

Potencial do gene *htrA* como marcador molecular para estudos filogenéticos e identificação de espécies de micobactérias

Potential *htrA* gene as a molecular marker for phylogenetic studies and identification of mycobacterial species

L. C. N. Silva^{1,2}; E. C. V. Costa¹; L. I. O. Souza³

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-Pe, Brasil

²Docente de Farmácia, Faculdade Pernambucana de Saúde, 51200-060, Recife-Pe, Brasil

³Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900, Maceió-Al, Brasil

luisclaudionsilva@yahoo.com.br

(Recebido em 13 de fevereiro de 2012; aceito em 04 de abril de 2012)

Este trabalho analisou *in silico* o gene *htrA* como marcador molecular para filogenia e identificação de espécies de micobactérias. Foram utilizadas sequências de *htrA* de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. marinum*, *M. abscessus* depositadas no GenBank (NCBI). As árvores filogenéticas geradas pelos métodos de Neighbour-joining, Máxima parcimônia e UPGMA demonstraram divisão entre espécies de crescimento lento e de crescimento rápido. O método de Máxima parcimônia também foi eficaz na distinção entre as micobactérias estritamente patogênicas, potencialmente patogênicas e saprófitas. Os resultados mostram *htrA* como uma ferramenta alternativa para identificação e classificação de micobactérias.

Palavras-chave: *Micobactérias*; *htrA*; marcador molecular; filogenia

This performed an *in silico* analysis of *htrA* gene as an molecular marker to phylogenetic and identifications studies of mycobacterium species. The *htrA* sequeces of *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. marinum*, *M. abscessus* were obtained from GenBank (NCBI). The phylogenetic trees generated by Neighbour-joining, Maximum parsimony and UPGMA methods and showed a division between slow growing and rapid growth species. The Maximum parsimony method was also able to distinguish between strictly pathogenic, potentially pathogenic and saprophytic species. The results show *htrA* as an alternate tool for identification and classification of mycobacterium species.

Keywords: Mycobacterium species; molecular marker; phylogeny

1. INTRODUÇÃO

Micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, único da família *Mycobacteriaceae*, estão dentro do domínio *Archea*, filo *Actinobacteria*, Classe *Actinobacteria*, subclasse *Actinobacteridae*, ordem *Actinomycetales*, subordem *Corynebacterineae*. São micro-organismos aeróbicos ou microaerófilos com alto conteúdo G + C (Guanina + Citocina), são Gram-positivas, apesar de não se corar bem por este método sendo classificadas como álcool-ácido resistente [1]. O gênero *Mycobacterium* é composto por aproximadamente 130 espécies e 11 subespécies classificadas como: estritamente patogênicas (complexo *M. tuberculosis*, *M. leprae*), potencialmente patogênicas (*M. abscessus*, *M. ulcerans*) patógenos raros ou saprófitos (*M. smegmatis* e *M. phlei*) [2].

A identificação das micobactérias tradicionalmente é realizada através de provas bioquímicas, que são trabalhosas e consomem tempo, principalmente para as espécies de crescimento lento [3]. Desta forma a busca por genes que possibilitem a distinção entre essas espécies, bem como interferências filogenéticas é extremamente importante para maior entendimento deste gênero e para o desenvolvimento de técnicas eficazes de diagnóstico.

O gene *htrA* é codificador da proteína de choque térmico HtrA (high-temperature requirement A), também conhecida como DegP ou DO protease [4]. Proteínas de choque térmico são altamente conservadas, induzidas no intuito de favorecer os organismos frente a estresses ambientais como elevadas temperaturas, estresses oxidativos e osmóticos [5].

Diversos estudos têm relacionado HtrA com a virulência de bactérias Gram-negativas e positivas [6,7], além de evidenciar principalmente sua importância no mecanismo de resposta a estresses e sobrevivência.

