

CATALASE A DE *Paracoccidioides brasiliensis*: IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA, CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO cDNA.

Chagas, R. F.¹; Bailao, A. M.²; Pereira, M.³; Felipe, M. S. S.⁴; Soares, C. M. A.⁵
^{1,2,3,5}Universidade Federal de Goiás – Laboratório de Biologia Molecular - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular ; ⁴Universidade de Brasília - Laboratório de Biologia Molecular - Departamento de Biologia Celular

(*ronneyfc@posgrad.ufg.br)

INTRODUÇÃO E MATERIAL E MÉTODOS

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica restrita na América Latina, sendo relatada principalmente no Brasil, Colômbia e Venezuela. A doença é causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. *P. brasiliensis* apresenta-se sobre duas formas morfológicas: micélio no solo e levedura no hospedeiro. A infecção é adquirida pela inalação de propágulos que caem nos alvéolos, e diferenciam-se em leveduras.

Dentro do hospedeiro o fungo, *P. brasiliensis* é sujeito consideráveis formas de estresse oxidativo, visto que a primeira linha de defesa do hospedeiro contra o parasita é a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), estas moléculas são extremamente reativas causando danos nas proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos.

Para minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo, os organismos aeróbicos apresentam defesas não-enzimáticas e enzimáticas. Não enzimáticas envolvem moléculas tais como, vitamina C e E, glutatona e β -caroteno, e defesas enzimáticas, tais como, superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPX), peroxiredoxina e catalase.

Catalases (H_2O_2 : H_2O_2 oxirredutase, EC 1.11.1.6) são enzimas que convertem o H_2O_2 em O_2 e H_2O . Três famílias de genes para catalases são descritas: catalase manganês, das quais tem sido relatadas em procariotos, catalase peroxidase, encontradas em procariotos e em eucariotos, e catalases verdadeiras, correspondendo a enzimas homo-tetraméricas contendo o grupo heme.

Um cDNA codificante para catalase A de *P. brasiliensis* (*Pb CatA*) foi caracterizada (GenBank número de acesso AY494834). O cDNA completo apresenta 2583 nucleotídeos codificando uma deduzida proteína de 760 aminoácidos. Análises *in silico* mostrou a presença de seqüências homólogas para sítio ativo, sítio de ligação ao grupo heme, bem como resíduos de aminoácidos relatados a ligação da proteína ao substrato. Análises de homologia e filogenia indicam que *Pb CatA* é homóloga a outras catalases de subunidades grandes de fungos patogênicos.

A expressão do transcrito codificando *Pb CatA* foi realizado através de análises Northern blot do RNA total do fungo. O mRNA é mais abundante na forma miceliana que na forma leveduriforme de *P. brasiliensis*.

Palavras chave: infecção fungica, estresse oxidativo, catalases.

