



## OBTENÇÃO DA METACASPASE CaMCA DE *Candida albicans* CONTENDO MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS DOS ASPARTATOS DO SÍTIO DE INTERAÇÃO COM O CÁLCIO

Vitória Caroline Domingues Rios<sup>1</sup>; Mariana N.R. Trujillo<sup>2</sup>; Laura A.M. Dalzoto<sup>3</sup>; Taiz Reis<sup>4</sup>; Marcelo F. Marcondes<sup>5</sup>; Maurício F.M. Machado<sup>6</sup>

- 1- Estudante de Farmácia; e-mail: [vitoriarios@gmail.com](mailto:vitoriarios@gmail.com);
- 2- Doutoranda em Biotecnologia na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: [marianatrujilho@hotmail.com](mailto:marianatrujilho@hotmail.com);
- 3- Mestranda em Biotecnologia na Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: [lauradalzoto@gmail.com](mailto:lauradalzoto@gmail.com);
- 4- Doutoranda em Biotecnologia na Universidade de Mogi das Cruzes ; e-mail: [taiz\\_reis18@hotmail.com](mailto:taiz_reis18@hotmail.com);
- 5- Professor da Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Biofísica; e-mail: [marcelo.marcondes@unifesp.br](mailto:marcelo.marcondes@unifesp.br);
- 6- Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: [mauriciomachado@umc.br](mailto:mauriciomachado@umc.br).

**Área de conhecimento:** Biologia molecular.

**Palavras-Chaves:** Clonagem, metacaspase, mutação, expressão proteica.

### INTRODUÇÃO

As metacaspases 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). São enzimas 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 P<sub>1</sub> (GILIO *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2013; MININA *et al.*, 2020). A metacaspases são enzimas dependentes de cálcio sendo essencial tanto para o seu autoprocessamento quanto para sua atividade proteolítica (GILIO *et al.* 2017). Ao realizarmos o alinhamento das sequências primárias da YCA1 (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q08601>) que foi realizado para a resolução da sua estrutura cristalográfica (WONG; YAN; SHI, 2012) com a sequência primária da CaMCA (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q5ANA8>) observamos que os resíduos chaves para a YCA1 (WONG; YAN; SHI, 2012) estão presentes e conservados na estrutura primária da CaMCA sendo 4 resíduos de Asp referentes ao sítio de interação com o Ca<sup>2+</sup>, a His e a Cys catalíticas, 2 resíduos de Asp e um resíduo de Ser que compõe o sub-sítio S<sub>1</sub> e um resíduo de Lys (posição 334 na YCA1) que é o local de reconhecimento para seu autoprocessamento na porção N-terminal. Neste trabalho realizamos mutações sítio dirigidas onde avaliamos os resíduos de aminoácidos chaves para a atividade enzimática desta enzima, como os resíduos que constituem o sítio de cálcio da CaMCA, bem como, avaliamos a sua importância para a regulação da atividade proteolítica desta enzima.

## OBJETIVOS

Obter a metacaspase CaMCA com mutações sítio-dirigidas nos resíduos de aspartato que constituem o sítio de cálcio dessa enzima, são eles Asp<sup>252</sup>, Asp<sup>299</sup>, Asp<sup>268</sup>, Asp<sup>269</sup> e Asp<sup>268/269</sup>.

## METODOLOGIA

### ***Produção dos mutantes do sítio de Ca<sup>2+</sup> da CaMCA***

A reação se baseia em duas etapas: na ETAPA I realizamos a amplificação com o primer forward para mutação e o primer reverse do terminador T7 que teve como objetivo amplificar a região 5'-3' até o local da mutação e em outro tubo utilizamos o primer reverse para mutação e o primer forward do promotor T7 com o objetivo amplificar a região 3'-5' até o local da mutação. 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. A seguir, os produtos das PCRs foram então purificados utilizando-se o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) de acordo com as instruções do fabricante e quantificado por espectrofotometria (NanoDrop - Invitrogen). Após realizamos a ETAPA II da amplificação, utilizando um mix na proporção de 1:1 dos produtos da PCR obtida da ETAPA I como molde para a amplificação do gene íntegro. Foi realizado uma nova PCR usando os primer do terminador e promotor T7, realizamos a PCR nas mesmas condições da ETAPA I, porém com temperatura de anelamento de 47° 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) que foi revelado sob luz UV no fotodocumentador *ChemiDoc™ MP Imaging System* (Bio-Rad).

