


## Mutações sítio-dirigidas na metacaspase de *S. cerevisiae*: Uma abordagem, metodológica avançada para estudos estruturais e funcionais

Site-directed mutations in *S. cerevisiae* metacaspase: An advanced methodological approach for structural and functional studies

Mutaciones dirigidas en el sitio de la metacaspase de *S. cerevisiae*: Un enfoque metodológico avanzado para estudios estructurales y funcionales.

Mariana Nascimento Romero Trujillo<sup>1</sup>  

Laura de Azevedo Maffei Dalzoto<sup>1</sup>  

Taiz dos Reis Santos<sup>1</sup>  

Laura Helena Araújo<sup>1</sup>  

João Pedro Martins Silva Costa<sup>1</sup>  

Ane Caroline Moreira Duarte<sup>2</sup>  

Tatiane Faustino de Moraes<sup>1</sup>  

Wagner Alves de Souza Judice<sup>1</sup>  

Marcelo Ferreira Marcondes Machado<sup>3</sup>  

Maurício Ferreira Marcondes Machado<sup>1,2</sup>  

**Tipo de Publicação:** Artigo Completo

**Área do Conhecimento:** Área Biológicas

<sup>1</sup> Laboratório de Morte em Unicelulares (LabMUn), Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB), Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Núcleo de Pesquisas Tecnológicas (NPT), Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

---

## RESUMO

**Objetivo:** As metacaspases são cisteína-proteases que requerem cálcio para atividade e se ativam por autoprocessamento, diferentemente das caspases. As metacaspases são categorizadas em tipos I, II e III, como a ScMCA-IA em *Saccharomyces cerevisiae*, associada à apoptose. O estudo buscou clonar um ScMCA-IA recombinante, com mutações específicas nos resíduos Cys<sup>155</sup> e Cys<sup>276</sup>, expressando e purificando essas proteínas. Os mutantes foram obtidos com sucesso usando sobreposição de fragmentos e método TEDA de clonagem, expressos em *E. coli* e purificados por cromatografia de camada e exclusão molecular. A identificação da importância da cisteína Cys<sup>155</sup> no autoprocessamento da ScMCA-IA e a sugestão de um segundo processamento intermolecular entre metacaspases ativas, semelhante à ativação das caspases, foram resultados notáveis. Mostrou-se que os processamentos levam à forma ativa da enzima no C-terminal, diferente do descrito anteriormente. Concluindo, a presença de uma segunda cisteína catalítica na ScMCA-IA foi evidenciada, trazendo uma nova perspectiva sobre sua ativação, com processamentos antes não descritos, tanto autoprocessamento quanto intermolecular.

**Palavras-chave:** Metacaspase, *Saccharomyces cerevisiae*, Mutação, Cisteína

---

## ABSTRACT

**Objective:** Metacaspases are cysteine proteases that require calcium for activity and are activated through autoprocessing, unlike caspases. Metacaspases are categorized into types I, II, and III, such as SCMCA-IA in *Saccharomyces cerevisiae*, associated with apoptosis. The study aimed to clone a recombinant SCMCA-IA, with specific mutations in residues Cys<sup>155</sup> and Cys<sup>276</sup>, expressing and purifying these proteins. Mutants were successfully obtained using fragment overlap and the TEDA cloning method, expressed in *E. coli*, and purified through layer chromatography and molecular exclusion. The identification of the significance of cysteine Cys<sup>155</sup> in SCMCA-IA autoprocessing and the suggestion of a second intermolecular processing between active metacaspases, akin to caspase activation, were significant findings. It was shown that the processing led to the enzyme's active form in the C-terminal, contrary to previous descriptions. In conclusion, the presence of a second catalytic cysteine in SCMCA-IA was demonstrated, presenting a new perspective on its activation, involving previously undescribed processes—both autoprocessing and intermolecular processing.

**Key words:** Metacaspase, *Saccharomyces cerevisiae*, Mutation, Cysteine

---

## RESUMEN

**Objetivo:** Las metacaspasas son cisteína-proteasas que requieren calcio para su actividad y se activan a través del auto procesamiento, a diferencia de las caspasas. Las metacaspasas se clasifican en tipos I, II y III, como la SCMCA-IA en *Saccharomyces cerevisiae*, asociada a la apoptosis. El estudio tuvo como objetivo clonar una SCMCA-IA recombinante, con mutaciones específicas en los residuos Cys<sup>155</sup> y Cys<sup>276</sup>, expresando y purificando estas proteínas. Los mutantes se obtuvieron con éxito mediante la superposición de fragmentos y el método de clonación TEDA, expresados en *E. coli* y purificados mediante cromatografía en capa y exclusión molecular. La identificación de la importancia de la cisteína Cys<sup>155</sup> en el autoprocesamiento de la SCMCA-IA y la sugerencia de un segundo procesamiento intermolecular entre metacaspasas activas, similar a la activación de las caspasas, fueron hallazgos significativos. Se demostró que los procesos conducen a la forma activa de la enzima en el extremo C-terminal, en contraste con lo descrito anteriormente. En conclusión, se evidenció la presencia de una segunda cisteína catalítica en la SCMCA-IA, aportando una nueva perspectiva sobre su activación, con procesos antes no descritos, tanto autoprocesamiento como intermolecular.

---

**Palabras clave:** Metacaspase, *Saccharomyces cerevisiae*, Mutación, Cisteína

---

## 1. INTRODUÇÃO

Uma cisteíno-protease com similaridade estrutural às caspases de mamíferos foi identificada em células eucariotas simples por Uren et al. (2000) utilizando-se de ferramentas de bioinformática. A metacaspase, como passou a ser chamada, foi então identificada em plantas, fungos e protozoários, mas notou-se sua ausência em mamíferos <sup>1</sup>.

As caspases são sintetizadas como zimogênios e possuem uma díade catalítica His/Cys (H e C), assim como as metacaspases. São compostas por um pró-domínio que antecede as duas subunidades p20 (grande) e p10 (pequena), e tornam-se enzimaticamente ativas após sofrerem uma clivagem proteolítica após dois resíduos de ácido aspártico (D). Após essa clivagem, ocorre a dimerização das duas subunidades tanto p20 quanto p10, resultando na chamada caspase efetora <sup>1-3</sup>.