RESULTADOS

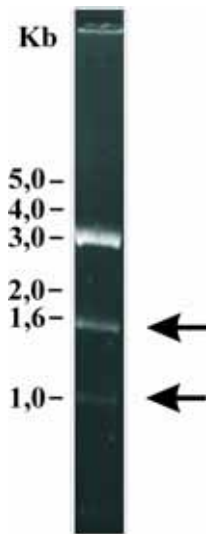


Figura 1: Análise em gel de agarose de *Pb catA*. O cDNA foi obtido por screening de uma biblioteca de cDNA (λ Zap II) da forma de levedura de *P. brasiliensis*. O cDNA foi digerido com endonucleases de restrição *EcoRI* e *XhoI*. Os números à esquerda correspondem ao tamanho do marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen Corporation) e as setas indicam os fragmentos de DNA obtidos pela digestão do cDNA.

```

-70 ggcacgaggaaaacgcaaggggaaataaaaaatacaataaaaacttcttaaaggtacgacaacgttttc
1      M A S K A T E G L R K I Q G M V E S M
-14 ccacgttgcgaccATGGCTAGCAAGGCTACAGAAGGATTACGGAAGATCCAGGGGATGGTGGAAAGCAT
20    H P G N K K V A D L A R D T V D V H A P A P F
57    GCATCCCGGGAACAAAAGGTCGCAGACCTCGCCCGTGATACCGTCGATGCCACGCGCTGCTCCTTTC
44    T T D H G T K V S N T D N W L R A A S E N Q T
128   ACCACCGACCACGGGACCAAAAGTCAGCAATACAGACAATTGGTTGAGGGCTGCATCCGAAAATCAAACCTG
68    G P S L L E D Q I A R E K I H R F D H E R I P E
199   GCCCGTCGTTGTTGGAGGATCAGATTGCTCGCGAAAAGATCCATCGGTTTGATCATGAAAGAATCCCAGA

      ↓
93    R V V H A R G T G A F G H F K L V E S A E D A
270   GCGCGTTGTGCATGCTCGAGGAACAGGTGCCCTTCGGGCACTTCAAACCTGTTGAGAGCGCAGAAAGACGCA
117   T S A G V L T D T S R T T P V F V R F S T V Q
350   ACTTCTGCGGCGGTGTTAACTGATACTTCACGGACAACCTGTTTTTGTCCGCTTTTCTACCGTCCAAG
141   G S K G S F D T V R D V R G F A T K F Y T Q E G
421   GTAGCAAAAGGCAAGTTTCGATACAGTCCGTCGATGTCGTCGTTTCGCCACCAAGTTTATACGCAAGAAGG
266   N N D L V G N N I P V F F I Q D A I K F P D Y
491   CAATTGGGATCTTGTGGCAATAATATTCTGTCTTTTTATCCAGGATGCCATAAAATTTCTGACTAT
290   V H A I R V P H N E V P D G Q T A H N N F W D
562   GTGCATGCGATTCTGTACCTCATAACGAAGTTCGGATGGACAACTGCGCATAACAACCTTCTGGGATT
314   F V Y M H P E A T H M F M W A M S E R A I P R S
633   TTGTATACATGCATCCAGAAGCTACGCATATGTTTATGTGGGCAATGAGTGAACGGGCAATCCCGCGCAG
339   Y R M M Q G F G V N T F V L V N K E G K R H F
704   TTATCGTATGATGCAAGGTTTCGGCGTTAACACTTTTGTCTAGTAAATAAAGAGGGAAGAGACATTTTC
363   V K F H W M P H L G V H S I I P D E S I K L I
775   GTGAAGTTCCATTGGATGCCGCACCTAGGTGTTTCATTCGATCATACCTGACGAGTCTATTAAGCTGATTG
436   Y P E S L I P V R Y I G E M E L N R N L D E F
988   TACCTGAATCCCTAATACAGTACGGTATATCGGCGAAATGGAGCTCAACCGCAACCTCGATGAGTTTT
466   F P Q T E Q V A F C T A H I V P G I E F S D D P
1059  TCCCAGACAGCAAGAGTTGCCTTCTGCACGCCACATTGTTCTGGAATTGAATTCCTCCGACGATCC
491   L L Q G R N F S Y F D C I T R L G V N W E E
1130  TCTGCTGCAAGGACGCAATTTCTCTATTTTCGACACTCAAATCACCCGCTGGGCGTCAACTGGGAAGAG
515   I P I N R P V C T V M N H N R D G A M P H K I
1201  ATCCCTATCAACCGTCTGTGTGCACTGTCATGAATCACAACAGGGATGGTGCATGCCACACAAGATAA
539   T Q G G T V N D W P N R F E A C P P T K P K D G G
1273  CCCAAGGTACCGTCAACGATTGGCCCAACGTTTTGAGGCTTGCCCAACCCACGAAGCCCAAGGACGGGGG
710   A V S A M G A L T L I I D T K R Q P V F A D D