### ***Clonagem com a T5 exonuclease-dependent assembly (TEDA)***

As amplificações do pET28(a) e do gene da CaMCA mutado para a realização da T5 exonuclease-dependent assembly (TEDA) foram realizadas usando primers específicos baseando-se na metodologia TEDA, nas mesmas condições para a amplificação do gene mutado. Com a amplificação do pET28(a) e as mutações, foi realizado o procedimento TEDA, no qual usamos uma proporção de 1:4 (vetor/inserto). Nessa reação foi utilizado 100 ng do vetor, 24,99 ng do inserto, 4 µL da solução 2X TEDA contendo T5 exonuclease e então foi homogeneizada e incubada a 30°C durante 4 minutos e depois incubada no gelo por 10 minutos. Essa reação foi então transformada em *E.coli* DH5a em gelo durante 30 minutos, seguido por choque térmico durante 90 segundos a 42°C e 2 minutos no gelo, plaqueamos 100 µL da mistura em meio LB ágar contendo 50 µg/mL de Canamicina que 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. Os

produtos da PCR de colônia foram visualizados em 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* DH5 $\alpha$  contendo o inserto de interesse foram extraídos por lise alcalina utilizando o kit *Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification Systems* (Promega) e transformados por choque térmico em *E.coli* BL21 (DE3) pLysS.

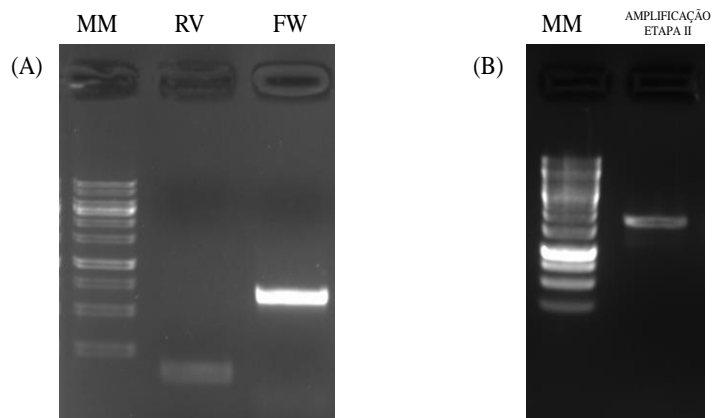
### **Expressão e purificação da CaMCA selvagem e mutantes**

A expressão foi realizada em 1 L de caldo LB (Luria Bertani) e foi induzida com 0,25 M de IPTG, e a reação foi incubada durante aproximadamente 18h. As células foram centrifugadas, lisadas com tampão de lise [TRIS 50 mM, NaCl 50 mM, glicerol 5% (v/v) - pH 8,0] e incubadas com 1 mg/mL de lisozima (Sigma) durante 16 horas a 4°C. Em seguida o material foi submetido a lise mecânica através de sonicação (4 ciclos de 30 segundos a 60 Hz). Posteriormente adicionou-se 1 M de MgCl<sub>2</sub> e 1 mg/mL de DNase. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade, onde o sobrenadante obtido durante a lise foi injetado em uma coluna HisTrap Ni-Sepharose (Cytivia) no aparelho AKTA Start (Cytivia), a coluna foi previamente equilibrada com tampão de partida (TRIS 20 mM, NaCl 300mM, imidazol 20 mM). A eluição da enzima foi realizada usando gradiente crescente de imidazol, nas concentrações de 50 mM, 300 mM e 500 mM do tampão de eluição. O grau de pureza da enzima foi monitorado por eletroforese em gel de poliácridamida 15%. Após a cromatografia de afinidade foi realizada uma cromatografia de gel filtração, conhecida também como cromatografia de exclusão molecular para a remoção do sal imidazol.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Utilizando primers específicos e usando a metodologia TEDA, a amplificação do pET28(a) foi realizada. Para as mutações, foi realizada duas etapas de PCR utilizando a Pfu DNA Polymerase 2,5 U/mL (Transgene) e o DNA molde da CaMCA. O produto da amplificação foi submetido a uma separação por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) (Figura 1). O resultado pode ser observado na figura 1. É possível observar que o PCR I gerou um produto de aproximadamente 876 pb e 471 pb. No PCR II, os produtos das PCRs da reação I foram utilizados como template para a amplificação final, onde observamos no gel uma única banda em torno de ~1647pb, que consiste no gene da CaMCA adicionada as regiões promotora e terminadora T7 (Figura 1).

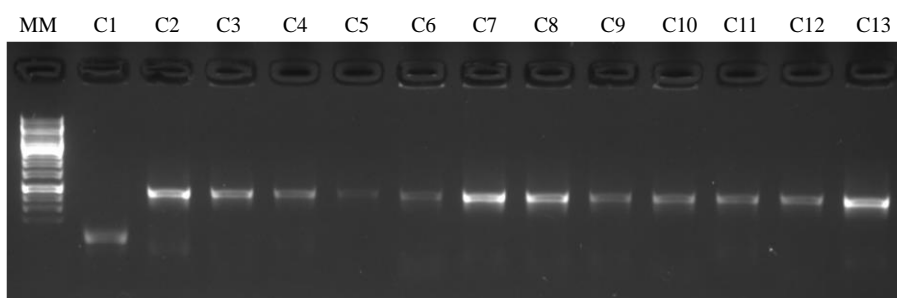
**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto do PCR I e II.



