

c-24 ESTEROL METILTRANSFERASE (ERG6) DE *Paracoccidioides brasiliensis*

SANTOS-SILVA, Ludier Kesser¹; RODRIQUES-SILVA², Christielly; CRUZ¹, Aline Helena da Silva; SOARES³, Célia Maria de Almeida; PEREIRA³, Maristela
Palavras-chave: *ERG6*, *Paracoccidioides brasiliensis*

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico causador da paracoccidioidomicose. Esta doença é endêmica na América Latina. A via inalatória é a principal porta de entrada do fungo no hospedeiro humano. Os antifúngicos atualmente disponíveis são frequentemente tóxicos nas dosagens terapêuticas e tem sido descrito o surgimento de isolados resistentes a antifúngicos, principalmente em pacientes imunodeprimidos. Alguns dos antifúngicos disponíveis afetam os esteróis da membrana de fungos em alvos que são comuns aos humanos, causando efeitos tóxicos aos pacientes. O ergosterol é o principal esterol da membrana plasmática de fungos que afeta a fluidez e a permeabilidade da mesma. O ergosterol difere do colesterol, esterol predominante em mamíferos, pela presença de um grupo metil no carbono 24 e das duplas ligações Δ^7 e Δ^{22} . A enzima esterol Δ^{24} esterol-C-metiltransferase (Erg6p), catalisa a adição do grupo 24-metil ao ergosterol e é ausente em humanos. Assim, a Erg6p é considerada um alvo para o desenvolvimento racional de drogas, com o intuito de evitar possíveis efeitos tóxicos. Desta forma nosso objetivo é caracterizar o cDNA *ERG6* de *P. brasiliensis* e a proteína Erg6p.

2. METODOLOGIA

Foram desenhados oligonucleotídeos, baseados na seqüência de cDNA parcial de *ERG6* detectados no transcriptoma de *P. brasiliensis* (<http://www.biomol.unb.br>). Em seguida, foi realizada uma reação de PCR utilizando o cDNA de micélio de *P. brasiliensis*. O segmento amplificado foi utilizado como sonda para realização do *Southern blot*, para verificar o número de cópias de *PbERG6* no genoma de *P. brasiliensis*. O clone contendo o cDNA completo de *PbERG6* foi seqüenciado e as seqüências obtidas foram analisadas no programa BLASTX. A seqüência referente à proteína predita Erg6p de *P. brasiliensis* foi analisada utilizando os programas CLUSTAL X e InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) e as relações de filogenia de *PbERG6* foram geradas com 17 Erg6p completas deduzidas de fungos disponíveis nas bases de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>). Uma árvore filogenética foi construída por alinhamento de múltiplas seqüências utilizando o programa CLUSTAL X e visualizada no programa Tree View.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *Southern blot* indicou a presença de apenas uma cópia do gene *ERG6* no genoma de *P. brasiliensis*. Foi obtida a seqüência parcial do gene *PbERG6*, com 1070 pb codificando uma proteína predita de 290 aminoácidos (Figura 1). As análises da seqüência parcial de *PbErg6p* demonstram que a mesma apresenta homologia com as proteínas Erg6p de fungos como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans* e *Candida glabrata* (Figura 2). A presença de motivos presentes em seqüências de metiltransferases dependentes de S-adenosil-metionina, sugere que o *PbERG6* deve codificar uma metiltransferase. A análise filogenética entre *PbErg6p* e Erg6p de outros