As metacaspases, diferentemente das caspases, podem ter a presença ou não de um pró-domínio rico em prolina e/ou de uma região rica em glutaminas e asparaginas, não sendo necessário passar pelo processo de dimerização para estarem ativas, pois são ativas na forma monomérica, entretanto carecem da presença do íon cálcio, que possui papel de cofator, para o desempenho de sua atividade <sup>2,3</sup>. Diferente das caspases que clivam substratos após um resíduo de ácido aspártico, as metacaspases clivam seus substratos após resíduos básicos de arginina ou lisina na posição P<sub>1</sub> <sup>4,5</sup>.

A metacaspase do tipo I contém um pró-domínio N-terminal rico em prolina e motivo dedo de zinco. A metacaspase tipo II não possui pró-domínio, porém, possui um domínio vinculador com vários resíduos de aminoácidos que separam a subunidade p20 catalítica e p10 reguladora. Já a metacaspase tipo III sofre um rearranjo diferente, a subunidade p10 antecede a subunidade p20 encontrando-se localizada no N-terminal <sup>3,6,7</sup>.

O estresse celular leva a liberação de sinais de morte que induzem a ativação da metacaspase e resulta em um autoprocessamento <sup>8</sup>. Esse autoprocessamento ocorre após a interação do cálcio com a metacaspase, porém, esse não é um pré-requisito para sua atividade enzimática <sup>9</sup>. Apesar de não ser um fator determinante para a atividade da metacaspase, o seu autoprocessamento está diretamente relacionado com o aumento da sua atividade catalítica, influenciada pelos níveis de cálcio <sup>5</sup>. Em estudos utilizando a metacaspase tipo 2 de *Trypanosoma brucei*, verificou-se que a etapa de autoprocessamento é essencial para a realocação do N-terminal a fim de expor os resíduos do sítio catalítico e permitir assim a ação da enzima sobre substratos proteicos grandes e não apenas em oligopeptídeos <sup>10</sup>.

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura que codifica uma única metacaspase, denominada como Yeast Caspase 1 (ScMCA-IA) <sup>11</sup>. A SCMCA-IA é uma metacaspase do tipo I e diversos estudos demonstram que sua expressão está relacionada diretamente a morte celular (apoptose) induzida por estresse oxidativo e senescência celular, regulação do ciclo celular e a eliminação de agregados de proteínas na levedura *S. cerevisiae* <sup>8,11,12</sup>. Foi demonstrado que a ScMCA-IA regula ativamente o ciclo celular da levedura, atuando precisamente na transição da fase G1 para a fase S e, quando é inibida a atividade da

enzima ou na ausência do gene nota-se uma transição de G1 para S tardia em estudos de comparação entre cepas nocautes ( $\Delta$ ScMCA-1a) e selvagens (BY4741) <sup>13</sup>. Com o intuito de demonstrar o autoprocessamento dessa metacaspase, foram realizados ensaios utilizando a enzima pura na presença do íon  $Ca^{2+}$  e demonstraram que esse processamento ocorre no C-terminal e no N-terminal, sendo que no primeiro é liberado um fragmento menor quando realizado uma análise eletroforética em gel de SDS-PAGE, evidenciando uma banda abaixo de 14 kDa chamado de subunidade pequena, e o segundo liberando um fragmento com banda em torno de 45 kDa chamada de subunidade grande <sup>14</sup>.

Quando comparada a estrutura da SCMCA-1A com a estrutura da metacaspase 2 de *Trypanosoma brucei* (TbMCA2), verifica-se que ambas possuem semelhanças como a presença dos resíduos de ligação do cálcio, a díade catalítica e os resíduos de lisina onde ocorre o autoprocessamento. Entretanto, algumas características únicas podem ser destacadas, como a estrutura do N-terminal na TbMCA2, caracterizado por um N-terminal alongado que circunda toda a proteína, influenciando diretamente no acesso ao seu sítio ativo, diferentemente do que se encontra na ScMCA-1A. Quando sobrepostas as estruturas tridimensionais dessas proteínas, é possível observar que os aminoácidos de ligação ao cálcio, dado por quatro ácidos aspárticos, ocupam posições quase idênticas, o que sugere que a região de ligação do cálcio é conservada entre as metacaspases <sup>5,14,15</sup>.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Mutação Sítio Dirigida

Para amplificação do material foram desenhados primers baseados na sequência completa do gene da metacaspase SCMCA-1A localizada no site UniProt. Wong, Yan & Shi (2012) elucidaram a estrutura cristalográfica da SCMCA-1A e com isso foi possível observar a localização de duas cisteínas catalíticas, assim, foram desenhados primers forward (5'-3') e reverse (3'-5') que induziram a substituição das cisteínas por uma alanina (Tabela 1).

**Tabela 1** – Primers utilizados na amplificação do gene da SCMCA-1A para inserção da mutação pontual (em **negrito** o novo códon para troca do aminoácido e produção da mutação)

Primer	Sequência
C155A Forward	5' AAATCAACTGCGTGGT <b>GCT</b> ATCAATGATGCTC 3'
C155A Reverse	5' GAGCATCATTGAT <b>AGC</b> ACCACGCAGTTGATTT 3'
C276A Forward	5' ACAGCATTGTTTGACTCT <b>GCT</b> CATTGGGTACAGTGTTG 3'
C276A Reverse	5' CAACACTGTACCCGAATG <b>AGC</b> AGAGTCAAACAATGCTGT 3'

Também foram desenhados primers, chamados de primers TEDA, que amplificaram o gene da SCMCA-1A já com a mutação realizada + o plasmídeo Pet28(a). Na Tabela 2 encontra-se a lista dos primers projetados.

