

CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA METACASPASE (PbMCA) DE *Paracoccidioides brasiliensis* COM A DELEÇÃO DA PORÇÃO N-TERMINAL

Laura Francisca Leite do Prado de Souza¹; Taiz Souza dos Reis²; Marcelo Ferreira Marcondes³; Mauricio Ferreira Marcondes Machado⁴

1. Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: laura_prado2013@hotmail.com
2. Mestranda de Biotecnologia; e-mail: taiz_reis18@hotmail.com
3. Professor adjunto da UNIFESP/SP; e-mail: marcelo.marcondes@unifesp.br
4. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: mauriciomachado@umc.br

Área de conhecimento: **Biologia Molecular**

Palavras-chaves: Clonagem; Metacaspase; *Paracoccidioides brasiliensis*

INTRODUÇÃO

Metacaspases (MCAs) são cisteíno-peptidases encontradas em eucariotos inferiores, como plantas, fungos e protozoários, estas enzimas são similares as caspases e estão intimamente correlacionadas com a morte celular nestes organismos (VERCAMMEN *et al.*, 2007; UREN *et al.*, 2000). O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é capaz de codificar uma única metacaspase (PbMCA), este agente é o causador da paracoccidioidomicose, doença de origem sistêmica e de grande prevalência nos países da América Latina (ARRUDA *et al.*, 2015), logo, produzir esta enzima é de grande interesse para formulação de moduladores que possam auxiliar no tratamento e controle da doença, sendo assim, este trabalho buscou tentar produzir a proteína em sua forma solúvel, a fim de poder caracteriza-la futuramente.

OBJETIVOS

O objetivo primário era expressar e purificar a proteína PbMCA integra, tendo em vista a precipitação da mesma, os novos objetivos foram clonar a metacaspase de *Paracoccidioides brasiliensis* com a deleção da porção N-terminal, em sistema heterólogo de *E. coli*.

METODOLOGIA

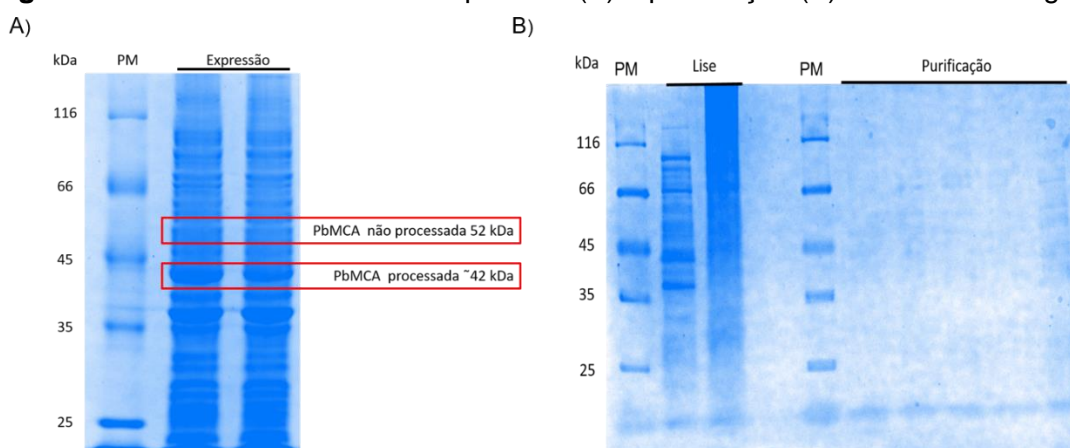
Realizamos a expressão da PbMCA integra induzindo-a com 0,5 mM de IPTG, posteriormente fizemos a purificação proteica em coluna com afinidade por níquel, a análise dos resultados foi feita mediante gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Após análise dos experimentos anteriores decidimos construir um novo clone da metacaspase de *P. brasiliensis*, mas sem a região N-terminal, o gene sintético foi amplificado utilizando *primers* específicos para o gene, sendo que o *primer forward* foi desenhado para deletarmos os 100 primeiros resíduos de aminoácidos da região N-terminal, depois foi purificado e digerido com as enzimas de restrição NheI e EcoRI, o produto da digestão foi inserido no vetor pET28a, previamente preparado para clonagem, o DNA recombinante foi então inserido por transformação com choque térmico na célula hospedeira DH5 α , responsável por fazer a replicação do clone, foi feita a seleção de colônias positivas e as mesmas foram transfectadas para a cepa de *E. coli* BL21(DE3), que por sua vez fará a ativação da proteína, para expressão colônias positivas foram induzidas com 0,1, 0,25 e 1 mM de IPTG, a análise da expressão foi feita em gel de SDS-PAGE. Já para avaliarmos a toxicidade da proteína recombinante para a

célula hospedeira refizemos a expressão e purificação da proteína integra, no entanto utilizamos uma colônia fresca e adicionamos antibiótico canamicina em todas as etapas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