Recentemente, proteínas de choque térmico tem sido alvo de vários estudos filogenéticos e taxonômicos para caracterização do gênero *Mycobacterium* [8,9,10]. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar a relação filogenética de espécies de micobactérias através de sequências do gene *htrA* disponíveis no GenBank do NCBI, avaliando o potencial deste gene para distinção dessas espécies.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A localização das sequências de HtrA foi realizada a partir de busca no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), através de palavras-chave (ex.: HtrA, *Mycobacterium*), foram encontradas 79 sequências disponíveis, porém essas sequências representam apenas 7 espécies diferentes de *Mycobacterium*. As sequências de nucleotídeos dos genes *htrA* selecionados foram submetidas ao alinhamento local com o programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para avaliação de suas similaridades entre si. Adicionalmente, foi escolhido como grupo-irmão o gene *htrA* de *Streptomyces coelicolor* (por pertencer a mesma ordem) e como grupo externo *Staphylococcus aureus* (tabela 1).

Tabela 1: Informações das sequências de *htrA* incluídas no estudo.

Espécie	Acesso ao GenBank	Gene ID	Localização no genoma
<i>Mycobacterium bovis</i>	NC_002945.3	1093771	1367119 – 1368705
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	NC_000962.2	888912	1365875 – 1367461
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	NC_008611.1	4549909	5011285 – 5012799
<i>Mycobacterium marinum</i>	NC_010612.1	6228496	5190576 – 5192090
<i>Mycobacterium leprae</i>	NC_011896.1	7326547	1240812 – 1242413
<i>Mycobacterium abscessus</i>	NC_010937.1	5963886	1361078 – 1362556
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	NC_008596.1	4533606	2035981 – 2037018
<i>Streptomyces coelicolor</i>	NC_003888.3	1099413	4379364 – 4380923
<i>Staphylococcus aureus</i>	NC_009641.1	5330533	989878 – 992202

Para o alinhamento das sequências e geração de árvores todas as sequências escolhidas foram salvas em formato multifasta e alinhadas diretamente no Programa MEGA 4 [11]. O alinhamento tinha 2373 pb e foi editado visualmente com a eliminação de regiões pouco informativas, autapomorfias. Por exemplo, o grupo externo continha uma região inicial de 657 pb que não era compartilhada pelas outras sequências, sendo por isso eliminada (figura 1). Desta forma, optou-se por cortar a região inicial e final do alinhamento mesmo com a desvantagem de perder algumas informações, houve também a inserção de alguns “N” e a deleção/inserção de “gaps”. Após a edição o alinhamento ficou com 1707 pb. Por fim, foram geradas árvores pelos métodos de Neighbour-joining, máxima parcimônia, e UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) no programa MEGA 4.0, com análise de boot-strap com 1000 repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das árvores geradas com os três métodos estudados possibilitou observar a tradicional distinção entre espécies de micobactérias de crescimento lento (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. marinum* e *M. ulcerans*) das de crescimento rápido (*M. smegmatis*, *M. abscessus*), confirmando que essa é uma característica natural. Além disso, é evidente que micobactérias de crescimento rápido possuem as sequências mais plesiomórficas, estando relacionadas com o grupo-irmão e externo, permitindo inferir que essas espécies são filogeneticamente mais primitivas que as de crescimento lento. Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura que utilizaram o gene da proteína de choque térmico *hsp 65* para diferenciar micobactérias [9].



Figura 1: Alinhamento Múltiplo com MEGA 4. (a) Região inicial de autapomorfia, (b) Edição: corte da região inicial, inserção de “N”.

