

## CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA METACASPASE YCA1 COM A DELEÇÃO DO N-TERMINAL

Isabela Ramos Sales Prado<sup>1</sup>; Taíz dos Reis Santos<sup>2</sup>; Laura Francisca do Leite Prado Souza<sup>3</sup>; Laura Helena Araujo<sup>4</sup>; Marcelo Ferreira Marcondes<sup>5</sup>; Mauricio Ferreira Marcondes Machado<sup>6</sup>

1. Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: isabelarsprado@gmail.com
2. Estudante do Mestrado em Biotecnologia; e-mail: taiz\_reis18@hotmail.com
3. Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: laura\_prado2013@hotmail.com
4. Estudante do Mestrado em Biotecnologia; e-mail: lhelena3615@hotmail.com
5. Professor da Universidade Federal de São Paulo; e-mail: marcelo.marcondes@unifesp.br
6. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: mauriciomachado@umc.br

Áreas de conhecimento: **Biologia molecular**

**Palavras-chave:** YCA1; *Saccharomyces cerevisiae*; apoptose; agregação proteica

### INTRODUÇÃO

A apoptose é um tipo de morte celular programada que ocorre em resposta a uma variedade de estímulos fisiológicos ou patológicos. Em eucariotos superiores, apoptose é modulada por proteases denominadas caspases. No início da década passada, as metacaspases foram identificadas e classificadas no clã de cisteíno proteases CD e família C14 por apresentarem homologia estrutural com as caspases devido a presença da dobra de caspase-hemoglobina, entretanto, diferem na especificidade do substrato e no mecanismo de catalise (HILL *et al.*, 2015). O sítio ativo das metacaspases é constituído por uma díade catalítica de cisteína e histidina, sendo o resíduo de cisteína o nucleófilo para hidrólise do substrato. A clivagem proteolítica ocorre após o reconhecimento de resíduos básicos, como arginina ou lisina, na posição P<sub>1</sub> do substrato (HILL *et al.*, 2015). As metacaspases são expressas como zimogênios e necessitam de processamento proteolítico para ativação. O autoprocessamento é dependente de íons de cálcio e altera a estrutura tridimensional formando uma unidade monomérica ativa (WONG *et al.*, 2012). Em *S. cerevisiae* encontra-se uma única metacaspase, a YCA1, que modula ao menos sete processos biológicos, que vão desde a regulação do ciclo celular à apoptose (WONG *et al.*, 2012). YCA1 é uma metacaspase do tipo I com pro-domínio N-terminal característico contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e pouco flexíveis. A porção N-terminal é constituída por 100 aminoácidos, dentre eles, 22 resíduos de glutamina, 12 resíduos de asparagina, 11 resíduos de glicina e 16 resíduos de prolina (WONG *et al.*, 2012). Diferentemente das caspases e de outras metacaspases, como TbMCA2, o N-terminal da YCA1 não circunda o sítio ativo impedindo a acomodação do substrato e a atividade catalítica, mas permanece livre. YCA1 é capaz de modular diferentes pontos de verificação do ciclo celular, bem como participar da remoção de agregados proteicos na célula (HILL *et al.*, 2015). Além disso, muitos estudos comprovaram a atuação da YCA1 em processos apoptóticos sob a influência de uma variedade de estímulos, como o estresse oxidativo, danos ao DNA e senescência da levedura (TSIATSIANI *et al.*, 2011). Embora em *S. cerevisiae* a apoptose tenha um viés altruístico, observa-se alterações morfológicas e bioquímicas semelhantes as encontradas em mamíferos e considera-se que seres unicelulares também possuam mecanismos apoptóticos (ERHARDT *et al.*, 2010). É perceptível que YCA1 é essencial para homeostasia de *S. cerevisiae*, embora muitas outras questões a respeito das funções desta protease precisem ser elucidadas. Os ensaios utilizando YCA1 são dificultados devido as sequências repetidas de resíduos hidrofóbicos no N-terminal que atuam como moduladores da transformação da proteína em um estado insolúvel, condição que impossibilita a função da metacaspase *in vivo* e a realização de estudos *in vitro*. Dado esta problemática, sugere-se o uso de mutantes

deletérios, realizando a clonagem da YCA1 contendo a deleção dos resíduos de aminoácidos que compõem o N-terminal (ERHARDT *et al.*, 2010).