fungos mostra que *P. brasiliensis* formou um clado com fungos patogênicos do filo ascomycota (*A. fumigatus* e *A. nidulans*) (Figura 3).

```

1 GCACGAGGCCCAACATTCGCTCTGGAGTTATATCCTCTTGATATCCTCAA
51 CTGCTTGGGACCTCCAAATTTGAAGAAGACCAATTTGACTCTGAAATCCAC
101 TTGAGTAACTCCCTCCTTGTCTATTACGACACCTCTCTTCTCGCCACA

                                     M A P 3
151 ATCCCCCTCACTCGCTTCTACAACATATATAACCGCAACATGGCGCCA
+3 G V L E P E D H K R D A A F S K A 20
201 GGAAGTACTGAGCCTGAGGACCAACAGCTGATGCTGCTTCTCAGTAAGCC

+3 L H G T S A K R R G G L A A L T 36
251 CCTCCATGGCACTTCTGCAAAAGACGTGGTGGTCTGGCAGCTCTGACAG

+3 A K D R N A Q K A A L E E Y F K H 53
301 CCAGGAGTGCACACGCGCAAAAGCCGCTCTGGAGGAGTATTCAAGCAT

+3 W D Q K S S A D E T E E V R E A R 70
351 TGGACCGAAGTCTCTCGGAGTAAACTGAAGAAGTCAGAGGAGCCAG

+3 R A E Y A T L T R H Y V N L A T 86
401 ACGAGCGGAGTATGCTACTCTTACCGCAATTAATCTCAATCTTCTGACCG

+3 D F Y E Y G W G S S F H F C R F A 103
451 ATTCTATGAGTATGGCTGGGATCCTCTCCATTTCTCGCGCTCTCGCG

+3 Y G E P F R Q S I A R H E H Y L A 120
501 TAAGGCGAGCTTTCTCGCAATCTCATCGCTCGCATGAACATTAATCTGTC

+3 H W I G L K E N Q L V L D V G C 136
551 CCATTTGATAGTCTGAAGGAAACCAACTTGTCTTACGCTAGGCTGGG

+3 G V G G P A R E I V K F T G V N V 153
601 GTGTGTTGGCTGCTGCGAAGAAATTTGTAAGTTACGGGTGTCAAGTCT

+3 I G L N N N D Y Q I D R A I H Y A 170
651 ATTGGCTGAACAACACGACTACAGATCGATGTCGATCCTCAATTAAGC

+3 T K E G L S D K L R F T K G D F 186
701 CACCAAGGAGGCTGTCTGGATAAACTGCTTTACCAAGGAGATTTTA

+3 M Q M S F E P E T F D A V Y A I E 203
751 TGCAAGTCTGAAACCGGAGACTTTCTGATGAGTATTGCTATTGAA

+3 A T V H A P S L E G I Y S E I Y R 220
801 GCCACTGTCCAGCCCGCTCCTTGAAGCATATACAGTGAATTTATCG

+3 V L K P G G T F G V Y E W V M T 236
851 GGCTTTGAAGCCTGGTGTACTTTTGGTATATAGTGGGTTATGACTG

+3 D K Y D N D N A E H R E I R L G I 253
901 ACAATATGACAAATGACACGAGACCCGCGAAATCCGCTTGGAAAT

+3 E Q C N G I S N M V K A D V A L A 270
951 GAGCAAGGTAATGGCATCTCAACATGTCAGGCTGATGTTGCGCTTGC

+3 A I K T A G F E L L H A E D L A 286
1001 GGCCATTAAGACTGCTGGTTTGAACCTCTACATGCCGAAGATCTCGCAG

+3 D R G D 290
1051 ATCGAGGAGT