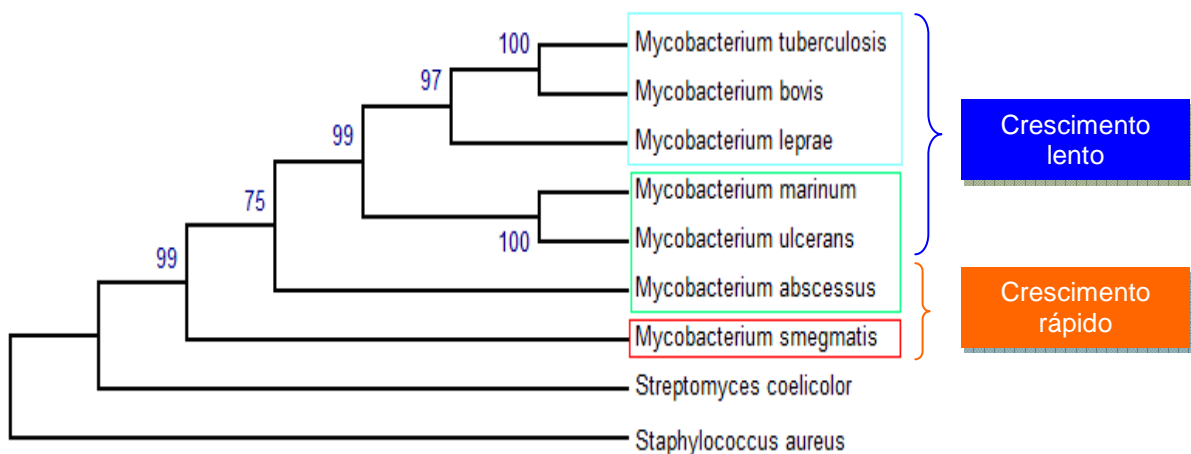


Figura 2: Análise filogenética de seqüências de nucleotídeos do gene *htrA* de micobactérias, utilizando o método de Máxima parcimônia. Cores: Azul: espécies potencialmente patogênicas; Verde: Estritamente patogênicas; Vermelho: saprófita

Todavia, não houve um consenso entre os diferentes métodos de construção da filogenia em relação à espécie mais plesiomorfica dentre as micobactérias estudadas. A análise pelo método de Máxima parcimônia indicou *M. smegmatis* como a mais primitiva, enquanto nos métodos de UPGMA e Neighbour-joining foi *M. abscessus*.

Na análise com Máxima parcimônia observa-se a formação de um agrupamento composto pelas espécies estritamente patogênicas (*M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. leprae*). As espécies potencialmente patogênicas também estão agrupadas, com *M. ulcerans* e *M. marinum* formando um clado bastante relacionado e *M. abscessus* ocupando um ramo diferenciado e a espécie saprofítica (*M. smegmatis*) ocupou o ramo mais basal (figura 2).

As análises por Neighbour-joining e UPGMA não agruparam as espécies segundo esta classificação. Paralelamente, ambas as análise agruparam as espécies de *M. tuberculosis* e *M. bovis*, como as de *M. ulcerans* e *M. marinum*. Com Neighbour-joining as estritamente patogênicas de foram agrupadas, porém não agrupou as espécies potencialmente patogênicas (figuras 3 e 4).

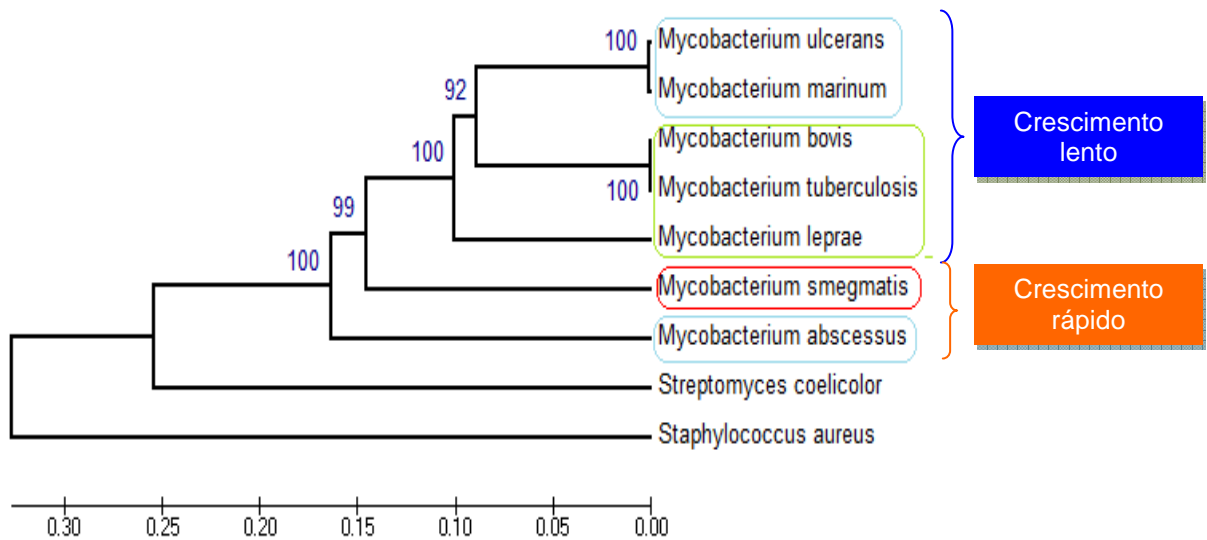


Figura 3: Análise filogenética de seqüências de nucleotídeos do gene *htrA* de micobactérias (UPGMA). Cor Azul: espécies potencialmente patogênicas; Verde: Estritamente patogênicas; Vermelho: saprófítica

