

CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PARACASPASE DE *Dictyostelium discoideum*

Mariana N.R. Trujilho¹; Taiz Reis²; Maurício F.M. Machado³.

- 1- Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: marianatrujilho@hotmail.com
- 2- Doutoranda em Biotecnologia; e-mail: taiz_reis18@hotmail.com
- 3- Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: mauriciomachado@umc.br

Área de conhecimento: Biologia molecular

Palavras-Chave: Clonagem, metacaspase, expressão proteica.

INTRODUÇÃO

A morte celular programada é geneticamente regulada por diversos sinais no ambiente celular (LU e CHEN, 2011), peptidases chamadas caspases têm sido descritas como principais reguladores da apoptose (VERCAMMEN *et al.*, 2007). Em 2000, duas novas proteínas como as caspases foram descobertas: as paracaspases e as metacaspases (UREN *et al.*, 2000). Enquanto as paracaspases são encontradas em metazoários e em *Dictyostelium sp.*, as metacaspases são encontradas somente em organismos que não apresentam caspases, entre eles fungos, plantas e protozoários. Caspases, metacaspases e paracaspases são membros do clã CD, família 14 das cisteíno peptidases (CARMONA-GUTIERREZ *et al.*, 2010; MOTTRAM *et al.*, 2003). Ambas as enzimas metacaspases e paracaspases são codificadas de forma similar a caspases apresentando a subunidade p20 conservada. Nas caspases esta subunidade é altamente conservada, e é necessária para o reconhecimento e catálise do substrato (ARAVIND e KOONIN, 2002; LAMKANFI *et al.*, 2002). Apesar de serem estruturalmente similares as metacaspases e as paracaspases diferem na especificidade quando comparadas a caspase, enquanto as caspases hidrolisam seus substratos contendo ácido aspártico na posição P₁, as metacaspases e as paracaspases apresentam uma especificidade por resíduos básicos (lisina ou arginina) na posição P₁ (GONZALEZ *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2013; VERCAMMEN *et al.*, 2006; VERCAMMEN *et al.*, 2004; WATANABE e LAM, 2005) e as metacaspases são ativadas e sofrem um autoprocessamento por ação de íons cálcio (MACHADO *et al.*, 2013; MOSS *et al.*, 2007). Dados recentes sugerem que a paracaspase de *Dictyostelium* apresenta outras funções celulares diferente do observado com a caspases durante a morte celular. As se diferenciam, e algumas células entram em apoptose formando os chamados talos multicelulares, experimentos realizados com uma linhagem celular deficiente em paracaspase (*DdPCLa*-) demonstra um desenvolvimento normal na formação dos talos multicelulares (ROISIN-BOUFFAY *et al.*, 2004). O *Dictyostelium discoideum* é um organismo “simples” que vem sendo utilizado como modelo para a compreensão de uma grande variedade de processos biológicos de cascatas de transdução de sinal de sistemas mais complexos como, por exemplo, humanos (MULLER-TAUBENBERGER, KORTHOLT e EICHINGER, 2013).

OBJETIVO

Obter a paracaspase de *Dictyostelium discoideum* recombinante em sistema de expressão em *Escherichia coli*.

METODOLOGIA

A amplificação do gene da paracaspase foi realizada com os primers específicos, e após sua confirmação, este material foi submetido a digestão com as enzimas de restrição NdeI e XhoI.

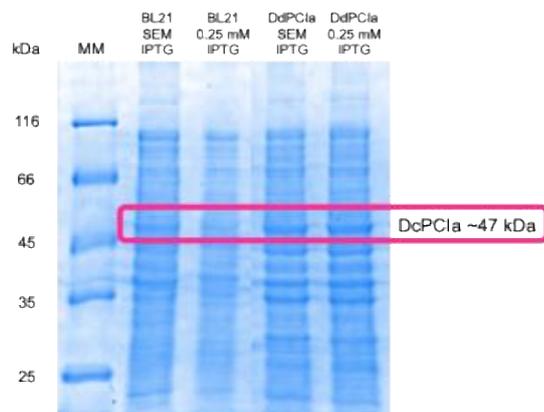
Posteriormente o material foi transformado em bactéria competente *E.coli* (BL21(DE3)) através da técnica de transformação por choque térmico em células competentes. Foi