**Tabela 2** – *Primers* projetados para amplificação do gene da SCMCA-IA utilizados na reação TEDA

Primer	Sequência
SCMCA-IA <i>Forward</i>	5' CTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGTATCCAGGTAGTGGACGT 3'
SCMCA-IA <i>Reverse</i>	5' GTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGCTACATAATAAATTGCAGATTTAC 3'

Na Tabela 3 é apresentado a sequência dos *primers* utilizados para a amplificação do vetor pET28(a)+.

**Tabela 3** – *Primers* projetados para amplificação do vetor pET28(a)+ utilizados na reação TEDA

Primer	Sequência
pET28 <i>Forward</i>	5' CTCGAGCACCACCACCACCACCACT 3'
pET28 <i>Reverse</i>	5' CATATGGCTGCCGCGCGGCAC 3'

Os *primers* amplificadores da região T7 (Tabela 4) foram projetados para a primeira etapa da reação da PCR da mutação, tanto quanto para as amplificações por PCR para confirmação, como a PCR de colônia.

**Tabela 4** – *Primers* utilizados para amplificação da região T7 (promotora e terminadora) que flanqueia o gene da SCMCA-IA

Primer	Sequência
T7 <i>Forward</i>	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
T7 <i>Reverse</i>	5' TAGTTATTGCTCAGCGGTGG 3'

Para realizarmos as mutações pontuais através dessa amplificação nos baseamos no protocolo de Ho *et al.* (1989) com modificações. A técnica de sobreposição de fragmentos consiste em amplificar o gene em duas etapas, gerando fragmentos que irão ser complementares, usando *primers* flanqueadores do gene (A e D) complementares a sequência alvo, que são os *primers* TEDA, e *primers* internos contendo a mutação desejada (B e C), que são os *primers* da mutação (Tabela 5), separadamente de forma que se hibridizem posteriormente.

Realizamos as reações em tubos distintos, uma para o sentido *forward* e outro para o *reverse*, denominadas como PCR-I *Forward*, na qual utilizou-se o *primer forward* da mutação e o *primer reverse* T7, e PCR-I *Reverse*, na qual utilizou-se o *primer reverse* da mutação e o *primer forward* T7, criando assim os fragmentos AC e DB, respectivamente. A reação foi realizada utilizando PCR Bio (PCR Biosystems), seguindo as orientações do fabricante, e foi realizada em um termociclador T100 *Thermal Cycler* (Bio-Rad) nas seguintes condições: (1) 1 ciclo a 98° C por 1 minuto (desnaturação inicial), (2) repetições de 30 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 98° C por 30 segundos (desnaturação), 55° C por 30 segundos (anelamento) e 72° C por 45 segundos (extensão), e (3) 1 ciclo extra de 10 minutos a 72° C (extensão final).

**Tabela 5** – Descrição dos *primers* usados na primeira etapa para inserção da mutação

<i>Primer</i>	<i>Função</i>	<i>Descrição</i>
C155A <i>Forward</i>	Inserir a mutação	B
C155A <i>Reverse</i>	Inserir a mutação	C
C276A <i>Forward</i>	Inserir a mutação	B
C276A <i>Reverse</i>	Inserir a mutação	C
T7 <i>FW</i>	Flanqueador do gene	A
T7 <i>Reverse</i>	Flanqueador do gene	D

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). 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).

Após a confirmação da amplificação dos fragmentos da primeira etapa, seguimos para a segunda etapa da reação. Para a PCR II foram utilizados 10 ng de cada produto da reação anterior e os *primers* desenhados para a reação do TEDA, usando SCMCA-IA *forward* e SCMCA-IA *reverse*). As extremidades complementares formadas na região de ligação dos *primers*, B e C, se hibridizam (Figura 1) neste segundo PCR para criar o produto final contendo a sequência mutada. As condições da reação foram alteradas para: (1) 1 ciclo a 98° C por 30 segundos (desnaturação inicial), (2) repetições de 35 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 98° C por 10 segundos (desnaturação), 62° C por 15 segundos (anelamento) e 72° C por 30 segundos (extensão), e (3) 1 ciclo extra de 10 minutos a 72° C (extensão final). A análise foi realizada da mesma forma descrita anteriormente.

Para a amplificação do pET28(a)+ foram desenhados *primers* específicos (Tabela 3) para a realização da reação do TEDA, esses *primers* inserem em torno de 15 bases nitrogenadas que formam as extremidades homólogas entre inserto e vetor. A reação foi construída utilizando 60 ng de DNA molde e 25 pmol de cada *primer forward* e *reverse* TEDA. A reação foi catalisada pelo PCR BIO (PCR Biosystems), seguindo as orientações do fabricante. As condições da amplificação compreenderam as seguintes etapas: (1) 1 ciclo a 98° C por 30 segundos (desnaturação inicial), (2) repetições de 35 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 98° C por 20 segundos (desnaturação), 72° C por 2 minutos (anelamento e extensão), e (3) 1 ciclo extra de 10 minutos a 72° C (extensão final). A análise foi realizada da mesma forma descrita anteriormente.

Para a realização do procedimento de montagem de DNA com T5 exonuclease, em inglês T5 exonuclease DNA assembly (TEDA), nos baseamos no trabalho descrito por Xia *et al.* (2019). Este trabalho descreve um método que combina a ação da T5 exonuclease e os mecanismos de reparo da *E. coli*. Trata-se de um método eficiente e de baixo custo que pode ser utilizado para protocolos de clonagem e mutação sítio dirigida. A metodologia baseia-se na montagem de fragmentos de DNA com extremidades homólogas

utilizando exclusivamente a ação da T5 exonuclease capaz de remover as bases nitrogenadas apenas na direção 5´- 3´ (XIA *et al.*, 2019).