## OBJETIVO

Obter a metacaspase YCA1 recombinante em *E. coli* com deleção de 86 aminoácidos da região N-terminal.

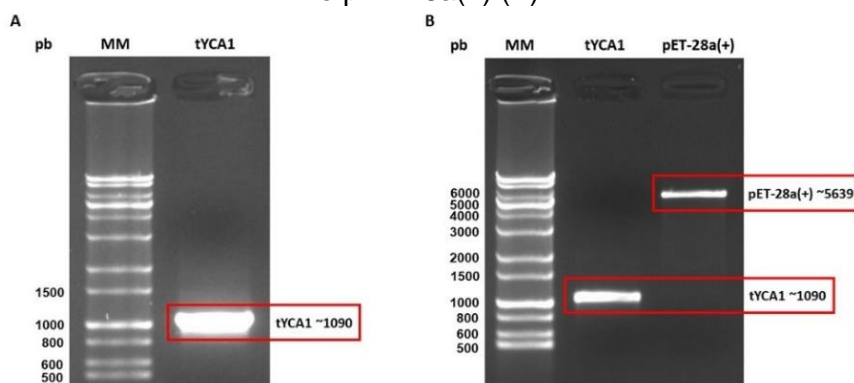
## METODOLOGIA

A amplificação do gene tYCA1 foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando a enzima *Taq* DNA polimerase e oligonucleotídeos específicos contendo as sequências de reconhecimento das enzimas de restrição *NheI* e *EcoRI*. O produto amplificado e o vetor pET-28a(+) foram purificados e digeridos pelas endonucleases de restrição *NheI* e *EcoRI*. Após a nova purificação, as extremidades coesivas do gene tYCA1 foram hibridizadas por complementariedade ao pET-28a(+) no processo de ligação utilizando a enzima T4 DNA Ligase. O DNA recombinante foi incorporado por choque térmico a cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , semeado em meio LB Broth suplementado com canamicina e incubado a 37°C por 18 horas. A triagem dos clones positivos foi realizada por PCR das UFCs utilizando oligonucleotídeos T7. A partir das colônias positivas realizou-se a lise alcalina para extração do DNA recombinante. O produto da lise foi incorporado a linhagem BL21 (DE3) de *E. coli* por choque térmico. A suspensão de células foi semeada em meio LB Broth suplementado com canamicina e incubado a 37°C por 18 horas. Os clones positivos foram triados por PCR com oligonucleotídeos T7. A expressão de tYCA1 foi induzida com IPTG 0,25 mM durante 16 horas a 20°C. O sedimento foi submetido a lise por cisalhamento com pulsos de 25 Hz e à ação das enzimas lisozima e benzonase. A metacaspase expressa foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna *HisTrap-Ni<sup>2+</sup> sepharose* acoplada ao sistema *Akta Pure* com eluição em diferentes concentrações de imidazol (50-500 mM). O processo de dessalinização por cromatografia líquida de exclusão molecular utilizando a coluna gel-filtração *HiPrep Desalting* foi realizado para remover o imidazol do meio. As proteínas obtidas foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE com 15% de acrilamida.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