1770  CGCGGTGAGCGCCATGGGTGCGCTAACCTTGATAATCGACACAAAGCGGCAACCGTCTTTGCCGACGAC
783   A E Q F G H C K A I G A T G E A V D L I A Q V
1986  TGCAGAACAGTTCGGACATTGCAAGGCCATAGGTGCTACAGGGGAAGCTGTGGATCTTATCGCCCAAGTT
807   L N S L P G L N V A L A S S S D V V E W Y G V
2057  CTGAACAGCCTGCCTGGTCTAAACGTTGCGTTGGCTCATCTAGCGATGTTGTCGAATGGTACGGCGTTG
831   V T S S K L H E P H T L T E G F K L F P E A K D
2128  TCACATCAAGCAAGCTGCACGAACCCACACTTTGACAGAAGGGTTCAAGTTATTCCTTGAGGCGAAGGA
856   F L G K F L Y Q V S Q H R N Y Q R D M V G L T
2199  TTTCTGGGCAAGTTCCTGTACCAAGTTTCACAACATCGGAATTATCAGAGAGATAGGTAGGATTGACT
880   D Q V A F #
2270  GATCAGGTCGCATTTTAATcagggggcactaggtattgtgggtgattggagaaaacttcaagaaccctt
2341  caaaacaccaaaaaaatggggagaaaaattgtttgattcttcttatgtctttttgaaattgttctct
2412  gatgcttctgtttcttaaaccaataatgctcaacaatgccaatcttcacaatcacagtaacaacatagg
2483  ttggttaaagtaatttatgaaaaaaaagaaaaaacttcataatataaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Figura 02: Deduzida sequência de nucleotídeos e aminoácidos da Catalase A de *P. brasiliensis*. As letras em minúsculo indicam as seqüências não codificante.

Figura 03: Comparação da seqüência deduzida de aminoácidos de *Pb* CatA com outras catalases de eucariotos. As seqüências são: *Aspergillus oryzae* (GenBank BAC56946), *Aspergillus nidulans* (GenBank P55305), *Aspergillus fumigatus* (P78574), *Ajellomyces capsulatus* (GenBank AAF01462), *P. brasiliensis* (AAR87484). Asteriscos (*) definem identidade, dois pontos (:) definem substituições conservadas e um ponto (.) define substituições semi conservadas de aminoácidos

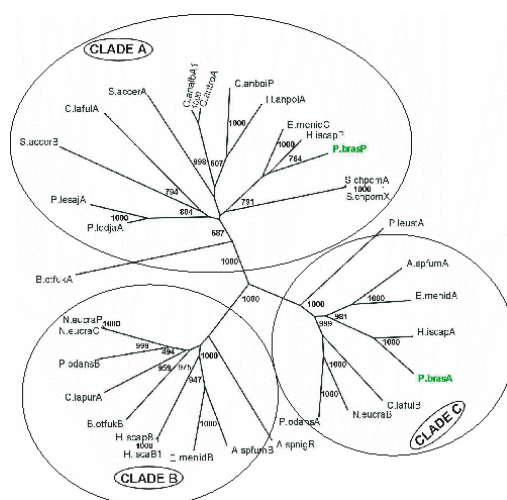


Figura 04 : Árvore filogenética ilustrando a relação de *Pb* CATA com seqüências relacionadas. AspfumA (AFU87630) and AspfumB (AFU87850)- *Aspergillus fumigatus*, AspnigR (Z23138)- *Aspergillus niger*, BotfukA (Z54346) and BotfukB (AF243853)- *Botryotinia fuckeliana*, CanalbA1 (AB006327)- *Candida albicans*, CantroA (M18832)- *Candida tropicalis*, CanboiP (AB064338)- *Candida boidinii*, ClafulA (AF222055) and ClafulB (AF222056)- *Cladosporium fulvum*, ClapurA (AJ001386)- *Claviceps purpurea*, EmenidA (U37803), EmenidB (U80672) and EmenidC (AF316033)- *Emericella (Aspergillus) nidulans*, HanpolA (X56501) - *Hansenula polymorpha*, HiscapA (AF189368), HiscapB (AF139985 and AF026268) and HiscapP (AF189369)- *Histoplasma (Ajellomyces) capsulatum*, NeucraB (AY027545) and NeucraC (AY027544)- *Neurospora crassa*, PleostA (U75451) - *Pleurotus ostreatus*, PledjaA (U75450)- *Pleurotus djamar*, PlesajA (Af286097) - *Pleurotus sajor-caju*, PodansA (AJ011298) and PodansB (AJ011390) - *Podospora anserina*, SacceraA (X13028) and SacceraT (X04625) - *Saccharomyces cerevisiae*, SchpomA (D89126) and SchpomX (D55675) - *Schizosaccharomyces pombe*, PbrasA (AAR87484) and PbrasP (AF42876) - *Paracoccidioides brasiliensis*.