A primeira etapa para realização do TEDA, foi a preparação da solução estoque 5X (0,5 M TRIS; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM DTT; PEG 8000 0,25 g/mL<sup>-1</sup>, em pH 7,5 ajustado com HCl). A solução foi armazenada em alíquotas de 1 mL no freezer a -80° C. Para o preparo da solução 5X TEDA + T5 exonuclease, acrescentou-se 10 unidades da T5 exonuclease (ThermoFisher) em uma alíquota de 1 mL e preparamos alíquotas de 100 µL. A reação foi preparada seguindo as orientações descritas por Xia *et al.* (2019) quanto as condições ótimas para a reação TEDA. A proporção da reação foi 1:4 (vetor/inserto). Utilizamos 100 ng do vetor pET28(a)+ linearizado, e para calcularmos a concentração do inserto, utilizamos a Equação 1 (Eq. 1) abaixo.

$$ng\ Inserto = \frac{ng\ Vetor \times pb\ Inserto}{pb\ Vetor} \quad (Eq. 1)$$

O vetor linearizado e os insertos foram obtidos por amplificação via PCR e as extremidades homólogas foram introduzidas na reação usando os *primers* específicos do TEDA. Ambos, vetor e inserto, foram purificados utilizando kit de purificação *Easypure PCR Purification* (Transgen Biotech). O vetor, posteriormente a purificação, foi tratado com a enzima de restrição DpnI, a fim de clivar o material molde, sob condições em termociclador: (1) 37° C por 3h e (2) 80° C por 20 minutos para inativação da enzima.

Para cada reação TEDA foi utilizado 4 µL da solução 5X TEDA + T5 exonuclease, na qual adicionou-se a solução à mistura dos fragmentos do inserto e vetor linearizado e completou a reação com água ultrapura para o volume final de 20 µL, a mistura preparada foi então homogeneizada e incubada a 30° C durante 40 minutos.

Procedemos com o protocolo de transformação através de choque térmico utilizando 7 µL da solução reacional para uma alíquota de 100 µL de células competentes *E. coli* DH5α. As células foram incubadas por 30 minutos em gelo, submetidas a choque térmico a 42° C por 90 segundos e depois transferidos para gelo durante 2 minutos, em seguida acrescentou-se 800 µL de meio LB. A suspensão foi incubada em um agitador a 37 °C durante 60 minutos. Após o tempo de incubação, o material foi centrifugado, descartou-se 700 µL do sobrenadante e o *pellet* formado foi ressuspensionado nos 100 µL restantes. As alíquotas de 100 µL obtidas foram espalhadas em placas de LB contendo canamicina (50 µg/mL). As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As mutações sítio dirigidas realizadas neste trabalho foram baseadas na sequência do gene codificante da metacaspase de *S. cerevisiae* (ScMCA-Ia) quando alinhada a sequência de aminoácidos da TbMCA-IIa de *Trypanosoma brucei* e em resíduos essenciais identificados na estrutura cristalográfica dessa enzima<sup>14,15</sup>.

Como observado para todas as metacaspases, a cisteína catalítica é conservada, compondo o sítio ativo da enzima junto a um resíduo de histidina, sendo a cisteína 276 o resíduo conservado na ScMCA-Ia

(Cys<sup>276</sup>). Foi observado na estrutura da TbMCAIIa que esta enzima apresenta uma segunda cisteína que está ligada ao seu autoprocessamento, identificada como resíduos Cys<sup>92</sup> (2), quando avaliamos as duas sequências dessas metacaspases, observamos que a ScMCA-Ia apresenta uma cisteína conservada na mesma posição a Cys<sup>155</sup>. A partir dessas informações e alinhamentos, identificamos os resíduos de interesse para esse estudo, e projetamos os primers para realizarmos as mutações da segunda cisteína (Cys<sup>155</sup>) e da cisteína catalítica (Cys<sup>276</sup>).

Existem diversas técnicas desenvolvidas ao longo dos anos para a realização das mutações sítio dirigidas empregando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e que foram aprimoradas com o passar dos anos. A primeira estratégia traçada para realizar a mutação neste trabalho foi através da técnica mais conhecida e utilizada, a *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis System* (Stratagene), que consiste em utilizar em uma mesma reação de PCR pares de *primers* complementares contendo a troca do códon para a mutação, a fim de amplificar totalmente o plasmídeo realizando a mutação pontual no gene, entretanto, o uso dessa metodologia foi ineficiente durante os nossos experimentos, uma vez que a amplificação do plasmídeo total não foi eficaz (dados não mostrados). Acredita-se que isso pode ocorrer devido a hibridização dos *primers* que, por serem complementares, pode levar ao alinhamento e formação de “dímeros”, reduzindo o rendimento da reação <sup>16</sup>.

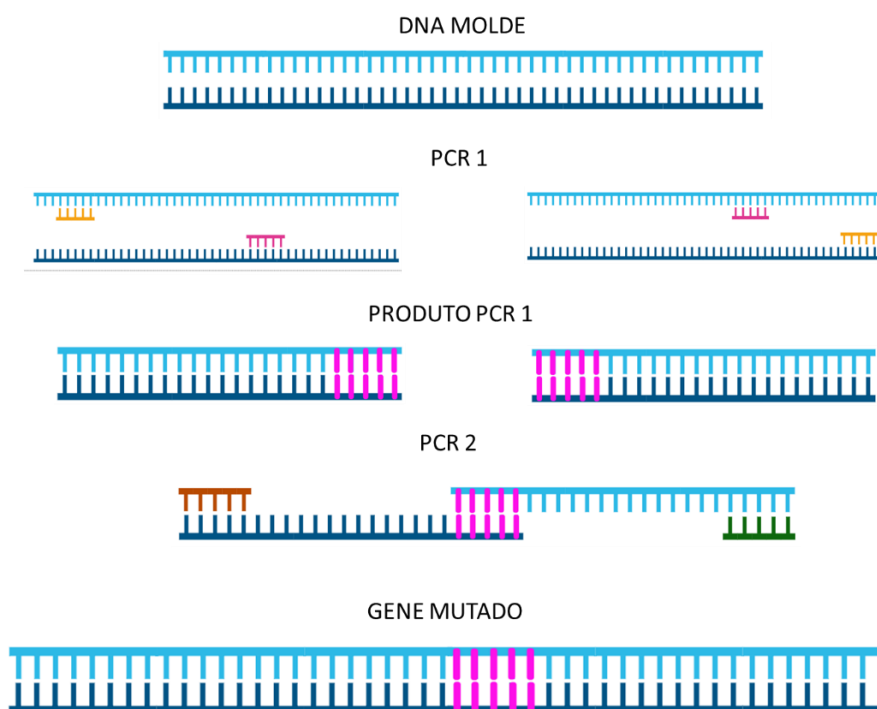
Com o intuito de evitar esse problema, utilizamos uma técnica alternativa para a obtenção dos mutantes da ScMCA-Ia, que consiste na metodologia de sobreposição de fragmentos <sup>17</sup>. A estratégia se baseia na realização de reações de PCR utilizando os *primers forward e reverse* separadamente. Assim, essa metodologia permite que sejam realizadas mutações de inserção, deleção e/ou substituição. O tipo de mutação sítio dirigida escolhida para esse trabalho foi a de substituição, nesse sentido, realizamos a troca de pares de bases que codificam um aminoácido importante na estrutura da proteína por outro, no caso para as mutações foi escolhido a troca por uma alanina. A escolha do aminoácido alanina ocorreu devido a sua estrutura simples e comum em proteínas, além da sua cadeia lateral curta, características que não impõem modificações e perturbações na estrutura secundária e terciária da proteína <sup>18</sup>.