realizado o sequenciamento para avaliar se o gene clonado não possui nenhuma mutação e que a clonagem foi realizada com êxito. Depois disso, foi realizada a expressão proteica a qual foi induzida com IPTG. Com a constatação que de fato houve expressão proteica, sendo possível observar em SDS-Page 15%, esta foi purificada por cromatografia de afinidade onde as proteínas são separadas pela afinidade ao ligante no equipamento Akta Pure (GE Healthcare) utilizando um gradiente de concentração de imidazol. Foi realizada uma cromatografia de gel filtração a fim de retirar o imidazol presente. A fim de comprovar a expressão da DdPC1a foi realizado um *Western Blotting* com anticorpo Anti-6X His[®]tag (ThermoFisher).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a clonagem do gene comercial da paracaspase (DdPC1a), este material foi amplificado utilizando primers específicos e posteriormente foi purificado com o *Kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean- Up System* (Promega Biotecnologia). O inserto e o vetor foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* e posteriormente purificados com o *Kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean- Up System* (Promega). A próxima etapa executada foi o processo de ligação dos fragmentos do gene com o plasmídeo pela enzima T4 DNA ligase (Thermofisher) e o material foi ligado em uma relação (inserto: vetor) 1:2, 1:3, 1:5 e 1:7; e o produto desta ligação foi inserido em uma cepa de *E. coli* DH5 α competente. Foi obtida a expressão da proteína em sua forma peso molecular de 47 kDa a qual foi possível visualizar através do gel SDS PAGE 15% visualizadas por eletroforese em gel de poliácridamida (Figura 1).

Figure 01 - SDS-PAGE (15%) piloto de expressão DdPC1a (47 kDa) induzida com 0,25 mM of IPTG.

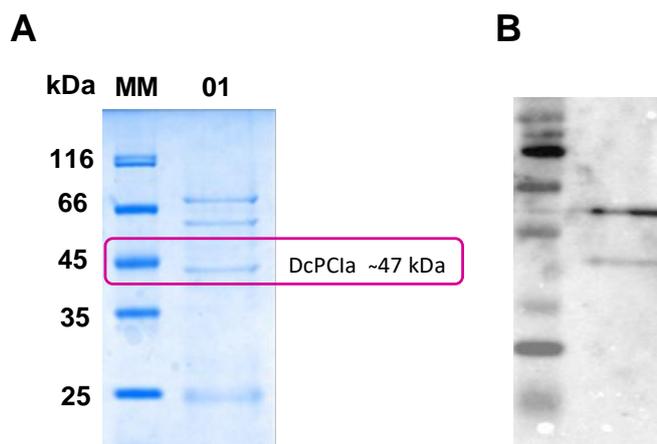


Assim, partimos para a lise celular e posteriormente para a purificação por cromatografia de afinidade em resina *HisTrap Ni²⁺NTA* (GE Healthcare) com gradiente crescente de imidazol (50mM, 300mM e 500mM). A cromatografia por afinidade foi selecionada pois a DdPC1a foi expressa uma vez que a clonagem no vetor pET-28a(+) promove a inserção de uma cauda contendo seis resíduos de histidina (His-tag) na região N-terminal da proteína produzida, assim, a purificação é facilitada pois há uma afinidade entre os íons de níquel (Ni²⁺) proveniente da coluna de cromatografia e as poli-histidinas (SCHEICH; SIEVERT; BUSSOW, 2003). O material eluído nas concentrações de 300 mM de imidazol foram avaliados através de um SDS-PAGE com malha de 15% de poliácridamida para verificarmos o sucesso da purificação. O SDS-PAGE demonstrou que a DdPC1a recombinante foi eluída com 300 mM, onde observamos a presença de uma banda na altura de 47kDa. Através da cromatografia líquida de exclusão molecular em coluna de gel-filtração *HiPrep Desalting* (GE Healthcare) o

sal imidazol foi retirado da proteína pura. Neste método, as proteínas maiores são eluídas primeiro e as menores podem ficar retidas na coluna.

