenta em forma de hifas quando submetido a temperatura de 25°C e sofre transição para sua forma leveduriforme quando exposto a uma temperatura de 37°C [4]. Este fungo é endêmico dos países latino-americanos, os quais fornecem condições favoráveis ao seu desenvolvimento, tais como temperatura em torno de 18 a 24°C, chuvas abundantes, predomínio de florestas e de árvores nativas e ainda invernos curtos e verões ensolarados [5].

A elucidação do genoma do Pb é de grande interesse médico por este ser o agente etiológico de uma micose sistêmica, a paracoccidioidomicose (PCM).

PCM juvenil acomete adultos com idade inferior a 30 anos e crianças de ambos os sexos (representa de 3 a 5% dos casos desta doença), afetando principalmente os órgãos do sistema retículo endotelial, como fígado, baço, linfonodos e medula óssea. Já a PCM adulta (forma mais freqüente em que a doença se apresenta) tem uma progressão lenta e atinge preferencialmente homens a cima de 35 anos, causando lesões pulmonares, e eventualmente mucocutâneas, com ou sem disseminação para outros órgãos [7].

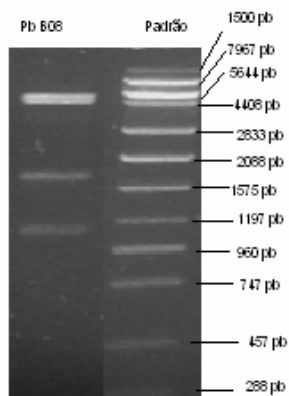
Os estudos da biologia molecular e da genética do Pb visam estabelecer parâmetros para a melhor compreensão da virulência e patogênese deste microorganismo. Este trabalho tem por objetivo elucidar e analisar mais uma região genômica do Pb, contribuindo desta forma para sua organização genômica completa.

A infecção humana pelo Pb ocorre principalmente pelas vias aéreas superiores através da inalação de propágulos de sua forma micelial. Ao alcançar os alvéolos pulmonares, o fungo sofre transição de micélio para levedura - sua forma patogênica - devido à elevação da temperatura para 37°C, temperatura média do corpo humano [6]. A PCM possui duas diferentes apresentações clínicas. A

### Materiais e Métodos

A partir de uma preparação de DNA nuclear de alta pureza de *P. brasiliensis* foi possível construir uma biblioteca de fragmentos genômicos, por digestão enzimática parcial com a enzima de restrição Sau3A e ligação dos fragmentos gerados no vetor do tipo ponte YEp351, aberto por

tratamento enzimático (BamH1) e defosforilado. Os recombinantes gerados foram clonados por transformação em *E.coli* (linhagem DH10B). Selecionamos milhares de clones e um destes o clone (PbB08) foi o escolhido para este estudo após caracteriza-lo quanto a sua complexidade. Para estimar a quantidade de pares de bases correspondentes ao PbB08 realizamos dupla digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição *Xba*I e *Eco*RI e o produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (Fig.1).



**Fig.1** Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão enzimática *Xba*I e *Eco*RI do clone PbB08.

A partir desta análise estimamos que o clone PbB08 fosse de aproximadamente 8.808 pares de bases. Optamos por utilizar a técnica de inserção de transposons para o sequenciamento que consiste em inserir aleatoriamente *in vitro* o transposon com gene de resistência a canamicina no recombinante PbB08 com auxílio da enzima transposase. Seguimos as instruções do kit da ("Epicentre Technologies"). Após a reação de inserção dos transposons no clone PbB08 novos recombinantes são originados. Estes são clonados por transformação da bactéria *E.coli* linhagem DH10B competentes. Fazemos o selecionamento dos clones resistentes (com a inserção dos transposons) em placas LA com adição de canamicina e incubadas a 37°C "over-night". Os transformantes selecionados aleatoriamente são transferidos e organizados em placas de 96 clones que em seguida são colocados em estufas a 37°C "over-night". Os clones assim selecionados são processados para a recuperação de seus DNAs plasmidiais (pDNAs). Os pDNAs purificados são sequenciados e analisados. Sabemos que o transposon possui 1221 pares de bases (pb) e os "primers" (19pb) usados no sequenciamento localizam-se nas extremidades do fragmento e estão voltados para o exterior do transposon. Para o sequenciamento utilizamos a reação em cadeia da polimerase (PCR). Nesta reação