A metodologia de amplificação através da sobreposição de fragmentos é realizada em duas etapas de PCR. Na primeira etapa (PCR I) ocorre a amplificação de fragmentos que serão complementares, entre eles, utilizando *primers* flanqueadores do gene (verde e lilás – Figura 1) e *primers* internos contendo a mutação desejada (amarelo – Figura 1), conforme demonstrado na Figura 1.

Os *primers* internos são responsáveis por realizar a troca do códon original pelo mutado, já que carregam essa alteração na sua sequência. Nessa primeira etapa, os fragmentos gerados desses mutantes são complementares entre si, um fator importante na segunda etapa dessa metodologia.



**Figura 1.** Técnica de sobreposição de fragmentos para a obtenção de proteínas recombinantes com mutação sítio-dirigida.



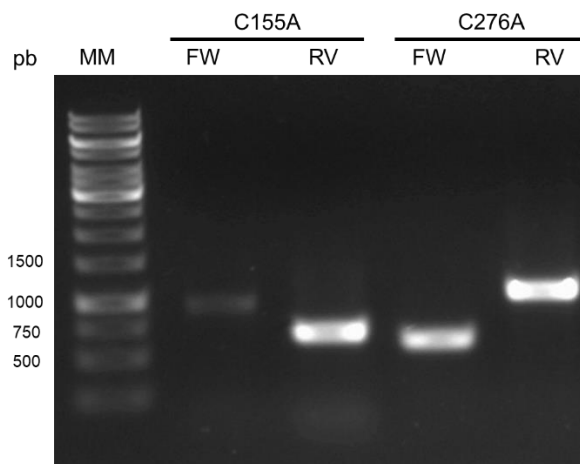
Fonte: Ho *et al.* (1989, p. 54 – com adaptação)

Em azul claro fita 5´-3´ do DNA molde, em azul escuro fita 3´-5´ do DNA molde, em amarelo primers *forward* e *reverse* de clonagem, em rosa primers de mutação. Em laranja e verde primers *forward* e *reverse* de clonagem.

Como visto na Figura 1 as reações são realizadas usando os *primers* separadamente, criando assim dois fragmentos. Para essas reações de PCR, foram utilizados os *primers* da região T7, que flanqueiam o gene no plasmídeo pET28(a)+ (plasmídeo de escolha para clonagem), por esse detalhe somam-se as regiões amplificadas os pares de bases correspondentes a região T7, em torno de aproximadamente 150 pb. Na Figura 2 observamos as amplificações realizadas nessa primeira etapa para a mutação dos resíduos Cys<sup>155</sup> e Cys<sup>276</sup>.

Com os fragmentos gerados na primeira etapa (PCR I), prosseguimos para a segunda etapa de PCR (PCR II). Nessa reação ocorre a sobreposição das regiões complementares amplificadas através dos *primers* da mutação. Para a PCR II utilizamos *primers* específicos para amplificação do gene da ScMCA-Ia. Nas reações, foram usados na mesma proporção os fragmentos obtidos anteriormente no PCR I. Os *primers* foram projetados visando a posterior reação do TEDA, acrescentando uma pequena sequência de pares de base para reconhecimento e clivagem pela T5 exonuclease – uma enzima com função de clivar o DNA no sentido 5´-3´ – e que são complementares as extremidades da amplificação do plasmídeo pET28(a)+ na mesma região.

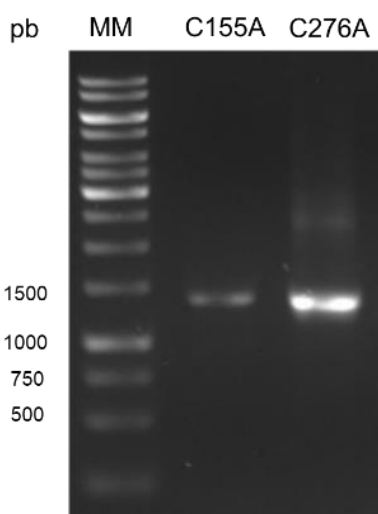
**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação gerado na primeira etapa da reação de sobreposição de fragmentos.



Linhas: (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; Produtos da amplificação da PCR I-FW e PCR I-RV do mutante C155A, apresentando 1001 pb e 659 pb, respectivamente; Produtos da amplificação da PCR I-FW e PCR I-RV do mutante C276A, apresentando 633 pb e 1027 pb, respectivamente.

Como demonstrado na Figura 1, os fragmentos se hibridizam na região da mutação nessa PCR e formam o molde para que os *primers* TEDA amplifiquem o gene contendo a mutação, gerando como produto um único fragmento. A Figura 3 demonstra os fragmentos obtidos na amplificação mutantes da ScMCA-Ia.

**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação da segunda etapa da reação de sobreposição de fragmentos.



Linhas: (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; (A) PCR II dos mutantes íntegros, SCMCA-IA C155A e SCMCA-IA C276A.

