



OBTENÇÃO DA METACASPASE CaMCA-Ia DE *Candida albicans* CONTENDO MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS DO CENTRO ATIVO E DO SUB-SÍTIO S1

Vitória Caroline Domingues Rios¹; Mariana N.R. Trujilho²; Laura A.M. Dalzoto³; Taiz Reis⁴; Maurício Ferreira Marcondes Machado⁵.

1. Estudante do curso de Farmácia; e-mail: vitoriacrios@gmail.com;
2. Doutoranda em Biotecnologia - UMC; e-mail: marianatrujilho@hotmail.com;
3. Mestranda em Biotecnologia - UMC; e-mail: lauradalzoto@gmail.com;
4. Professora - UMC; e-mail: taizsantos@umc.br;
5. Professor - UMC; e-mail: mauriciomachado@umc.br.

Área de conhecimento: Biologia molecular.

Palavras-Chave: Clonagem, metacaspase, mutação, expressão proteica.

INTRODUÇÃO

As metacaspases e paracaspases são enzimas que foram identificadas com base na semelhança estrutural com as caspases de mamíferos, mas estudos posteriores demonstraram que estas são desprovidas da afinidade por aspartato, por isso a nomenclatura dessas enzimas tem causado discussão no meio científico (UREN *et al.*, 2000). Apesar das similaridades na estrutura, as proteases da família C14 apresentam uma diferença bioquímica marcante que é a especificidade por substrato (TSIATSIANI *et al.*, 2011). As metacaspases apresentam especificidade por substratos com resíduos de Arginina (Arg) ou Lisina (Lys) na posição P₁ e como já foi mencionado as caspases são aspartato específicas (GILIO *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2013; MININA *et al.*, 2020). As estruturas tridimensionais das metacaspases TbMCA2 de *Trypanosoma brucei* e da YCA1 de *Saccharomyces cerevisiae* foram elucidadas (MCLUSKEY *et al.*, 2012; WONG; YAN; SHI, 2012) e ambas as estruturas apresentam características similares as das caspases, porém ambas proteases são ativas em suas formas monoméricas sugerindo que TbMCA2 e YCA1 provêm de um mesmo ancestral. O estudo cristalográfico da estrutura da TbMCA2 revelou que ela apresenta uma porção N-terminal que forma um “loop” que pode estar envolvida no acesso do substrato ao centro ativo e que a movimentação deste “loop” é dependente da ligação de íons cálcio que, portanto, é responsável por regular a entrada do substrato no sítio ativo estabelecendo um efeito estereo na seleção de substratos por tamanho. Neste trabalho realizamos mutações sítio dirigidas para avaliarmos resíduos de aminoácidos chaves para a atividade enzimática desta enzima, como o resíduo Asp¹⁷⁰ que constitui o sub-sítio S₁ e a Cys²⁹² que é a cisteína catalítica da CaMCA-Ia.

OBJETIVO

Obter a metacaspase CaMCA com mutações sítio-dirigidas nos resíduos Asp¹⁷⁰ e Cys²⁹².