```

Figura 1. Sequência do cDNA de *PbERG6* e sequência predita de aminoácidos *PbErg6p*. O motivo da família de SMT dependente de SAM (caixa cinza); o motivo de ligação a SAM (negrito) e motivo de SMT (sublinhado).

```

A.fumigatus      MAPVALEQENHLRDAEFNRMHGSQAQFRGGFALRGKDSAAQAAVDEYFKHWNDKPAE 60
A.nidulans      MAPTALEKENHQRDDEFNAMHGNQAQKGFPAAMRQKSAQAQAAVDEYFKHWNDKSAE 60
P.brasiliensis  MAPGVLEPEDHHRDAAFKALHGTSAKRRGGLAALTAQRNAQKAALEEFKHWNDKSSA 60
C.albicans      MSPVQLAEKNYERDEQFTKALHGESYK-KTGLSALLAKSKDAASVAABGYFKHWNDGKIS 59
C.glabrata      MSELRQ----RQAEFTKELHGEAESRGTGLTALLSKNRNAQREAVSKYLHWDGKTDK 56
*: * * * * * : * . : * * * * * : * * * * *

A.fumigatus      DETEETRAARAEYATLTHRYNLAIDLVEYWGTSFHFRCFAQGEPPYQAIARHEHYLA 120
A.nidulans      TETEIREARAEYATLTHRYNLAIDLVEYWGTSFHFRCFAQGEPPYQAIARHEHYLA 120
P.brasiliensis  DETEEVREARAEYATLTHRYNLAIDLVEYWGTSFHFRCFAQGEPPYQAIARHEHYLA 120
C.albicans      DD----EKRINDYSQLTHRYNLAIDLVEYWGTSFHFRCFAQGEPPYQAIARHEHYLA 115
C.glabrata      EA----EDRRLEDYNEATHSYNVDLVEYWGTSFHFRCFAQGEPPYQAIARHEHYLA 112
. * * * * * : * . : * * * * * : * * * * *

A.fumigatus      HQMGIKGEMKVLVDVCGVGGPAREIVKFTDANVGLNNDYQIERATRYAEREGLSHKL 180
A.nidulans      HQMGIKGEMKVLVDVCGVGGPAREIVKFTDAHVTGLNNDYQIQRATRYAEREGLSHKL 180
P.brasiliensis  HWIGLKENQLVDVCGVGGPAREIVKFTGVNVLGLNNDYQIDRAIHYATKGLSKLR 180
C.albicans      HKMNLNEMKVLVDVCGVGGPAREITRTDCEIVGLNNDYQIERANHYAKKHLHDKLS 175
C.glabrata      VMAGIKKGLVDVCGVGGPARTARTPTGCIIGLNNDYQIQKAKIYAKYNLQDHMD 172
: . : . * * * * * : * . : * * * * * : * * * * *

A.fumigatus      FVKGDFMQMFPDNSFDVAIYEAETHAPLEAGVYKEIFRVLKPGVGVYEWLMTDAYD 240
A.nidulans      FVKGDFMQMFPDNSFDVAIYEAETHAPLEAGVYKEDRVLKPGVGVYEWLMTDAYD 240
P.brasiliensis  FTKGDFMQMSEPEPFDVAIYEAETHAPLEAGVYSEIYRVLKPGVGVYEWVMTKYD 240
C.albicans      YVKGDFMQMDFEPEPFDVAIYEAETHAPLEAGVYSEIYRVLKPGVGVYEWVMTKYD 235
C.glabrata      FVKGDFMNMDFEPEPFDVAIYEAETHAPLEAGVYSEIYRVLKPGVGVYEWVMTENYD 232
: * * * * * : * . : * * * * * : * * * * *

A.fumigatus      NDNPEHRRIRLGLDGIENMVKVSEGLTAFKNAGFELLHEDLADRPDAIPWYPLAG 300
A.nidulans      NDNPEHRRIRLGLDGIENMVKVSEGLAIAKEGLELLHEDLADRPDAIPWYPLAG 300
P.brasiliensis  NDNPEHRRIRLGLDGIENMVKADVALAIAKTAGFELLHEDLADRGD----- 290
C.albicans      ETNEHRRIAVGIYEVGDGIPKMYKVAEQALKVGFIEYEQDLADVDDEIPWYPLSG 295
C.glabrata      ENNEHRRIAVGIYELDGIIPKMFYDVAQALKVGFIEYEQDLADDEDDEIPWYPLTG 292
: * * * * * : * . : * * * * * : * * * * *

A.fumigatus      SFKHMTSPWDFPTIARMTWGRGIAHRFCGAMETIIGLFPKGTQKTADSLAIAIGDCLVAGG 360
A.nidulans      SFKHMTSPWDFPTIARMTWGRGLVHRFVCGAMETIKLIPQCTQKTADSLAIALDCLVAGG 360
P.brasiliensis  ----- 360
C.albicans      DLKFCQTFGDVLTFRVTRSRIGRPIITTSVGLMEKIGLAPKGSQVTHAEDAANLVLEGG 355
C.glabrata      EWKLVQSLSDIATFFRTSYGRKFINCMVSIEMKVGVAPOGSEVETAALENAVALVEGG 352

A.fumigatus      EKKLFTPMLMVRKPE---- 377
A.nidulans      EKKLFTPMLMVRKPE---- 377
P.brasiliensis  ----- 377
C.albicans      RQKLFPMMLYVVRKPLEKID 376
C.glabrata      RKKLFTPMLFVAKKPEDAK- 372