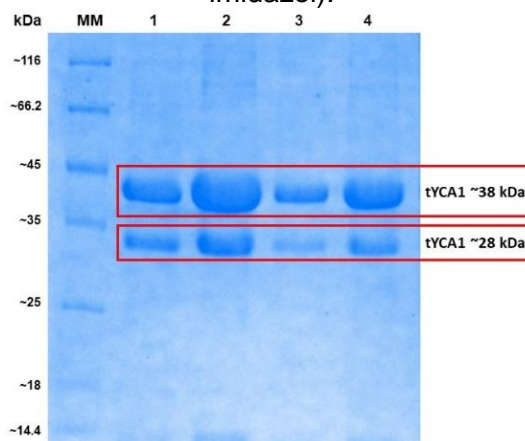
O gene tYCA1 amplificado foi analisado por eletroforese em agarose a 1% e apresentou uma única banda com ~1090 pb correspondendo ao gene tYCA1 (Figura 1-A). A digestão pelas endonucleases *NheI* e *EcoRI* da tYCA1 e pET28a(+) também foram confirmadas por análise eletroforética e apresentaram bandas de ~1090 pb e ~5366 pb, respectivamente (Figura 1-B).

**Figura 1:** Eletroforese em agarose à 1% da amplificação da tYCA1 (A) e digestão da tYCA1 e pET-28a(+) (B).



Os produtos digeridos apresentaram duas extremidades coesivas, as quais juntamente com linearização do vetor plasmidial, permitiram a hibridização por complementariedade e renaturação com tYCA1 no processo de ligação utilizando a enzima T4 DNA Ligase, cuja função é unir ligações fosfodiéster dos grupamentos fosfato e hidroxila nas extremidades coesivas da molécula de DNA (SAMBROOK *et al.*, 2001). O DNA recombinante formado foi incorporado a cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* e a clonagem foi confirmada por PCR utilizando oligonucleotídeos T7 e eletroforese em gel de agarose a 1%. Uma *miniprep* dos clones positivos foi obtida e transfectada na estirpe BL21 (DE3) para expressão de tYCA1. tYCA1 foi expresso e analisado por eletroforese em gel SDS-PAGE a 15%, a qual confirmou a presença de uma banda de ~38 kDa relacionada à metacaspase truncada na forma não processada e uma pequena unidade de ~28 kDa correspondente a forma processada de tYCA1 (dados não mostrados) (WONG *et al.*, 2012). Os ensaios para purificação da proteína realizados por cromatografia de afinidade utilizando um gradiente crescente de concentração de imidazol, permitiram a purificação de tYCA1 de forma seletiva e em sua conformação nativa devido a competição dos sais imidazólicos com tYCA1 pela ligação aos íons de Ni<sup>2+</sup> imobilizados na coluna (BORNHORST *et al.*, 2000). O uso do gradiente crescente de concentração de imidazol (50-500 mM) possibilitou a remoção de contaminantes e, conseqüentemente, obtenção da tYCA1 em sua forma pura, onde a proteína mostrou ser pura após tratamento com 300 mM de imidazol. A dessalinização da forma pura de tYCA1 ocorreu por um segundo método de purificação, a cromatografia líquida de exclusão molecular em uma coluna de gel-filtração *HiPrep Desalting*. Neste método de exclusão por tamanho molecular, as proteínas maiores são eluídas primeiro e as menores ficam retidas na coluna, como tYCA1 é uma proteína relativamente grande foi dessalinizada e eluída rapidamente em um tampão TBS. A figura 2 apresenta a análise da purificação em gel SDS-PAGE a 15%, no qual pode-se observar que tYCA1 eluída em 300mM de imidazol se apresenta pura em sua forma não processada, em torno de ~38 kDa, e em sua forma processada, cerca de ~28 kDa.

