

**SIMONE CRISTINA BORGES BANDEIRA**

**IDENTIFICAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURA GENÔMICA  
DE GENES NUCLEARES ASSOCIADOS À ATIVIDADE DA  
CITOCROMO C OXIDASE DE *Paracoccidioides brasiliensis***

Tese de doutorado apresentada ao  
Instituto De Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Doutor em  
Ciências (Microbiologia).

São Paulo

2009

**SIMONE CRISTINA BORGES BANDEIRA**

**IDENTIFICAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURA GENÔMICA  
DE GENES NUCLEARES ASSOCIADOS À ATIVIDADE DA  
CITOCROMO C OXIDASE DE *Paracoccidioides brasiliensis***

Tese de doutorado apresentada ao  
Instituto De Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Doutor em  
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Marina Pasetto  
Nóbrega

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Bandeira, Simone Cristina Borges.

Identificação funcional e estrutura genômica de genes nucleares associados à atividade da citocromo e oxidase de *Paracoccidioides brasiliensis* / Simone Cristina Borges Bandeira. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Maria Pasetto Nóbrega.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Genética Molecular e Genomas.

Versão do título para o inglês: Functional identification and genomic structure of *Paracoccidioides brasiliensis* nuclear genes associated to cytochrome oxidase activity.

Descritores: 1. Microbiologia 2. Fungos 3. *Saccharomyces*  
4. Respiração celular 5. Genética Molecular 6. *Paracoccidioides*  
I. Nóbrega, Marina Pasetto II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Microbiologia  
III. Título.

ICB/SBIB071/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Simone Cristina Borges Bandeira.

Título da Tese: Identificação funcional e estrutura genômica de genes nucleares associados à atividade da citocromo e oxidase de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Orientador(a): Maria Pasetto Nóbrega.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 072, referente ao projeto intitulado *“Identificação funcional e estrutura genômica de 20 genes nucleares associados à atividade da citocromo oxidase em paracoccidioides brasiliensis”* sob a responsabilidade de **Simone Cristina Borges Bandeira**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEP SH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 28 de setembro de 2004.

Prof. Dra. MARÍLIA C.L. SEELAENDER  
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO  
Coordenador da CEP SH - ICB/USP

## AGRADECIMENTOS

A todos que participaram dos projetos de sequenciamento de ESTs e RSTs do *P. brasiliensis*, portanto, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram.

Agradeço a colaboração da Dra. Maria Sueli S. Felipe e do Dr. Gustavo Goldman pela disponibilização dos clones de ESTs com os quais trabalhei e apresento os resultados neste trabalho.

À Dra. Marina P. Nobrega pela orientação e pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho e também proporcionar as condições adequadas para a realização do mesmo.

Ao professor Dr. Francisco G. Nobrega pela valiosa contribuição, gentileza e disposição sempre que foi solicitado.

À Leila Maria Toffoli, Cynthia L. Le Bourlegat, Priscila M.S.M. Leite, Aline A. Guimara e Adolfo José Mota pelo suporte técnico no sequenciamento e pelo carinho dispensado às minhas amostras e por suas valiosas amizades.

À Dra. Márcia C. Sampaio, amiga e irmãzinha de todas as horas, por toda sua contribuição científica e pessoal que sem dúvidas foram e continuam sendo muito significantes.

À Dra. Cláudia Barbosa Ladeira de Campos, por toda sua contribuição, sem dúvidas fundamentais para a concretização de alguns resultados obtidos aqui e por toda amizade.

À Dra. Flavia V. Moraes, também pela contribuição e amizade.

Às amigas e colaboradoras Aline C. F. Barbosa, Ana Paula Santos e Carla S. Dias pela dedicação dispensadas na realização de parte das rotinas deste trabalho e também por suas amizades.

Aos todos os colegas do LGMG ( Mota, Sara, Priscila, que de alguma maneira deu a sua colaboração para a concretização deste trabalho, principalmente à Maria e Maria Alice que sempre estavam dispostas a colaborar.

Também gostaria de agradecer a nossa secretária da Pós-Graduação em Microbiologia da USP, Alice Mitsue Shimabuku por toda delicadeza dispensada sempre que precisei de orientações.

Aos meus pais e ao meu namorado Werner, familiares e amigos que torcem muito por mim e sem dúvida foram a grande razão para nunca pensar em desistir.

A FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Bandeira Simone Cristina Borges. Identificação funcional e estrutura genômica de genes nucleares associados à atividade da citocromo c oxidase de *Paracoccidioides brasiliensis* [Tese (Doutorado)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo patogênico, é o agente etiológico da paracoccidioidomicose, uma micose sistêmica prevalente na América Latina. *P. brasiliensis* é um fungo termodimórfico que vive na forma de micélio em temperatura ambiente (~25 °C) e sob a forma de levedura entre 35 e 37 °C. Por comparação de seqüências e ensaios de complementação heteróloga em mutantes de *S. cerevisiae* identificamos e estudamos 15 novos genes de *P. brasiliensis* envolvidos na expressão do complexo da citocromo c oxidase mitocondrial (COX). Os genes *PbCOX6*, *PbCOX17*, *PbCOX19* e *PbOXAI* são capazes de substituir a função de seus homólogos nos respectivos mutantes de *S. cerevisiae*. Os genes analisados são modulados durante o processo de transição morfológica tanto de micélio para levedura quanto de levedura para micélio evidenciando a importância dos genes relacionados à respiração celular para o estabelecimento da patogenicidade do fungo. Acessamos a estrutura genômica dos genes identificados verificando a presença de introns e evidência de processamento alternativo dos genes. Além da função respiratória os genes *COX11* e *SCO1* de *S. cerevisiae* estão relacionados à função de resistência ao peróxido de hidrogênio e os homólogos de *P. brasiliensis* embora não sejam capazes de complementar funcionalmente a deficiência respiratória são equivalentes aos genes *COX11* e *SCO1* de *S. cerevisiae* na função quanto à resistência ao peróxido. Mostramos que os mutantes *Cox17*, *Cox19* e *Cox23* de *S. cerevisiae* também são em diferentes níveis, sensíveis a peróxido de hidrogênio e que os homólogos de *P. brasiliensis* *PbCOX19* e *PbCOX17* também são capazes de substituir esta função em *S. cerevisiae*. Demonstramos que em *P. brasiliensis* ocorre a produção de compostos bioativos sideróferos, sendo detectado sua secreção em meio de cultura sólido e líquido.

**Palavras-chave:** Paracoccidioides brasiliensis. Citocromo c Oxidase. Fungos. *Saccharomyces cerevisiae*. Respiração mitocondrial. Siderófero.

## ABSTRACT

Bandeira Simone Cristina Borges. Functional identification and genomic structure of *Paracoccidioides brasiliensis* nuclear genes associated to cytochrome c oxidase activity [Ph.D. Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

*Paracoccidioides brasiliensis* is a pathogenic fungus, the aethologic agent of the paracoccidioidomycose, a systemic mycose prevalent in Lantin American. *P. brasiliensis* is a thermodimorphic fungus which lives in the mycelium form at room teperature (~ 25 °C) and in the yeast form between 35 °C e 37 °C. By sequence comparisson and heterologous functional complementation assays in *S. cerevisiae* we were able to identify and study fifteen (15) new *P. brasiliensis* genes involved in the mitochondrial cytochrome c oxidase expression (COX). Of which, *PbCOX6*, *PbCOX17*, *PbCOX19* e *PbOXAI* genes were able to fuctionally replace its homologues in the *S. cerevisiae* null mutant. All *P. brasiliensis* genes analysed have their expression modulated during the morphologic transition from mycelium to yeast as well as from yeast to mycelium. This observation highlighted the importance of the respiration related genes in the fungus pathogenicity stablishment. Genomic structure of the identified genes were acessed confirming introns presence as well as evidenced the alternative splicing occurrence. Besides respiration function, *COX11* and *SCO1* genes from *S. cerevisiae* were related to be involved in the hydrogen peroxide resistance and although *P. brasiliensis* homologues genes are not able to functionally replace its homologues in the respiratory deficiency they are able to restore the resistance to hydrogen peroxide in the *S. cerevisiae* null mutant strains. We showed that *Cox17*, *Cox19* and *Cox23* *S. cerevisiae* mutants are also, at different levels, sensitive to hydrogen peroxide and that *P. brasiliensis* homologues *PbCOX17* and *PbCOX19* are also able to replace this function in *S. cerevisiae*. It was demonstrated that there is bioactive compounds siderofore production in the fungus *P. brasiliensis*, and it was detected siderofore secretion in the solid and liquid culture medium.