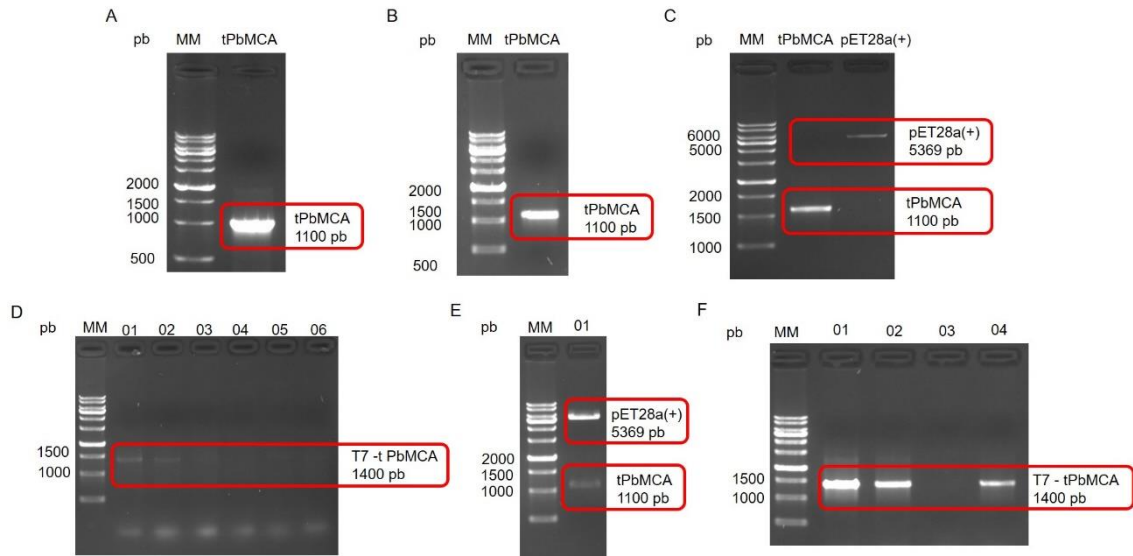
A expressão e purificação da metacaspase integra de *Paracoccidioides brasiliensis* foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE e sugerem que a proteína entrou em corpo de inclusão o que culminou em sua precipitação, já que a proteína de interesse, que possui por volta de 52 KDa em sua forma não processada e 42 KDa na forma processada apresentou-se positiva apenas na expressão, como pode ser visualizado na figura 1A, já na lise e na purificação não conseguimos obter êxito, assim como mostrado na figura 1-B. Estudos anteriores sobre metacaspase, como por exemplo os artigos de Erhardt (2010) e Wong (2012), mostram que os corpos de inclusão podem ser formados devido a presença de muitos resíduos hidrofóbicos na região N-terminal.