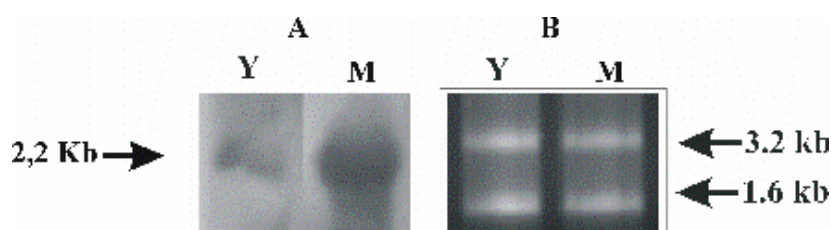


Figura 05: Análise dos transcritos de *Pb cata* em células de micélio e levedura. Painel A: expressão de *Pb catA* em células de levedura (Y) e de micélio (M). Painel B: controle de rRNA.

Discussão/Conclusão

► Diversos genes codificando proteínas envolvidas na defesa do estresse oxidativo em *P. brasiliensis*, tem sido descritos tais como duas catalases, *Pb CATP* catalase de subunidade pequena, provavelmente localizada nos peroxissomos e *Pb CATA*, catalase de subunidade grande. O cDNA de 2,5 kb codificando a catalase A foi obtido e seqüenciado, GenBank (número de acesso AY494834).

► O cDNA seqüenciado apresentou 2619 nucleotídeos, dos quais 85 bases na 5' UTR e 255 na 3' UTR. A deduzida seqüência de aminoácidos indicou uma proteína de 760 resíduos de aminoácidos. A ORF codificou uma proteína de massa e pI preditos de 84 kDa e pI 6.12. Análise na seqüência de *Pb CATA* evidenciou regiões das quais são importantes para a atividade enzimática, tais como sítio catalítico, ligação ao grupo heme, sítios de fosforilação a proteína kinase C, e resíduos relatados a correto dobramento e ligação da proteína a molécula de peróxido de hidrogênio.

► A seqüências de catalases de diversos fungos foram agrupadas em três clados distintos: clado A (catalases de subunidade pequena), clados B e C (ambos para catalases de subunidade grande).

► Foi detectado uma única espécie de mRNA de 2,2 Kb, preferencialmente expresso em micélio.

► A alta homologia de *Pb CATA* com outras catalases esporo associadas e devido ao acúmulo de transcritos na fase miceliana, pode-se sugerir que *Pb CATA* pode conferir proteção aos efeitos tóxicos do H₂O₂ presente nos substratos naturais para esse organismo, gerados pelos processos metabólicos ou interação com o hospedeiro, visto que o primeiro contato de *P. brasiliensis* com o hospedeiro ocorre através da inalação dos conídios.

Revisão Bibliográfica

Angulo-Ortega, A., Pollak, L. 1971. **Paracoccidioidomycosis**, p. 507-560. In R.D.Baker (ed.), The pathological anatomy of the micoses. Human infections with fungi, actinomycetes and algae. Springer-Verlag, Berlin.

Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. **Cell. Mol. Scien.** **61**: 192-208

Moreira, S.F.I., Bailão, A.M., Barbosa, M.S., Jesuíno, R.S., Felipe, M.S., Pereira, M., Soares, C.M.A. 2004. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis **Yeast**. **21**:173-82.

Romani, L. 2004. Immunity to fungal infections. **Nature** **4**:1-13.

Thorpe, G.W., Fong, C.S., Alic, N., Higgins, V.J., Dawes, I.W. 2004. Cells have distincts mechanism to maitain protection against diferent reative oxygen species: Oxidative-stress-response genes. **PNAS**. **17**:6564-6569.