**Key words:** *Paracoccidioides brasiliensis*. Cytochrome c Oxidase. Fungi. *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial Respiration. Siderofore.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>1.1 A Respiração Celular e o Complexo da Citocromo c Oxidase</b> .....	20
<b>1.2 Genes Envolvidos Na Montagem Do Complexo Da Citocromo C Oxidase mitocondrial</b> .....	21
<b>1.3 O Fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i></b> .....	24
<b>1.4 A Paracoccidioidomicose</b> .....	25
<b>1.5 Sequenciamento De ESTs De <i>Paracoccidioides brasiliensis</i></b> .....	27
<b>1.5 Sideróferos</b> .....	29
<b>1.7 A Biosíntese De Sideróferos</b> .....	30
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
<b>3.1 Linhagens De Leveduras E Bactérias</b> .....	33
<b>3.2 Meios De Cultura Para Bactéria</b> .....	35
<b>3.3 Meio de Cultura para Levedura</b> .....	35
<b>3.4 Oligo-Incidores Utilizados Para Sequenciamento</b> .....	35
<b>3.5 Reação de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) de Sequenciamento</b> .....	36
<b>3.6 Sequenciamento</b> .....	36
<b>3.6.1 Análise dos Cromatogramas de Sequenciamento</b> .....	37
<b>3.7 Identificação da Fase Aberta de Leitura (“ORF - Open Reading Frame”)</b> .....	37
<b>3.8 Análises das Sequências das Proteínas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i></b> .....	37
<b>3.9 Excisão das ORFs</b> .....	38
<b>3.10 Preparação do Vetor de Expressão</b> .....	38
<b>3.11 Ligação do Fragmento de DNA ao vetor</b> .....	39
<b>3.12 Reação de Inserção de Transposon</b> .....	39
<b>3.13 Preparo de Célula Competente de <i>E.coli</i> pelo método químico</b> .....	39
<b>3.14 Transformação Bacteriana por choque térmico</b> .....	40
<b>3.15 Extração de pDNA de Bactéria [método alcalino]</b> .....	40
<b>3.16 Gel de Agarose para Eletroforese</b> .....	41
<b>3.17 Transformação de Levedura pelo método de LiOAc</b> .....	41
<b>3.18 Extração de pDNA de Levedura [modificado por Alex Tzagoloff Columbia University]</b> .....	42

<b>3.19 Extração de RNA total de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> [método adaptado por Nobrega, M] .....</b>	<b>43</b>
<b>3.20 Reação de PCR em tempo real (RT-qPCR) .....</b>	<b>43</b>
<b>3.20.2 Lista de Oligos iniciadores Utilizados Nos Experimentos de PCR em Tempo Real (Real Time - RTqPCR) pela Tecnologia SYBR Green.....</b>	<b>46</b>
<b>3.21 Síntese de cDNA POLI(T) Para Clonagem do mRNA de Gene PbSCO1 .....</b>	<b>49</b>
<b>3.22 Hibridização em Membrana .....</b>	<b>49</b>
<b>3.23 Extração Alcalina do DNA fosmidial (pCC1DNA) [adaptado por Nóbrega M]50</b>	
<b>3.24 Quebra do DNA fosmidial (pCC1DNA) por Nebulização [adaptado Nóbrega M] .....</b>	<b>51</b>
<b>3.25 Construção de Biblioteca de DNA fosmidial (pCC1DNA) em Vetor de clonagem pUC18 [Nobrega M et al.].....</b>	<b>52</b>
<b>3.26 Ensaio de Sensibilidade ao Peróxido de Hidrogênio [adaptado por Bandeira S] .....</b>	<b>52</b>
<b>3.27 Meio Sólido Para Detecção De Siderófero Em <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> [adaptado por Bandeira S] .....</b>	<b>53</b>
<b>3.28 Meio Líquido Para Detecção De Siderófero Em <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> [adaptado por Bandeira S] .....</b>	<b>53</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1 Estudo dos Genes de <i>P. brasiliensis</i> .....</b>	<b>57</b>
<b>4.2 Resistência à Peróxido de Oxigênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).....</b>	<b>122</b>
<b>4.4 Expressão Relativa De Genes Nucleares De <i>P. brasiliensis</i> Durante O Período De Transição Morfológica Induzida Pela Mudança Da Temperatura.....</b>	<b>138</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>159</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>165</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>167</b>

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