Figura 1: Géis de SDS-PAGE da expressão (A) e purificação (B) da PbMCA integra



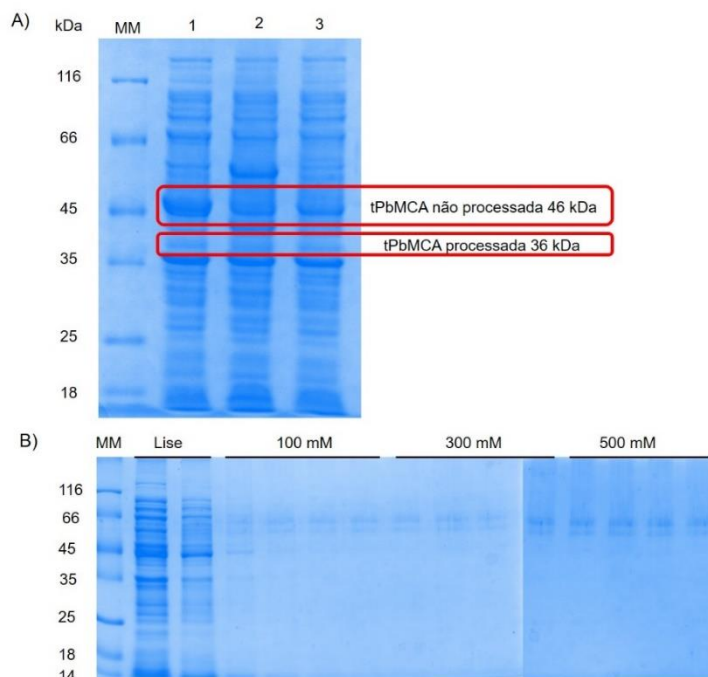
Devido a precipitação fizemos a construção de um clone sem a porção N-terminal, a figura abaixo representa as etapas de amplificação (Figura 2 – A), purificação (Figura 2B), digestão (Figura 2C), inserção em DH5 α (Figura 2D), análise digestão do clone positivo (Figura 2E), inserção em BL21(DE3) (Figura 2F), respectivamente. O gene da PbMCA com a deleção de parte da região N-terminal passou a apresentar 1100 pb, na imagem abaixo visualizamos que todas as bandas correspondentes ao gene possuem esse tamanho, com exceção dos testes com primers T7 que possuem 300 pb a mais devido a amplificação da região do promotor e terminador, sendo assim, podemos dizer que a clonagem foi realizada com sucesso.

Figura 2: Etapas da construção do clone truncado e sua expressão



Ao expressarmos a proteína truncada (Figura 3A) notamos um rendimento abaixo do esperado e novamente não conseguimos fazer a purificação proteica, com estes novos resultados levantamos a hipótese de que a dificuldade na purificação possa ser devido a toxicidade da proteína recombinante para a célula hospedeira, por isso decidimos expressar novamente a proteína íntegra de PbMCA, no entanto utilizamos uma colônia fresca e adicionamos antibiótico canamicina em todas as etapas, depois fizemos a purificação em coluna com resina de níquel, ao fazermos a análise desse procedimento via SDS-PAGE constatamos que a proteína foi purificada em todas as concentrações de imidazol (figura 3B), logo, podemos concluir que a proteína é tóxica.

Figura 3: Expressão da tPbMCA e purificação da proteína PbMCA íntegra



CONCLUSÕES

A priori não conseguimos purificar a proteína PbMCA em sua forma íntegra, baseado em estudos anteriores sobre metacaspase, como por exemplo nos artigos de Erhardt (2010) e Wong (2012), acreditamos que isso ocorria devido a muitos resíduos de glutamina e asparagina na região N-terminal, por isso resolvemos construir um clone sem esta região, a construção do clone truncado (tPbMCA) ocorreu com êxito, porém novamente tivemos dificuldades na expressão e purificação da proteína, então surgiu a hipótese do problema estar relacionado a toxicidade da proteína recombinante para a célula hospedeira, decidimos refazer a expressão e purificação da proteína íntegra de PbMCA, com algumas mudanças no protocolo, dessa vez conseguimos purificar com êxito e chegamos a conclusão de que a proteína metacaspase de *P. brasiliensis* é muito tóxica para a célula hospedeira.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, D. C.; MATSUO, A. L.; SILVA, L. S.; REAL, F.; LEITAO, N. P., JR.; PIRES, J. H. CAIRES, A. C.; GARCIA, D. M.; CUNHA, F. F.; PUCCIA, R.; LONGO, L. V. Cyclopalladated Compound 7a Induces Apoptosis- and Autophagy-Like Mechanisms in Paracoccidioides and Is a Candidate for Paracoccidioidomycosis Treatment. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 12, p. 7214-23, Dec 2015.
- ERHARDT, M.; WEGRZYN, R.; DEUERLING, E. 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. e9929, Mar 29 2010.
- UREN, A. G.; O'ROURKE, K.; ARAVIND, L. A.; PISABARRO, M. T.; SESHAGIRI, S.; KOONIN, E. V.; DIXIT, V. M. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. **Mol Cell**, v. 6, n. 4, p. 961-7, Oct 2000.
- VERCAMMEN, D.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P.; VAN BREUSEGEM, F. Are metacaspases caspases? **J Cell Biol**, v. 179, n. 3, p. 375-80, Nov 05 2007.
- WONG, A.; YAN, C.; SHI, Y. Crystal structure of the yeast metacaspase YCA1. **J Biol Chem**, v. 287, n. 35, p. 29251-9, Aug 24 2012.