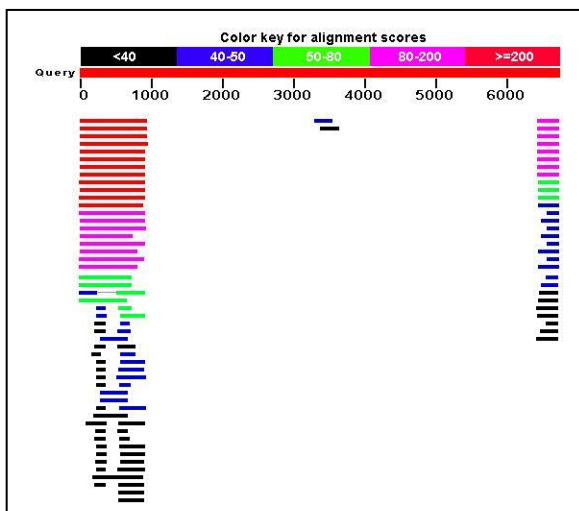
utilizamos 2 µl de água, 2µl de primer específicos para transposon (492 F ou 493 R), 2µl do mix Amershan (o qual possui dNTPs e ddNTPs) e 7µl do pDNA. O termociclador utilizado, foi o PCR PTC-100™ Programmable Thermal Controller, programado para as seguintes etapas: 30 segundos a 96°C, onde ocorre a desnaturação inicial; uma seqüência de mudanças de temperatura que se repete por 40 ciclos de: 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 e por fim diminuição da temperatura para 4°C. As amostras após o PCR são precipitadas com etanol 100% após digestão de 30 min a -80°C e centrifugação. Os DNAs precipitados são lavadas com 80% ETOH-EDTA. Após a lavagem o DNA é secado a vácuo e então diluído em 2µL de formamida para carregamento do gel de sequenciamento. A corrida do gel foi realizado no seqüenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, desenvolvido pela Applied Biosystems/HITACHI.

Todos os cromatogramas foram convertidos em seqüências que foram analisadas utilizando-se o software phred com o parâmetro de qualidade >=20 que após agrupamento das seqüências (clustering) temos a formação de um único "contig"(consenso) com as duas extremidades do plasmídeo reconhecidas confirmamos o fechamento do clone em análise. A partir deste "contig" único realizamos análises através do banco de dados NCBI (National Center for Biological Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

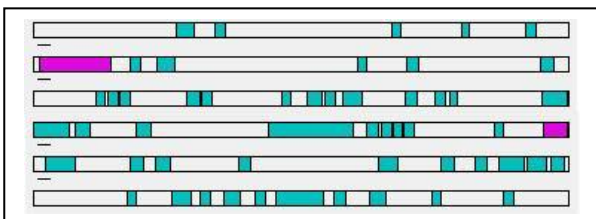
## Resultados e Discussão

As seqüências obtidas foram submetidas a um alinhamento utilizando-se o software phred com parâmetro de qualidade >=20 o que nos resultou um consenso com 6.754 pb menor que o estimado por digestão enzimática. Para este fechamento foram necessário analisarmos X clones. Passamos em seguida a fazer a análise de anotação deste clone. Para esta análise utilizamos a ferramenta Blastx e ORF finder do banco de dados NCBI (National Center for Biological Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os resultados da análise por Blastx indicam dois genes não divididos e uma grande região intergênica (Fig.2). Quando utilizamos a ferramenta "ORF Finder" encontramos duas ORFs representativas (Fig.3). Uma apresentando aproximadamente 308pb, pertencente a família das tiaminas pirofosfatos (Fig.4) e outra com aproximadamente 890pb (fig.5) sendo denominada TatD\_DNAse. A tiamina pirofosfato esta ligada à piruvato desidrogenase presente no Ciclo de Krebs. Segundo Delvin, 1998

