

CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS CODIFICANTES PARA O ANTÍGENO GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO-DESIDROGENASE DO FUNGO PATOGENICO HUMANO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

CHARACTERIZATION OF SEQUENCES CODING FOR THE ANTIGEN GLYCE-RALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE OF HUMAN PATHOGENIC FUNGUS *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

MÔNICA SANTIAGO BARBOSA

Endereço atual/Current address: Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Caixa Postal 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil/Laboratory of Molecular Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Campus II, PO Box 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil; e-mail: santiago@icb.ufg.br

Dissertação de Mestrado/Master Dissertation: Programa de Pós-Graduação de Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil/Postgraduate Program in Biology, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

Defendida/Defended: 22.III.2002

Orientadora/Advisor: Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil/Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

RESUMO: Um cDNA (*Pbgapdh1*, nº de acesso GenBank AY061958) e uma sequência genômica parcial (AF396657) codificantes para uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), com massa molecular de 36 kDa, de *Paracoccidiodes brasiliensis*, isolado *Pb01* (ATCC MYA 826), foram clonados e caracterizados. O fragmento genômico foi obtido por amplificação do DNA de *P. brasiliensis* utilizando-se oligonucleotídeos degenerados construídos com base na sequência de aminoácidos da GAPDH deste patógeno. O fragmento obtido, de 1253 pb, apresentando identidade com GAPDHs, foi utilizado no rastreamento da biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis*, fase leveduriforme. A sequência de cDNA de 1.717 nucleotídeos apresenta quadro aberto de leitura (*open reading frame* – ORF) de 1014 pb, codificando para uma proteína (GAPDH1) de massa molecular predita de 36 kDa, contendo os peptídeos sequenciados anteriormente. A estrutura primária de *PbGAPDH* foi confirmada por análises comparativas com sequências depositadas em bancos de dados. A sequência genômica parcial de 1253 pb apresenta quatro íntrons intercalados por cinco exons. A expressão de *Pbgapdh1* foi analisada por meio de eletroforese bidimensional de proteínas e experimentos de *Northern blot*. Foi detectada uma única espécie de mRNA de 1,8 kb, preferencialmente expressa na fase parasitária do *P. brasiliensis*, em concordância com altos níveis de expressão da GAPDH na fase leveduriforme deste patógeno.

PALAVRAS-CHAVE: Clonagem molecular, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, *Paracoccidiodes brasiliensis*.

ABSTRACT: A cDNA (*Pbgapdh1*, GenBank AY061958) and a partial genomic sequence (AF396657), coding for a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), with molecular mass of 36 kDa, of *Paracoccidiodes brasiliensis*, isolate *Pb01* (ATCC MYA 826), were cloned and characterized. The genomic fragment was obtained by PCR amplification of *P. brasiliensis* DNA using degenerated primers designed based on the amino acid sequence of the GAPDH of this pathogen. The fragment obtained, with 1253 pb, presenting identity match with GAPDHs, was used in the screening of a cDNA library of *P. brasiliensis* in the

yeast phase. The cDNA sequence with 1,717 nucleotides presents an open reading frame (ORF) with 1014 pb, coding for a protein (GAPDH1) with a predicted molecular mass of 36 kDa and containing the peptides previously sequenced. The primary structure of *PbGAPDH1* was confirmed by comparative analysis to the sequences deposited in data banks. The 1253 bp partial genomic sequence presents four introns interspersed with five exons. The expression of *Pbgapdh1* was analyzed by two-dimensional gel electrophoresis of proteins and Northern blot. We detected a single species of mRNA of 1.8 Kb, preferentially expressed in the yeast parasitic phase of *P. brasiliensis*, in agreement with the high levels of the GAPDH expression in the yeast cells of this pathogen.

KEY WORDS: Molecular cloning, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Paracoccidioides brasiliensis*.