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 2A) demonstrou que a DdPCla foi eluída com sucesso apresentando uma banda na altura de interesse (47kDa).

Figura 02 – (A) SDS-PAGE (15%) purificação da DdPCla (47 kDa). Onde MM é o marcador molecular; (01) é amostra proveniente da *desalting*. (B) *Western Blotting* da DdPCla através de reconhecimento por anticorpo primário anti-6XHis-tag.



A fim de comprovar se a proteína obtida se tratava de fato da DdPCla foi realizada a técnica de *Western Blotting* usando o anticorpo monoclonal *anti-6xHis-tag* (ThermoFisher). O produto da *desalting* foi utilizado e reconhecido pelo anticorpo de modo que se nota a banda na altura desejada (47kDa) (Figura 2B). A DdPCla foi de fato reconhecida pelo anticorpo, entretanto por apresentar duas bandas distintas acredita-se que ela se processou apresentando duas bandas de tamanho inferiores.

REFERÊNCIAS

ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. Classification of the caspase-hemoglobinase fold: detection of new families and implications for the origin of the eukaryotic separins. **Proteins**, v. 46, n. 4, p. 355-67, Mar 01 2002.

CARMONA-GUTIERREZ, D.; FROHLICH, K. U.; KROEMER, G.; MADEO, F. Metacaspases are caspases. Doubt no more. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 3, p. 377-8, Mar 2010. Doi 10.1038/Cdd.2009.198

GONZALEZ, I. J.; DESPONDS, C.; SCHAFF, C.; MOTTRAM, J. C.; FASEL, N. Leishmania major metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 2, p. 161-72, Feb 2007. 10.1016/j.ijpara.2006.10.004

LAMKANFI, M.; DECLERCQ, W.; KALAI, M.; SAELENS, X.; VANDENABEELE, P. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. **Cell Death Differ**, v. 9, n. 4, p. 358-61, Apr 2002. 10.1038/sj/cdd/4400989

LU, Y.; CHEN, G. Q. Effector caspases and leukemia. **Int J Cell Biol**, v. 2011, p. 738301, 2011. 10.1155/2011/738301

MACHADO, M. F.; MARCONDES, M. F.; JULIANO, M. A.; MCLUSKEY, K.; MOTTRAM, J. C.; MOSS, C. X.; JULIANO, L.; OLIVEIRA, V. Substrate specificity and the effect of calcium on *Trypanosoma brucei* metacaspase 2. **FEBS J**, v. 280, n. 11, p. 2608-21, Jun 2013.10.1111/febs.12248

MOTTRAM, J. C.; HELMS, M. J.; COOMBS, G. H.; SAJID, M. Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 4, p. 182-7, Apr 2003.

MULLER-TAUBENBERGER, A.; KORTHOLT, A.; EICHINGER, L. Simple system--substantial share: the use of *Dictyostelium* in cell biology and molecular medicine. **Eur J Cell Biol**, v. 92, n. 2, p. 45-53, Feb 2013.10.1016/j.ejcb.2012.10.003

UREN, A. G.; O'ROURKE, K.; ARAVIND, L.; 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. **Molecular Cell**, v. 6, n. 4, p. 961-7, Oct 2000.Doi 10.1016/S1097-2765(05)00086-9

VERCAMMEN, D.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P.; VAN BREUSEGEM, F. Are metacaspases caspases? **Journal of Cell Biology**, v. 179, n. 3, p. 375-80, Nov 5 2007.DOI 10.1083/jcb.200705193

VERCAMMEN, D. *et al.* Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. **J Mol Biol**, v. 364, n. 4, p. 625-36, Dec 8 2006.10.1016/j.jmb.2006.09.010

VERCAMMEN, D. *et al.* Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45329-36, Oct 29 2004.DOI 10.1074/jbc.M406329200

WATANABE, N.; LAM, E. Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 15, p. 14691-9, Apr 15 2005.DOI 10.1074/jbc.M413527200