

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE EVOLUTIVA DA FAMÍLIA METACASPASE EM VIRIDIPLANTAE

Fagundes, D¹; Bohn, B¹; Leipelt, FR¹; Dias, N¹; Cabreira, C²; Bodanese-Zanettini, MH²; Cagliari, A¹.

¹ Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS - Santa Cruz do Sul-RS

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS - Porto Alegre-RS

Introdução

A morte celular programada (MCP) é um organizado e geneticamente controlado processo de suicídio celular em resposta à condições de estresse (figura 1). A MCP ocorre em todos os eucariotos e é essencial para o desenvolvimento e sobrevivência contra a invasão de patógenos e outros estímulos externos. Metacaspases são uma família de proteínas semelhantes às caspases que estão envolvidas com a resposta à MCP em animais. Genes metacaspases foram identificados em plantas, fungos e protozoários.

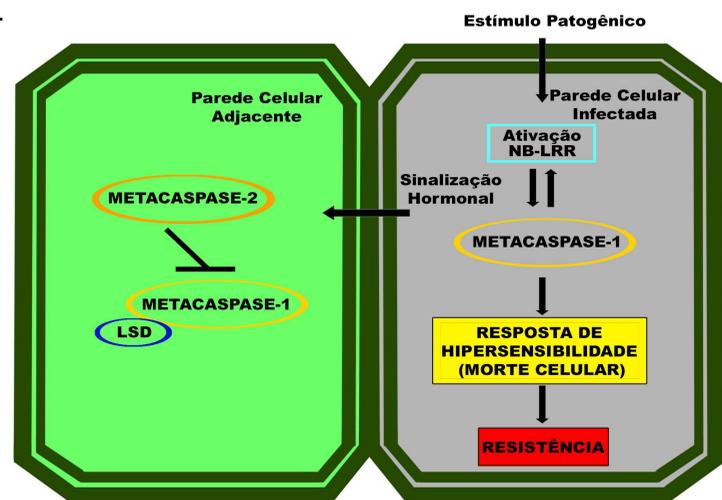


Figura 1. Papel das metacaspases na morte celular programada. Em plantas, metacaspase tipo I regula positivamente a resposta de hipersensibilidade na morte celular através do NB-LRR (domínio de ligação de nucleotídeos) que reconhece o agente patogênico no local de infecção. LSD1 regula negativamente a propagação da morte celular em células adjacentes/vizinhas do sítio de infecção, supostamente através da ligação com Metacaspase tipo I, deixando-a inativa no citoplasma. Metacaspase tipo II regula negativamente a função da metacaspase tipo I através de um mecanismo ainda desconhecido.

Metacaspases em plantas são classificadas em tipo I e tipo II, com base na sua estrutura proteica. As metacaspases do tipo I podem ou não apresentar um pró-domínio rico em prolina/glutamina e um motivo dedo de zinco na região N-terminal e, necessariamente, possuem um domínio metacaspase na região C-terminal. Metacaspases tipo II não possuem o pró-domínio e o motivo dedo de zinco e possuem uma longa região ligante (Linker) entre as subunidades catalíticas do domínio metacaspase (figura 2).