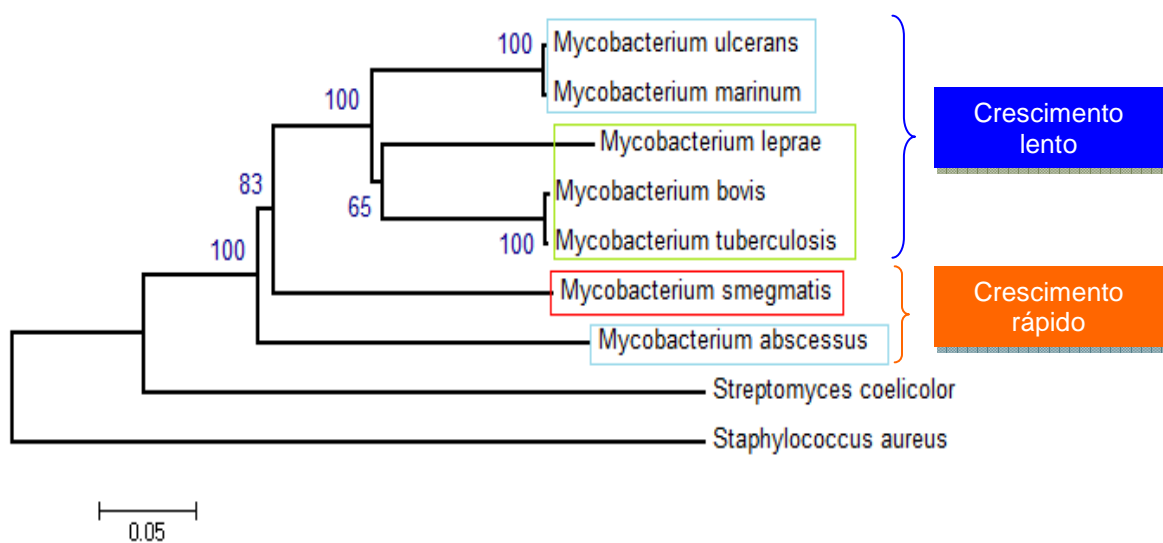


Figura 4: Análise filogenética de seqüências de nucleotídeos do gene *htrA* de micobactérias, utilizando o método de Neighbour-joining. Cores: Azul: espécies potencialmente patogênicas; Verde: Estritamente patogênicas; Vermelho: saprófítica

As diferenças encontradas nas árvores geradas pelos diferentes métodos de reconstrução filogenética podem ser explicadas pelas metodologias de análise empregadas. No desenvolvimento de árvores filogenéticas podem ser utilizadas dois tipos de análises: fenéticas ou cladísticas.

Os métodos de Neighbour-joining e UPGMA são exemplos de análises fenéticas. Esses empregam medidas de distância ou de similaridade genética, para consolidação estatística das diferenças entre os caracteres em um número. Então ocorre a criação de uma matriz de distância entre todos os possíveis pares do grupo de estudo, seguida do desenvolvimento de árvores agrupando aqueles com menor diferença em um fenograma. Esta taxonomia numérica é baseada nos seguintes princípios: a melhor classificação usualmente resulta de análises baseadas em um grande número de caracteres; todo caráter tem o mesmo peso; as classificações são baseadas em medidas quantitativas de similaridade ou distância entre taxons; os padrões de correlação entre caracteres podem ser usados para reconhecimento de um táxon distinto [12]. Em resumo, os métodos de agrupamento de distâncias, utilizam abordagens mais diretas. Em vez de buscar a árvore, dentre todas as possíveis, que otimiza um critério global estabelecido, constroem a árvore nó a nó escolhendo a cada passo um par de nós que serão conectados, sem voltar atrás nessa escolha [13].