METODOLOGIA

Clonagem e obtenção dos mutantes CaMCA D170A e C292A

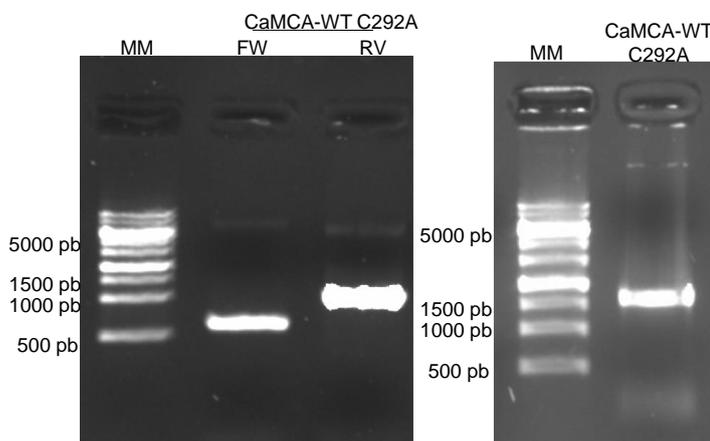
Utilizamos o clone da CaMCA em pET28(a) obtida anteriormente pelo grupo como molde para amplificação. Os oligonucleotídeos foram construídos de modo a se obter as mutações dos aminoácidos desejados, sendo que para cada mutação foram feitos oligos complementares *sense* (5'-3') e *anti-sense* (3'- 5'), ambos contendo o novo códon para o aminoácido desejado. A amplificação do gene contendo a mutação foi realizada via reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se o clone da CaMCA em pET28(a) e 50 pmol de cada *primer* da mutação (*forward* e *reverse*), a reação foi realizada utilizando a Pfu DNA Polimerase, seguindo as orientações do fabricante. A reação ocorreu em um termociclador T100 *Thermal Cycler* (Bio-Rad) nas seguintes condições: (1) 1 ciclo a 94° C por 10 minutos, (2) repetições de 20 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 94° C por 90 segundos, 67° C por 45 segundos e 72° C por 8 minutos, e (3) 1 ciclo extra de 10 minutos a 72° C. O produto da amplificação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose preparado a 1% (m/v) contendo 0,75 µg/mL de brometo de etídio em tampão TAE (TRIS 80 mM; Ácido Acético glacial 40 mM; EDTA 2,5 mM, em pH 8,3) Para referência utilizamos o marcador molecular "1 kb DNA *Ladder*". Em seguida foi submetido a uma tensão de 80 V durante 30 minutos em cuba horizontal. Após migração, o gel foi analisado sob luz UV no fotodocumentador *ChemiDoc™ MP Imaging System* (Bio-Rad). Confirmada amplificação realizamos a digestão do produto da amplificação com 1 µL da enzima DpnI e 2 µL do tampão tango (5X). A reação foi incubada durante 3 horas a 37° C, seguido de 20 minutos a 65° C para que ocorresse a inativação da enzima. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente revelada em um fotodocumentador *ChemiDoc™ MP Imaging System* (Bio-Rad). Para a transformação, 10 µL do produto da digestão foi misturado suavemente com a *E. coli* DH5α quimicamente competente. A mistura foi incubada em gelo durante 30 minutos, seguido por choque térmico durante 90 segundos a 42°C e 2 minutos no gelo, em seguida acrescentou-se 800 µL de meio Luria Broth (LB). A suspensão foi incubada a 37° C em agitação constante de 180 rpm durante 1h e 30 minutos. Após o tempo de incubação, o material foi centrifugado, descartou-se 700 µL do sobrenadante e o *pallet* formado foi ressuspenso nos 100 µL restantes. Plaqueamos 100 µL da mistura em meio LB ágar contendo 50 µg/mL de Canamicina. As placas foram incubadas a 37°C, durante 18 horas. Colônias foram selecionadas aleatoriamente para a realização de uma PCR utilizando os *primers* de reconhecimento do promotor e do terminador T7. As colônias foram diluídas em 20 µL de água deionizada autoclavada e para a reação de PCR utilizamos 1 µL da diluição, 10 pmol de cada *primer* T7 (*forward* e *reverse*) T7 e a Pfu DNA Polimerase seguindo as orientações do fabricante. As condições da amplificação compreenderam: (1) 1 ciclo a 94° C por 10 minutos, (2) repetições de 35 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 94° C por 15 segundos, 47° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto, e (3) 1 ciclo extra de 10 minutos a 72° C. Os produtos da foram visualizados após eletroforese em gel agarose 1% (m/v) sob luz ultravioleta, conforme já descrito anteriormente. Após a confirmação dos clones positivos, os plasmídeos obtidos nas cepas de *E.coli* DH5α contendo o inserto de interesse foram extraídos por lise alcalina utilizando o kit *Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification Systems* (Promega).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baseando-se na sequência fornecida pelo GeneBank, os primers contendo as mutações na Cys²⁹² e Asp¹⁷⁰ foram desenhados. Para a amplificação foi realizada duas etapas de PCR utilizando a Pfu DNA Polymerase 2,5 U/μL (Transgene) e o DNA molde da CaMCA (previamente produzida pelo grupo). O produto da amplificação foi submetido a uma separação por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). O resultado pode ser observado na figura 1.

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação das etapas I e II da região codificadora da do mutante CaMCA C292A.



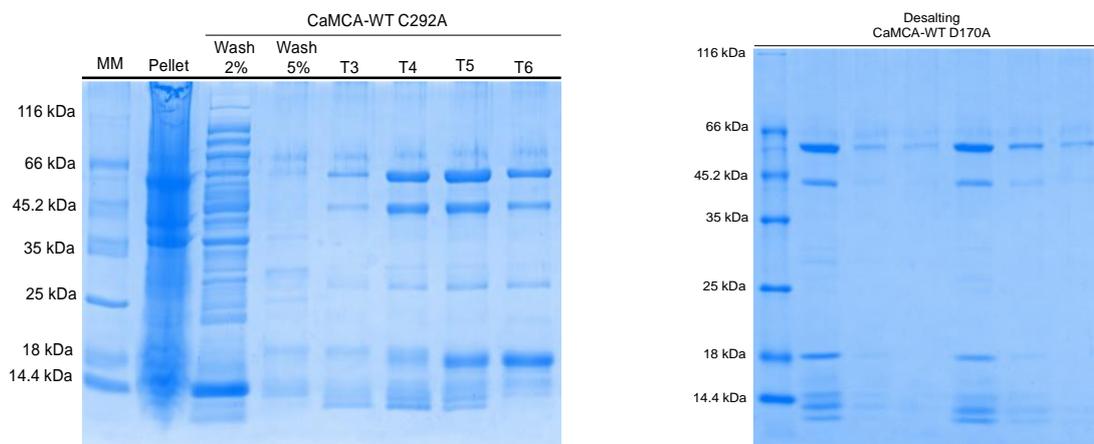
Legenda: (A) Etapa I onde, MM (marcador molecular 1 kb ladder); FW (amplificação com primer foward da mutação) e RV (amplificação com primer reverse da mutação); (B) Etapa II onde, MM (marcador molecular 1 kb ladder) e CaMCA C292A (amplificação com gene contendo a mutação CaMCA C292A).