Através da análise das bandas obtidas confirmamos que a reação da PCR II ocorreu como esperado. Os fragmentos se hibridizaram e geraram os produtos finais no tamanho de ~1299 pb para os mutantes da ScMCA-Ia.

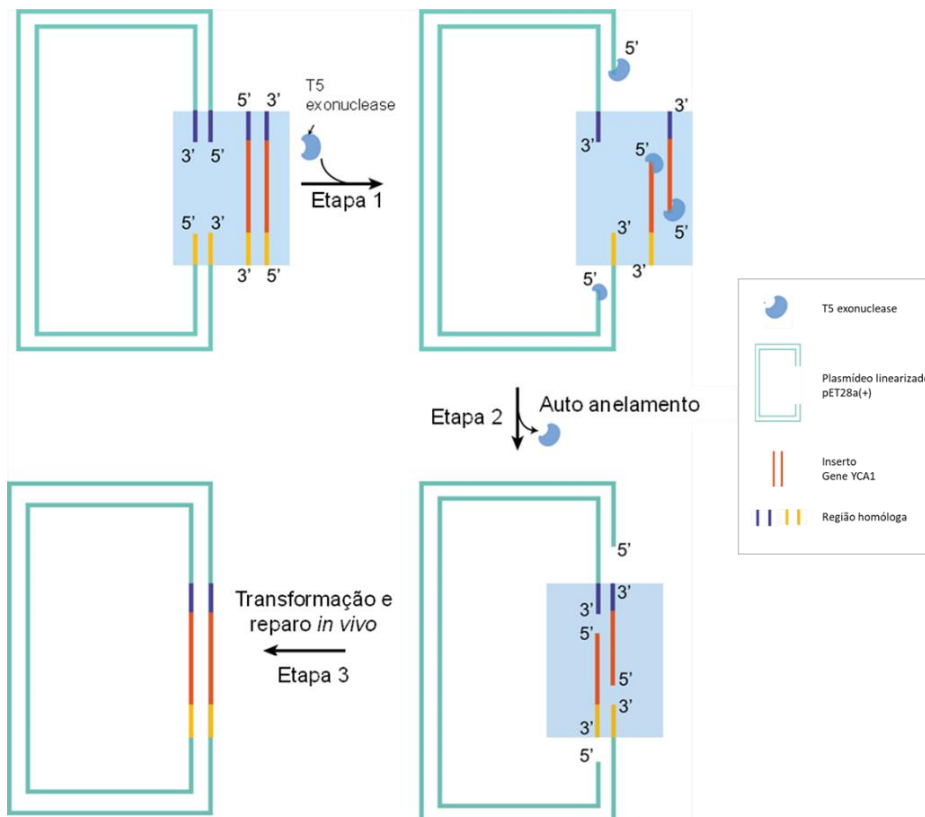
O uso dos *primers* específicos do TEDA na segunda etapa de amplificação foi utilizado baseando-se na montagem do DNA através da reação com a enzima T5 exonuclease. O primeiro método desenvolvido para a realização de clonagens foi através da digestão com enzimas de restrição e posterior ligação dos fragmentos complementares com DNA ligase <sup>19</sup>. Embora ainda seja o método mais utilizado, ao tentarmos aplicar não obtivemos eficiência no desenvolver do trabalho e optamos por seguir com técnicas mais recentes.

Diferentes métodos de clonagem foram desenvolvidos na última década, visando a melhoraria na eficiência e geração de protocolos mais rápidos, simples e econômicos. Métodos foram desenvolvidos aprimorando a técnica mais convencional, que geram fragmentos com extremidades coesivas, e outros foram projetados de modo a obter os produtos com princípios diferentes, como ocorre nas técnicas *in vivo* e *in vitro* que utilizam de sequências homólogas <sup>20</sup>.

As técnicas voltadas à montagem de DNA *in vitro* em geral são métodos fáceis e confiáveis, entretanto com custos altos por conta do uso de várias enzimas, como ocorre no método de Gibson no qual utilizam-se três enzimas; a T5 exonuclease, Phusion DNA polimerase e a Taq DNA ligase <sup>20,21</sup>.

O método T5 exonuclease DNA assembly (TEDA), foi projetado baseando-se na clonagem através de fragmentos de DNA com extremidades homólogas utilizando apenas uma enzima, a T5 exonuclease, que é capaz de clivar o DNA na direção 5'-3'. Assim, a T5 degrada a extremidade 5' e gera fragmentos na extremidade 3', passando de pontas cegas a pontas coesivas, que se hibridizam umas as outras. Portanto, quando o produto dessa incubação é transformado em células hospedeiras, ocorre o reparo *in vivo* das lacunas pela ação das enzimas DNA polimerase e ligase, como demonstrado na Figura 4, onde a polimerase preenche os pares de base nas lacunas entre as fitas complementares e ligase faz a ligação fosfodiéster entre os fragmentos formados <sup>21</sup>.

Figura 4. Método T5 exonuclease DNA assembly (TEDA).

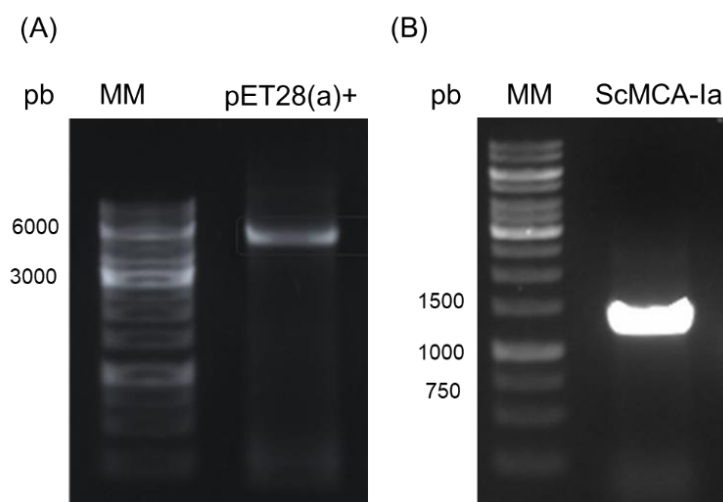


Fonte: Xia *et al.* (2019, p. 2 – com adaptação)

Representação da ação da T5 exonuclease na reação do TEDA. O retângulo de linha dupla com uma lacuna representa um plasmídeo linearizado. As linhas verticais duplas representam o inserto. Linhas com a mesma cor indicam a região homóloga. Na primeira etapa 1: a exonuclease T5 corta as extremidades 5' do plasmídeo linearizado e do inserto para gerar as extremidades complementares. Etapa 2: Os fragmentos se anelam por complementariedade e se ligam uns aos outros. Etapa 3: O DNA é transformado em células *E. coli* DH5α e as lacunas são reparadas *in vivo*.