Por outro lado, o método de Máxima Parcimônia utiliza as análises cladísticas. Neste as árvores são calculadas para cada caráter e então indicam a melhor árvore através da determinação daquela que requer menor número de mudanças (Máxima Parcimônia). A idéia básica por trás da cladística é que membros do mesmo grupo compartilham uma história evolucionária comum, e são relacionados, mais com membros do mesmo grupo do que com outros organismos. Esses grupos são reconhecidos por compartilharem características únicas que não estão presentes em um ancestral distante. A análise de máxima parcimônia seleciona árvores filogenéticas que minimizam o comprimento total da árvore ou o número de passos evolucionários necessários para explicar os padrões observados nos dados [14]. A parcimônia avalia as árvores, escolhendo caminhos que contêm a árvore com menor escore. Durante a busca, diferentes rearranjos podem ser feitos para aumentar a chance de cumprir toda distribuição parcial das árvores.

4. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo revela que o gene *htrA* apresenta potencial para ser aplicado como um marcador molecular alternativo não apenas para estudos filogenéticos como também para identificação de espécies de micobactérias. Por outro lado, a comparação entre os métodos de reconstrução filogenética estudados mostra que o método de Máxima parcimônia foi o mais eficaz para análise das sequências, mostrando resultados mais compatíveis com o que indica a literatura. Desta forma, estudos posteriores, com maior número de espécies, devem ser conduzidos para validar esta hipótese.

-
1. GOODFELLOW, M.; MAGEE, J. G. Taxonomy of mycobacteria, p. 1–49. In. GANGADHARAM AND, P. R. J; JENKINS, P. A. (ed.) *Mycobacteria I. Basic aspects*. New York: Chapman & Hall, 1998.
 2. BRENNER, J. D.; KRIEG, R. N.; STALEY, T. J. *Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria: introductory essays*. 2 ed. New York: Springer, 1995.
 3. HEIFETS, L. B.; JENKINS, P. A. Speciation of mycobacteria in clinical laboratories, p. 308–350. GANGADHARAM AND, P. R. J; JENKINS, P. A. (ed.) *Mycobacteria I. Basic aspects*. New York: Chapman & Hall, 1998.
 4. ICHIHARA, A. HA, D. B.; CHUNG, C. H. Protease Do is essential for survival of *Escherichia coli* at high temperature: its identity with the *htrA* gene product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176: 730–736. (1991).
 5. ANG, D.; LIBEREK, K.; SKOWYRA, D.; ZYLICZ, M.; GEORGOPOULOS, C. Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J Biol Chem.* 266: 24233–24236. (1991).

6. MOHAMEDMOHAIDEEN, N. N.; PALANINATHAN, S. K.; MORIN, P. M.; WILLIAMS, B. J.; BRAUNSTEIN, M.; TICHY, S. E.; LOCKER, J.; RUSSELL, D. H.; JACOBS, W. R. J.; SACCHETTINI, J. C. Structure and function of the virulence-associated high-temperature requirement A of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 47: 6092-102. (2008).
7. LEWIS, C.; SKOVIEROVA, H.; ROWLEY, G.; REZUCHOVA, B.; HOMEROVA, D.; STEVENSON, A. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium HtrA: regulation of expression and role of the chaperone and protease activities during infection. *Microbiology* 155: 873–881. (2009).
8. STEINGRUBE, V. A.; GIBSON, J. L.; BROWN, B. A.; ZHANG, Y.; WILSON, R. W.; RAJAGOPALAN, M.; WALLACE, R. J. J. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 149–153. (1995).
9. KIM, H.; KIM, S. H.; SHIM, T. S.; KIM, M.; BAI, G. H.; PARK, Y. G. Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (hsp65). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1649–1656. (2005).
10. CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L.; UEKY, S. Y. M.; MARTINS, M. C.; DURHAM, A. M.; ARBEIT, R. D.; CARDOSO, S. L. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC Microbiology* 8:48. (2008)
11. KUMAR S.; DUDLEY J.; NEI, M.; TAMURA, K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9: 299-306. (2008).
12. AVISE, J. C. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. New York, 1994.
13. KLEINBERG J., TARDOS, É. *Algorithm Design*. 1ed. Boston, Addison Wesley. 2005.
14. SWOFFORD, D.L. OLSEN, G.J. WADDELL, P.J. HILLIS, D.M.. *Molecular Systematics*. Sunderland, 1996.