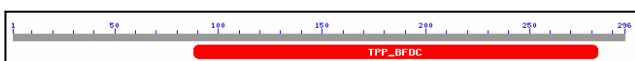
[8] a ausência desta proteína compromete severamente a geração de energia na célula e pode também estar relacionada as reações de transcetolase da via das pentoses fosfato. Este gene em *A. nidulans* apresenta aproximadamente 3.465pb e cinco regiões intrônicas. O gene TatD\_DNAse em *E. coli* é uma proteína citoplasmática dependente de magnésio para realizar sua função. Em *A. fumigatus* este gene não é dividido e apresenta 1386pb. O conhecimento total da seqüência deste gene em organismos semelhantes ao *P. brasiliensis* poderá auxiliar na construção de iniciadores, facilitando a busca do gene completo neste organismo.



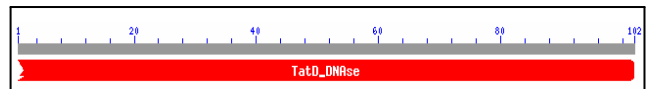
**Fig. 2.** Representação dos genes encontrados no clone PbB08 obtida através da ferramenta Blastx. do NCBI.



**Fig. 3.** Mapa representando as ORFs encontradas no programa "ORF Finder" do NCBI, demonstrando a presença dos dois genes no clone PbB08.



**Fig.4.** Identificação do gene da TPP tiamina pirofosfatase .



**Fig.5** Representação do gene TatD-related deoxyribonuclease gene da extremidade a direita da Fig.3

## Conclusão

Através das análises realizadas foi possível concluir que a região genômica de *Paracoccidioides brasiliensis* totalmente sequenciada, do clone PbB08, possui dois genes que estão localizados nas extremidades do fragmento e ambos indicando somente a região carboxi terminal, das proteínas correspondentes. Os genes parcialmente representados neste seguimento são: da extremidade a esquerda a enzima Tiamina Pirofosfatase (Fig.4) que participa no metabolismo de tiamina com alta similaridade com uma proteína hipotética de *Aspergillus nidulans* de 1154aa e na extremidade a direita da Fig.2 uma "TatD-related deoxyribonuclease" uma DNAse (Fig.5) uma proteína hipotética de *Aspergillus fumigatus* com 461aa. Esta é uma das abordagens utilizada para elucidar a organização genômica deste organismo e descoberta de novos genes.

## Referências Bibliográficas

- [1] WARREN, L. & ERNEST, J. – Microbiologia Médica e Imunologia, 4º ed. Editora Artes Médicas Sul LTDA., São Paulo – SP.
- [2] HORNBY, Jacob M.; *et al.* Size Effect in Dimorphic Fungi: Extracellular Control of Yeast-Micelium Dimorfism *Ceratomyces Ulmi*. Applied and Environmental Microbiology, v.70, n.3, p. 1356-1359, março 2004.
- [3] LUTZ, A. Uma micose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das blastomicoses americanas. Brazil Med, v. 22, p. 121-124, 1908.
- [4] LACAZ, C.S., Historical evolution of the knowlegde on paracoccidioidomycosis and its ethiologic agent. In Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G. Paracoccidioidomycosis. Eds. CRC Press EUA, p. 1-11, 1994.
- [5] BAGAGLI, E., SANO, A.; COELHO, K. L; *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyus noveminct*) captured in a endemic área of aracoccidioidomycose. Am.J.Trop-Med. Hug. , v.50, p.505-512, 1998.

[6] MECEWEN, J.G, BEDOYA, V., PATINO, M.M., SALAZAR, M.E, RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. J. Med.Vet. Mycol. 25, p.165-175. 1987.

[7] MORAIS, F. V. O gene PbGP43 que codifica o antígeno principal do Paracoccidioides brasiliensis: polimorfismo e transcrição. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 2003.

[8] DELVIN, Thomas M. Manual de Bioquímica com correlações clínicas. Edgard Blücher LTDA., 1998 – SP.