**Legenda:** (A) PCR I onde, MM (marcador molecular 1 kb ladder); FW (amplificação com *primer forward* da mutação) e RV (amplificação com *primer reverse* da mutação); (B) PCR II onde, MM (marcador molecular 1kb ladder) e amplificação contendo a mutação desejada.

Seguindo o procedimento TEDA, foi usada a proporção 1:4 (vetor/inserto) para a reação. Após o crescimento bactérias, foram selecionadas colônias de forma aleatória, e então realizamos uma PCR de colônia para confirmação dos clones positivos. Os produtos do PCR foram confirmados por eletroforese de agarose 1% (figura 2). Os plasmídeos obtidos foram extraídos por lise alcalina usando o kit *Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification Systems* (Promega).

**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 1% do PCR de colônia.

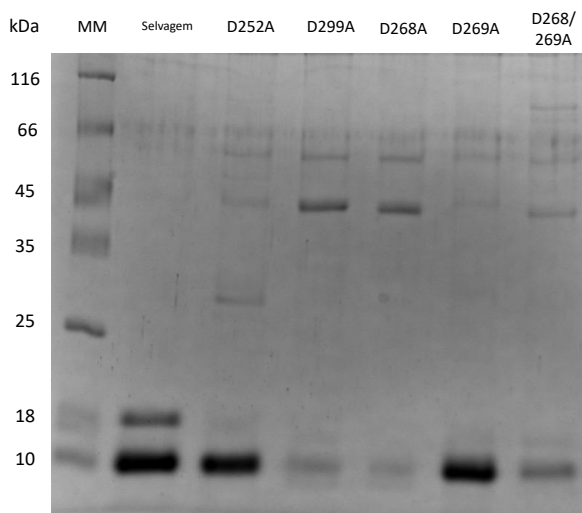


**Legenda:** MM (marcador molecular 1kb ladder); C1 (colônia 1); C2 (colônia 2); C3 (colônia 3); C4 (colônia 4); C5 (colônia 5); C6 (colônia 6); C7 (colônia 7); C8 (colônia 8); C9 (colônia 9); C10 (colônia 10); C11 (colônia 11); C12 (colônia 12); C13 (colônia 13).

As amostras amplificadas e purificadas foram 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/>).

A expressão da CaMCA selvagem dos mutantes CaMCA D252A, D268A, D269A, D299A e D268/269A, foi realizada através de indução com 0,25 mM de IPTG e o matéria foi purificado no aparelho AKTA Start por cromatografia de afinidade com coluna de Ni-sepharose seguido de uma dessalinização com coluna HiTrap™ 26/10 Desalting de 5 ml (Cytivia). A análise da purificação foi feita em gel de SDS-PAGE 15% onde avaliamos o efeito das mutações sobre o autoprocessamento, uma vez que já foi demonstrado na estrutura cristalográfica das metacaspases TbMCA2 e YCA1, que os resíduos correspondentes aos mutados são essenciais para a interação com o cálcio e que sem eles o autoprocessamento não ocorre (MCLUSKEY *et al.*, 2012; WONG; YAN; SHI, 2012). Interessantemente em ambas as enzimas os dois principais resíduos de interação com o cálcio correspondem à Asp<sup>268</sup> e Asp<sup>269</sup> da CaMCA, nosso resultado apresentado na figura 3, demonstra que o resíduo Asp<sup>268</sup> é essencial para a interação do Ca<sup>2+</sup> com a CaMCA, porém no lugar do Asp<sup>269</sup> nossos dados demonstram que o Asp<sup>299</sup> é o segundo resíduo de interação com este íon. O resultado observado com o duplo mutante CaMCA D268/269A corrobora com a observação descrita anteriormente, uma vez que o efeito observado foi igual ao apresentado pelo mutante CaMCA D268A e CaMCA D299A.

**Figura 3.** Eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% dos mutantes do sítio de Ca<sup>2+</sup> da CaMCA.



### CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstra que os quatro resíduos de aspartato conservados na CaMCA comparado a TbMCA2 e a YCA1 (MCLUSKEY *et al.*, 2012; WONG; YAN; SHI, 2012), são realmente os resíduos de interação com o cálcio, como observado na figura 3 a deleção dos aspartatos propostos inibiram o processo de autoprocessamento, concomitantemente o processo de autodegradação, porém como citado anteriormente os resíduos Asp<sup>268</sup> e Asp<sup>299</sup>

são os mais afetados pela mutação. O que nos leva como perspectiva futura realizarmos o duplo mutante D268/299A e o mutante de todos os Aspartatos (CaMCA Asp<sup>full</sup>).

## 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.

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

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.

MININA, Elena A. *et al.* Classification and Nomenclature of Metacaspases and Paracaspases: No More Confusion with Caspases. [S. l.: s. n.], 2020.

TSIATSIANI, L. *et al.* Metacaspases. [S. l.: s. n.], 2011.

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.

WONG, Ada Hang Heng; YAN, Chuangye; SHI, Yigong. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. *Journal of Biological Chemistry*, [s. l.], 2012.