**Figura 2:** SDS-PAGE a 15% da dessalinização de tYCA1 na forma pura (300mM de imidazol).



A purificação da tYCA1 em sua forma nativa e solúvel, indica que a remoção do N-terminal, que era hidrofóbico e pouco flexível, proporcionou maior estabilidade a proteína evitando sua agregação (BORNHORST *et al.*, 2000). Além disso, os ensaios de Wong *et al.* (2012), permite-nos acreditar que o processamento auto-catalítico da YCA1 ocorre na extremidade C-terminal nos resíduos Lys<sup>331</sup> e Lys<sup>334</sup>, e que o N-terminal é removido por proteólise após a ativação enzimática. A partir destas evidências descritas na literatura, e dos resultados obtidos neste estudo, sugerimos que as sequências que codificam aminoácidos com características agregadoras no gene de YCA1 podem ser removidos sem prejuízo à sua função proteolítica, visto que a atividade enzimática é totalmente relacionada à conformação nativa (BRATKO *et al.*, 2007). Outra característica importante da YCA1 a ser considerada é que *in vivo* ela pode ser expressa em três isoformas que diferem apenas no comprimento da

região N-terminal. Sob condições normais, é identificado de forma majoritária, uma isoforma contendo 432 aminoácidos, que não é tão propensa à agregação quanto as isoformas mais longas, com 451 ou 453 aminoácidos (ERHARDT *et al.*, 2010). A partir desta clonagem, expressamos e purificamos *in vitro* a metacaspase contendo 364 aminoácidos, pois é sugerido que YCA1 seja capaz de formar agregados proteicos em função do trecho polipeptídico que antecede o domínio formador de príons. Este domínio em YCA1 é conhecido por sua capacidade de promover modificações estruturais devido a transformação de uma proteína solúvel em um estado insolúvel, e se localiza na região N-terminal que foi removida e se assemelha ao encontrado na proteína priônica *Sup35* (ERHARDT *et al.*, 2010). Portanto, baseado nestes dados, acreditamos que o predomínio de aminoácidos hidrofóbicos no N-terminal seja a razão pela qual a agregação proteica ocorre. Sabe-se que interações hidrofóbicas entre aminoácidos são determinadas pelas suas cadeias laterais, não entre vizinhos, mas entre aqueles aminoácidos em contato localizados no mesmo ângulo, sendo também influenciados pelo solvente (DILL, 1999). Deste modo, a depender do solvente, a metacaspase poderia formar interações de contato na qual provoca deslocamento de resíduos hidrofóbicos formando agregados proteicos. Acreditamos este problema foi solucionado removendo os 86 aminoácidos da região N-terminal, produzindo desta forma, uma enzima solúvel em solução.

## CONCLUSÃO

Neste estudo demonstramos com êxito a amplificação e a clonagem do gene da tYCA1 contendo a deleção dos 86 resíduos de aminoácidos da região N-terminal no vetor pET-28a(+). Os ensaios de expressão e purificação também foram bem sucedidos e demonstraram que tYCA1 se apresentou estável e solúvel quando submetida a estes ensaios. A hipótese de que a porção N-terminal era responsável pela agregação proteica de YCA foi confirmada e solucionada com este estudo.

## REFERÊNCIAS

- BORNHORST, J. A. *et al.* Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. **Methods Enzymol**, v. 326, p. 245-54, 2000.
- BRATKO, D. *et al.* Molecular simulation of protein aggregation. **Biotechnol Bioeng**, v. 96, n. 1, p. 1-8, 2007.
- DILL, K. A. Polymer principles and protein folding. **Protein Sci**, v. 8, n. 6, p. 1166-80, 1999.
- ERHARDT, M. *et al.* Extra N-terminal residues have a profound effect on the aggregation properties of the potential yeast prion protein Mca1. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. 9929, 2010.
- HILL, S. M. *et al.* The dual role of a yeast metacaspase: What doesn't kill you makes you stronger. **Bioessays**, v. 37, n. 5, p. 525-31, May 2015.
- SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- TSIATSIANI, L. *et al.* Metacaspases. **Cell Death Differ**, v. 18, n. 8, p. 1279-88, Aug 2011.
- WONG, A. H. *et al.* Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. **J Biol Chem**, v. 287, n. 35, p. 29251-9, Aug 24 2012.