Para realizar a clonagem através do TEDA é necessário obter o vetor linearizado no qual o gene será inserido, e para nosso trabalho utilizamos o pET28(a)+, que foi amplificado utilizando os *primers* do TEDA. Na Figura 5A observamos o resultado dessa amplificação e por meio do tamanho do fragmento gerado, confirmamos a obtenção do plasmídeo linearizado.

**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação do vetor e da ScMCA-Ia com os primers TEDA.



Linhas: **A:** (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; PCR de amplificação do vetor pET28(a)+ linearizado. **B:** (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; PCR de amplificação da ScMCA-Ia.

O DNA utilizado como molde para a reação de amplificação do vetor é proveniente de *E. coli*, obtido através de extração por lise alcalina, e por esse motivo é metilado. A metilação do DNA é um processo realizado pelas bactérias afim de marcar e proteger seu próprio material genético contra a degradação quando, por exemplo, ocorre a invasão da célula por vírus. Assim, ocorre a distinção do DNA bacteriano comparado com o DNA viral com a marcação de um grupamento metil, portanto o material genético não marcado do vírus é degradado por enzimas de restrição de outras classes<sup>22,23</sup>. Com base nisso, realizamos a etapa de digestão do produto da amplificação com a enzima de restrição DpnI, uma endonuclease utilizada para clivar o DNA metilado, com a finalidade de degradar o material molde utilizado na reação de amplificação e assim evitar que na próxima etapa esse plasmídeo não esteja presente nas nossas bactérias.

Após a digestão com DpnI, prosseguimos com a reação de clonagem, realizando a purificação dos produtos amplificados. Com os produtos da PCRII realizamos a amplificação do gene da ScMCA-Ia contendo as mutações pontuais, usando os *primers* TEDA, ScMCA-Ia *forward* e ScMCA-Ia *reverse*. Confirmamos a amplificação em gel de agarose (Figura 5 B). Como resultado, obtivemos bandas representando ScMCA-Ia com aproximadamente 1299 pb.

As amostras obtidas após purificação foram quantificadas em nanodrop. Os valores obtidos foram utilizados no cálculo de proporção para a reação do TEDA, que foram preparadas na proporção 1:4 de vetor/inserto. Prosseguimos com a incubação e após submetemos o produto a etapa de transformação através de choque térmico em cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$ , a escolha dessa cepa foi baseada na sua capacidade em estabilizar e amplificar o DNA inserido<sup>24</sup>.

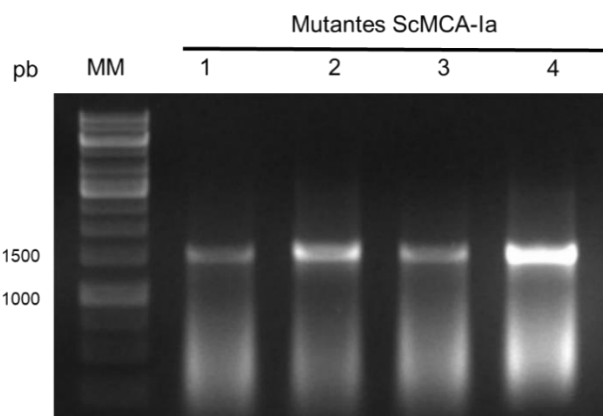
Os clones foram selecionados através do crescimento em meio de cultura com antibiótico canamicina, uma vez que o pET28(a)+ confere resistência a este antibiótico. Escolhemos aleatoriamente

algumas colônias para realizarmos uma PCR confirmatória e posteriormente selecionamos uma dessas colônias de cada para realizar a extração do plasmídeo através da lise alcalina.

Dentre os clones positivos, selecionou-se uma colônia de cada mutante para o preparo do pré-inóculo a fim de realizar a extração do DNA plasmidial por lise alcalina, obtido utilizando o kit comercial. Após a extração, o material adquirido foi submetido a uma amplificação utilizando os *primers* da região T7, assim como foi realizado anteriormente, para confirmarmos a integridade dos plasmídeos.

Com a confirmação da clonagem, prosseguimos para submeter o produto da lise alcalina a etapa de transformação do produto em cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS com o objetivo de prepararmos os ensaios para a expressão das proteínas. A transformação foi feita por choque térmico e após a obtenção das colônias, confirmamos através da amplificação com os *primers* da região T7 a obtenção dos clones dos mutantes nas cepas de expressão, assim como foi realizado anteriormente (Figura 6).

**Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação dos plasmídeos obtidos em colônias de *E. coli* BL21(DE3)pLysS.



Linhas: (MM) marcador molecular GeneRuler 1kb; PCR de colônia da SCMCA-IA íntegra mutante, na imagem como exemplo 4 colônias do mutante C276A.

O material oriundo da lise alcalina foi submetido a sequenciamento pela empresa Ludwig (dados não mostrados). Os resultados mostraram que nossos mutantes foram obtidos com êxito.

#### 4. CONCLUSÃO

O presente trabalho descreve um processo meticuloso de mutação sítio-dirigida do gene codificante da metacaspase de *S. cerevisiae* (ScMCA-Ia), utilizando como base a sequência de aminoácidos da TbMCA-IIa de *Trypanosoma brucei*, e levando em consideração os resíduos essenciais identificados na estrutura cristalográfica dessa enzima.