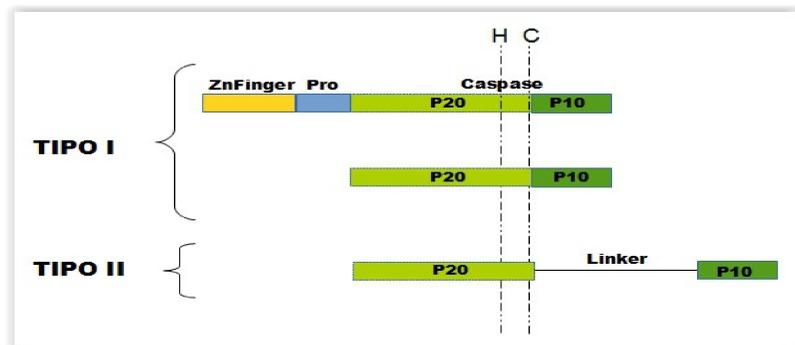


Figura 2. Estrutura das Metacaspases. Essas proteases podem ser divididas em 2 classes, tipo I e tipo II, baseado em sua estrutura. As metacaspases tipo I podem ou não apresentar um pró-domínio rico em Prolina e um motivo dedo de zinco (ZnFinger) na região N-terminal, e necessariamente possuem um domínio metacaspase na região C-terminal. Metacaspases tipo II não possuem o pró-domínio e o motivo dedo de zinco, mas possuem uma inserção (linker) entre as subunidades catalíticas P20 e P10.

Objetivo

Identificar, classificar e realizar uma análise filogenética da família gênica Metacaspase em Viridiplantae, incluindo representantes de espécies monocotiledôneas, dicotiledôneas, musgos, pteridófitas e algas.

Metodologia

As seqüências codificantes das proteínas metacaspases melhor caracterizadas e presentes em *Arabidopsis thaliana* foram usadas como iscas para buscas usando a ferramenta BLAST (tBLASTx e BLASTN) realizadas contra o banco de dados Phytozome (<http://www.phytozome.org/>). Após isso, os domínios proteicos presentes em todos os genes metacaspases foram analisados utilizando o programa MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/>). A análise filogenética usando as seqüências consenso completas das proteínas metacaspases identificadas foi realizada utilizando o software BEAST v.1.4.7 (30 milhões de gerações) a fim de verificar a relação filogenética entre os genes identificados.

Apoio

UERGS – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul
 UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
 FAPERGS – Fundação de Amparo a pesquisa do Rio Grande do Sul
 CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Resultados e Discussão

As seqüências putativas identificadas foram analisadas quanto à presença dos domínios anteriormente descritos, usando dados do próprio Phytozome. Identificamos ao todo 258 genes pertencentes ao tipo I e 112 genes pertencentes ao tipo II de metacaspases. Dentro do grupo de metacaspases do tipo I, identificamos 75 genes que apresentam e 183 genes que não apresentam o pró-domínio e o motivo dedo de zinco na extremidade N-terminal. Ao realizarmos a árvore filogenética, observamos que houve a formação de dois grupos filogeneticamente distintos contendo as proteínas metacaspases do tipo I e metacaspases tipo II, enquanto as seqüências dos organismos mais basais ficaram distribuídas externamente fora dos dois grandes grupos formados (figura 4).

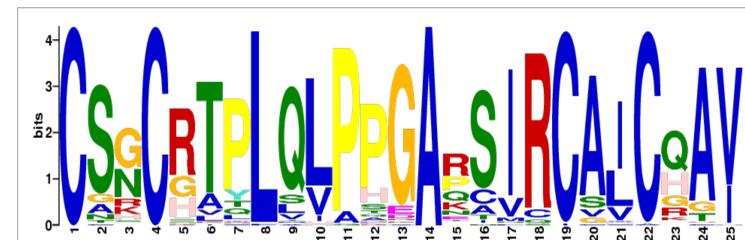


Figura 3. Análise da conservação da seqüência consenso da família Metacaspase (domínio ZnFinger). A análise dos 370 genes metacaspase foi realizada utilizando a plataforma/ferramenta MEME. A altura total em cada pilha indica a seqüência conservada em cada posição. A altura de cada letra é proporcional à frequência relativa correspondente. Os aminoácidos estão coloridos conforme sua propriedade química: Azul para a maioria dos resíduos hidrofóbicos (A, C, F, I, L, V e M); Verde para polares, sem carga, sem resíduo alifático (N, Q, S e T); Vermelho para resíduos positivamente carregados (K e R); Laranja para glicina (G); Rosa para histidina (H); amarelo para prolina (P) e turquesa para tirosina (Y).