```

Figura 2. Alinhamento da sequência predita *PbErg6p* com os organismos *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *C. albicans* e *C. glabrata*. Os asteriscos indicam os resíduos de aminoácidos conservados. Os símbolos (: e .) denotam, em ordem decrescente, a similaridade entre os aminoácidos correspondentes. As barras (-) indicam regiões onde um espaço foi introduzido para otimizar a homologia entre as sequências.

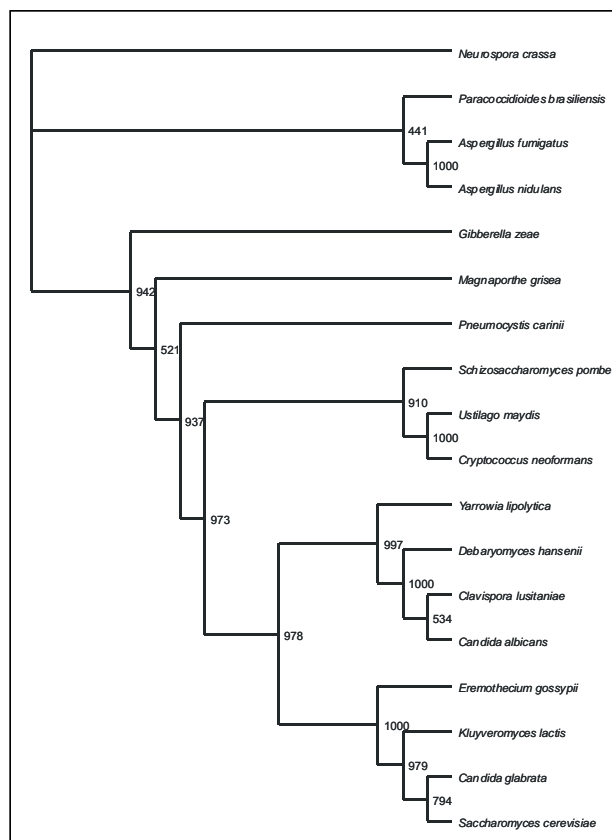


Figura 3. Árvore filogenética ilustrando a relação de *PbErg6p* a outras *Erg6p* de fungos. Os números os ramos indicam os valores de *bootstrap* obtidos de 1000 replicatas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F. **Estudos comparativos do granuloma coccidioico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro.** An. Fac. Med. S. Paulo. 5: 125-141, 1930.
- CASTRO, R.M. CUCÉ, L.E. and FAVA-NETTO, C. **Paracoccidioidomicose. Inoculação experimental in “anima nobile”. Relato de um caso.** Med. Cutan. Ibero Lat. Amer. 3: 289-292, 1975.
- GABER, R.F. COPPLE, D.M. KENNEDY, B.K. VIDAL, M. and BARD, M. **The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol.** Mol Cell Biol. 9(8): 3447-56, 1989.
- KAGAN, R.M. and CLARKE S. **Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes.** Arch Biochem Biophys. 310(2): 417-427, 1994.
- GEORGOPAPADAKOU, N.H. and WALSH, T.J. **Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies.** Antimicrob. Agents. Chemother 40: 279-291, 1996.
- McCAMMON, M.T. HARTMANN, M.A. BOTTEMA, C.D. and PARKS, L.W. **Sterol Methylation in Saccharomyces cerevisiae.** Journal of Bacteriology. Feb: 475-483, 1984.

6. FONTE DE FINANCIAMENTO – IFS, CNPq, CAPES and FUNAPE/UFG.

¹ Bolsistas de Pós Graduação. Instituto de Ciências Biológicas - LBM - Laboratório de Biologia Molecular, kesser.ss@bol.com.br, alinebioufg@yahoo.com.br

² Bolsista de Iniciação Científica

³ Orientadora ICB/UFG mani@icb.ufg.br e colaboradora ICB/UFG celia@icb.ufg.br