A análise revelou a conservação da cisteína catalítica, em particular a Cys<sup>276</sup> na ScMCA-Ia, que constitui o sítio ativo da enzima, juntamente com um resíduo de histidina. Adicionalmente, a TbMCA-IIa

---

apresentou uma segunda cisteína (Cys<sup>92</sup>) associada ao processo de autoprocessamento, o que implicou na mutação correspondente da Cys<sup>155</sup> na ScMCA-Ia.

Iniciamos com a estratégia *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis System*, amplamente utilizada, porém demonstrou ineficiência devido à hibridização dos primers, presumivelmente causando formação de dímeros e redução do rendimento da reação. Como alternativa, adotamos a técnica de sobreposição de fragmentos, permitindo mutações de substituição. Optamos pela alanina devido à sua estrutura e cadeia lateral simples, evitando perturbações na estrutura da proteína.

A amplificação por sobreposição de fragmentos foi realizada em duas etapas (PCR I e PCR II), gerando fragmentos complementares que serviram como matriz para a clonagem. A metodologia *T5 exonuclease DNA assembly (TEDA)* foi empregada, utilizando exclusivamente a T5 exonuclease para clivar o DNA na direção 5'-3', transformando extremidades coesivas em pontas cegas que se hibridizaram. O reparo *in vivo* das lacunas foi executado pela DNA polimerase e ligase da própria bactéria.

A digestão com DpnI foi crucial para degradar o DNA metilado empregado como molde na reação de amplificação, antes da clonagem no vetor linearizado pET28(a)+. A seleção dos clones foi conduzida com base na resistência à canamicina conferida pelo plasmídeo. A confirmação da clonagem foi realizada por PCR e subsequente sequenciamento.

Em seguida, procedeu-se com a transformação do produto em cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS para a preparação dos ensaios de expressão das proteínas mutantes. O sequenciamento final atestou o sucesso na obtenção dos mutantes. O presente estudo apresenta uma abordagem metodológica robusta para a realização de mutações sítio-dirigidas em genes, com aplicabilidade potencial em investigações futuras sobre metacaspases.

---

## REFERÊNCIAS

1. Uren AG, O'Rourke K, Aravind L, et al. Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 2000;
2. Hill SM, Nyström T. The dual role of a yeast metacaspase: What doesn't kill you makes you stronger. *BioEssays* 2015;
3. Klemenčič M, Funk C. Evolution and structural diversity of metacaspases. *J Exp Bot.* 2019;
4. Vercammen D, Cotte B Van De, Jaeger G De, et al. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *Journal of Biological Chemistry* 2004;
5. Machado MFM, Marcondes MF, Juliano MA, et al. Substrate specificity and the effect of calcium on *Trypanosoma brucei* metacaspase 2. *FEBS Journal* 2013;280(11).
6. Minina EA, Coll NS, Tuominen H, Bozhkov P V. Metacaspases versus caspases in development and cell fate regulation. *Cell Death Differ.* 2017;
7. Minina EA, Staal J, Alvarez VE, et al. Classification and Nomenclature of Metacaspases and Paracaspases: No More Confusion with Caspases. *Mol Cell.* 2020;
8. Tsiatsiani L, Breusegem F Van, Gallois P, Zavialov A, Lam E, Bozhkov P V. Metacaspases. *Cell Death Differ.* 2011;
9. Moss CX, Westrop GD, Juliano L, Coombs GH, Mottram JC. Metacaspase 2 of *Trypanosoma brucei* is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing. *FEBS Lett* 2007;
10. Gilio JM, Marcondes MF, Ferrari D, et al. Processing of metacaspase 2 from *Trypanosoma brucei* (TbMCA2) broadens its substrate specificity. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 2017;1865(4).
11. Shrestha A, Megeney LA. The non-death role of metacaspase proteases. *Front Oncol.* 2012;
12. Madeo F, Engelhardt S, Herker E, et al. Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr Genet [homepage on the Internet]* 2002 [cited 2023 Jan 31];41(4):208–216. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12172961/>
13. Lee REC, Puente LG, Kærn M, Megeney LA. A non-death role of the yeast metacaspase: Yca1p alters cell cycle dynamics. *PLoS One* 2008;
14. Wong AHH, Yan C, Shi Y. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. *Journal of Biological Chemistry* 2012;
15. McLuskey K, Rudolf J, Proto WR, et al. Crystal structure of a *Trypanosoma brucei* metacaspase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;
16. Edelheit O, Hanukoglu A, Hanukoglu I. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. 2009; Available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/9/61>
17. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene [homepage on the Internet]* 1989 [cited 2023 Oct 16];77(1):51–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2744487/>
18. Gibbs CS, Zoller MJ. Identification of electrostatic interactions that determine the phosphorylation site specificity of the cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry [homepage on the Internet]* 1991 [cited 2023 Oct 30];30(22):5329–5334. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2036400/>



- 
19. Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* [homepage on the Internet] 1973 [cited 2023 Jan 17];70(11):3240–3244. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4594039/>
  20. Chao R, Yuan Y, Zhao H. Recent advances in DNA assembly technologies. *FEMS Yeast Res* [homepage on the Internet] 2015 [cited 2023 Jan 17];15(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24903193/>
  21. Xia Y, Li K, Li J, Wang T, Gu L, Xun L. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 2019;47(3).
  22. Lu L, Patel H, Bissler JJ. Optimizing DpnI digestion conditions to detect replicated DNA. *Biotechniques* [homepage on the Internet] 2002 [cited 2023 Jan 17];33(2):316–318. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12188183/>
  23. Mierzejewska K, Siwek W, Czapinska H, et al. Structural basis of the methylation specificity of R.DpnI. *Nucleic Acids Res* [homepage on the Internet] 2014 [cited 2023 Jan 17];42(13):8745–8754. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24966351/>
  24. Kostylev M, Otwell AE, Richardson RE, Suzuki Y. Cloning Should Be Simple: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. *PLoS One* [homepage on the Internet] 2015 [cited 2023 Jan 17];10(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26348330/>