O produto obtido na reação II e o plasmídeo pET28(a) foram digeridos com as enzimas de restrição NheI e EcoRI, as quais possuem seus devidos sítios de restrição inseridos nos *primers* FW e RV usados na reação de amplificação. Os produtos oriundos da digestão foram purificados com o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e foram submetidos a reação de ligação catalisada pela enzima T4 DNA Ligase. A reação de ligação foi transformada através de choque térmico em bactéria competente *E. coli* DH5α e crescidas em placa de petri contendo meio nutricional LB Broth com antibiótico canamicina a 37°C *overnight*. Com o crescimento de bactérias, foram selecionadas colônias de forma aleatória, então realizou-se um PCR de colônia para confirmação dos clones positivos. Os produtos do PCR foram confirmados por eletroforese de agarose 1%. Os plasmídeos obtidos foram extraídos por lise alcalina usando o kit *Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification Systems* (Promega). Para amplificação do mutante D170A foi realizado um PCR utilizando a Pfu polymerase 2,5 U/μL (Transgene) e o DNA moldada CaMCA (previamente produzida pelo grupo). O produto dessa amplificação foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). O produto dessa amplificação foi de aproximadamente 6729 pb, o resultado pode ser observado na figura 6. Confirmada a amplificação, foi feita uma digestão com a enzima de restrição Dnp I (10 U/V), que também foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose e o resultado está na figura 4. Foi então realizada uma transformação por choque térmico em bactéria competente *E. coli* DH5α e crescidas em placa de petri contendo meio nutricional LB



Broth com antibiótico kanamicina a 37°C overnight. Foram selecionadas colônias de forma aleatória, então realizou-se um PCR de colônia para confirmação, os produtos do PCR foram confirmados por eletroforese de agarose 1%. Os plasmídeos obtidos foram extraídos por lise alcalina usando o kit *Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification Systems* (Promega). As amostras amplificadas e purificadas serão enviadas a empresa Ludwig Biotecnologia (Brasil) para ser realizado o sequenciamento. Os dados obtidos no sequenciamento foram alinhados com a sequência de nucleotídeos do gene sintético através do site Clustal-O (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Os CaMCA C292A e D170A foram expressos em *E. coli* BL21(DE3)plysS. Assim, partimos para a lise celular e posteriormente para a purificação por cromatografia de afinidade em resina *HisTrap Ni²⁺NTA* e posteriormente realizamos cromatografia líquida de exclusão molecular em coluna de gel-filtração *HiPrep Desalting* (*GE Healthcare*) o sal imidazol foi retirado da proteína pura. O material eluído após a *desalting* foram avaliados através de um *SDS-PAGE* com malha de 15% de poliacrilamida, para verificarmos o sucesso da purificação. O *SDS-Page* (Figura 3) demonstrou que os mutantes CaMCA C292A e D170A foram purificados com sucesso

Figura 3: SDS-PAGE 15% das purificações dos mutantes CaMCA C292A e D170A.



Em suma, conseguimos realizar as mutações sítio-dirigidas da CaMCA C292A e D170A. Com esses mutantes em mãos os próximos passos serão realizar ensaios bioquímicos com a enzima selvagem e os respectivos mutantes para avaliarmos a importância destes resíduos na relação estrutura-função da metacaspase de *Candida albicans*.

REFERÊNCIAS

GILIO, J. M. *et al.* Processing of metacaspase 2 from *Trypanosoma brucei* (TbMCA2) broadens its substrate specificity. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1865, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.01.002>

MACHADO, Maurício F. M. *et al.* Substrate specificity and the effect of calcium on *Trypanosoma brucei* metacaspase 2. **FEBS Journal**, [S. l.], 2013. Disponível em:



<https://doi.org/10.1111/febs.12248>

MCLUSKEY, Karen *et al.* Crystal structure of a Trypanosoma brucei metacaspase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1200885109>

MININA, Elena A. *et al.* **Classification and Nomenclature of Metacaspases and Paracaspases: No More Confusion with Caspases**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.020>

TSIATSIANI, L. *et al.* **Metacaspases**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.66>

UREN, Anthony G. *et al.* Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. **Molecular Cell**, [S. l.], 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00094-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00094-0)

WONG, Ada Hang Heng; YAN, Chuangye; SHI, Yigong. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381806>