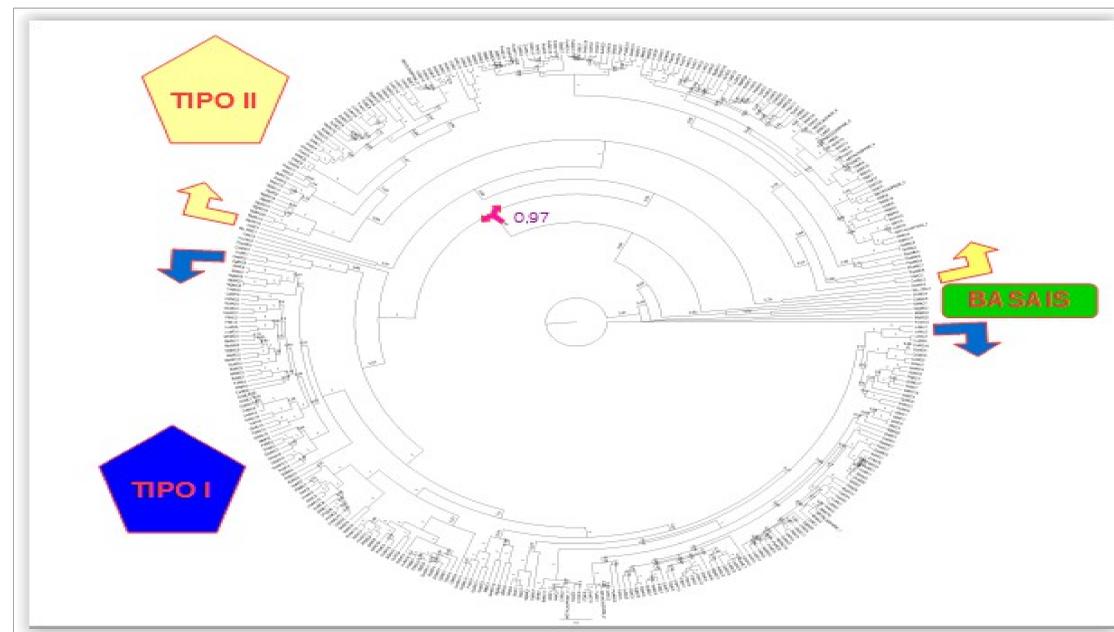


Figura 4. Análise Bayseana que relaciona os genes Metacaspases tipo I e tipo II, em Viridiplantae. Os genes do tipo I são delimitados pelas setas azuis, enquanto os genes tipo II são delimitados pelas setas amarelas. Existe alguns genes que não pertencem à nenhum desses grupos, estes genes representam os genes de espécies mais basais.

Considerações finais

Identificamos cópias de metacaspases em todos os organismos analisados, variando de uma à 20 cópias. E esses genes apresentam uma grande conservação em seus domínios.

Podemos concluir também que a diversificação entre tipo I e tipo II ocorreu antes da diferenciação entre mono e dicotiledôneas pois exemplares desses dois grupos se encontram em todos os clusters da árvore.

Nossa análise demonstrou que os organismos basais apresentam genes pertencentes às classes tipo I sem ZnFinger e tipo II, indicando talvez que a classe tipo I com ZnFinger teria um caráter derivado, sendo o domínio ZnFinger adquirido ao longo da evolução da família Metacaspase (Figura 5).

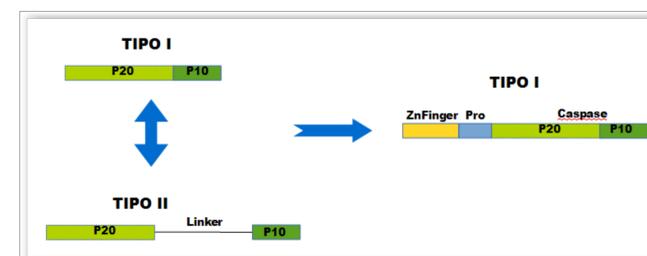


Figura 5. Modelo para evolução das classes da família Metacaspase em Viridiplantae. Os genes pertencentes à classe tipo I com ZnFinger teriam surgido a partir de um gene do tipo I sem ZnFinger ou tipo II, presente em organismos basais, através da aquisição do domínio ZnFinger