

CLONAGEM DA METACASPASE (CaMCA) EM *Escherichia coli*

Kauani Duarte Lusvarghi¹; Taiz dos Reis Santos², Marcelo Ferreira Marcondes²; Mauricio Ferreira Marcondes Machado³

1. Estudante do curso de Farmácia; e-mail: kah.dl@hotmail.com
2. Mestranda em Biotecnologia; e-mail: taiz_reis18@hotmail.com
3. Professor da Universidade Federal de São Paulo; e-mail: marcelo.marcondes@unifesp.br
4. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: mauriciomachado@umc.br

Área do conhecimento: **Biologia Molecular**

Palavras-chave: Clonagem; Metacaspase; *Candida albicans*.

INTRODUÇÃO

O ciclo celular é determinado basicamente pelos processos de divisão celular, diferenciação celular e morte celular. Uma célula pode ser considerada morta quando a membrana plasmática perde sua integridade ou quando seu DNA encontra-se fragmentado, ou por diminuição da atividade celular, entre outros parâmetros (KROEMER *et al.*, 2005). Inicialmente a apoptose foi descrita como sendo um tipo de morte celular caracterizado por algumas modificações celulares, como: modificação da morfologia celular, condensação de cromatina, fragmentação nuclear e redução do volume celular (KERR *et al.*, 1972). Nos últimos anos, estudos mostraram o envolvimento de uma família de proteases envolvidas na morte celular programada em mamíferos, em organismos eucariontes simples como fungos e protozoários (metacaspases) (MADEO *et al.*, 2002). São cisteíno-peptidases encontradas em plantas, fungos e protozoários, que estão relacionadas com o processo de apoptose nestes organismos (CARMONA-GUTIERREZ *et al.*, 2010; MADEO *et al.*, 2002). Assim como as caspases essas moléculas são cisteíno peptidases, porém apresentam especificidade por resíduos básicos (Arg ou Lys) na posição P₁ (MACHADO *et al.*, 2013). As metacaspases estão envolvidas no ciclo celular de eucariotos simples, entretanto, poucos são os estudos sobre a funcionalidade bioquímica dessas proteases, portanto clonar a metacaspase de *C. albicans* (CaMCA) é de suma importância para realização de estudos bioquímicos que possibilitará o desenvolvimento de novos fármacos contra esse organismo patogênico.

OBJETIVOS

Clonar a metacaspase CaMCA de *Candida albicans* em sistema de expressão em *Escherichia coli*.

METODOLOGIA

As amostras de cDNA obtidas comercialmente (Invitrogen). A partir das amostras de cDNA foi realizada um PCR, onde amplificamos os genes de ambas metacaspases, utilizando os seguintes primers:

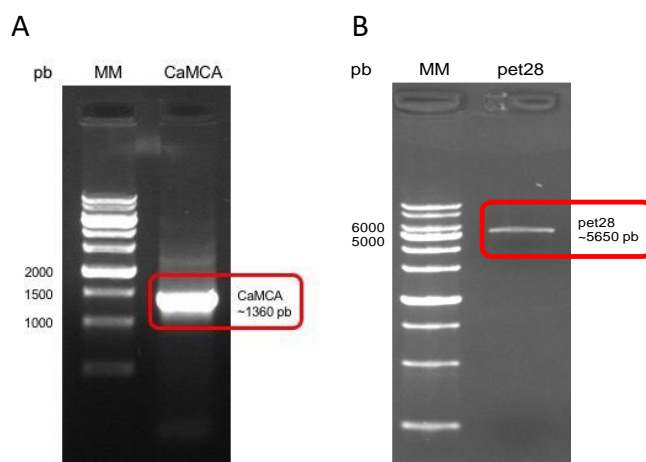
Sense 5' – GACGAACATATGTTTCCAGGACAAGGTAGACATACATACG – 3' e **Antisense** 5' – ATAGCTGAATTCTTAAAAATAAATTGCAAGTTGGTGTCT 3' a amplificação foi feita com a *Taq* DNA polimerase nas seguintes condições: 1 ciclo a 94 °C por 3 min seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg e 72 °C por 1 min e foi realizada a extensão final

a 72 °C com duração de 10 min. Para a determinação dos insertos amplificados realizamos eletroforese de agarose a 1%. Purificamos o material do PCR com o kit *GeneJet Gel Extraction Kit* (Fermentas) e posteriormente digerimos as amostras e o plasmídeo pet28a com as enzimas de restrição NdeI e EcoRI. Após a digestão purificamos as amostras e realizamos a ligação do gene da CaMCA com o plasmídeo pET-28a, com o cassete de expressão pronto finalizamos a clonagem através de transformação por choque térmico em cepa de *Escherichia coli* DH5 α . O clone foi extraído da DH5 α e introduzido na bactéria competente BL21(DE3), esta por sua vez possui a função de ativar a proteína, a transformação também foi analisada por PCR de colônia, a avaliação da expressão foi realizada por um piloto, no qual variou-se as concentrações de IPTG (0,1 mM, 0,25 mM e 1 mM), a indução foi realizada à 20° C overnight, o resultado do teste foi visualizado mediante eletroforese de SDS-Page.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

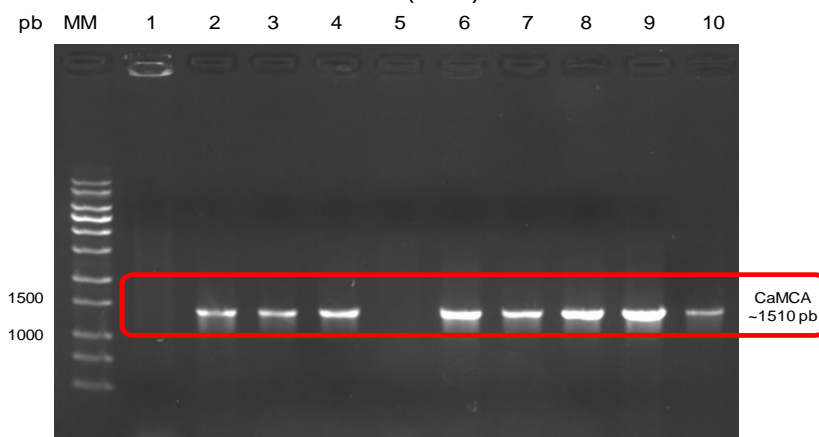
O PCR da amplificação gene da CaMCA (~1360 pb) foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 1^a), o material da amplificação assim como o vetor pET-28^a foram digeridos pelas enzimas de restrição NdeI e EcoRI e o resultado foi analisado por eletroforese (Figura1B).

Figura 01 – Eletroforese em gel de agarose da amplificação do gene CaMCA (A) e da digestão do inserto e do vetor (B)



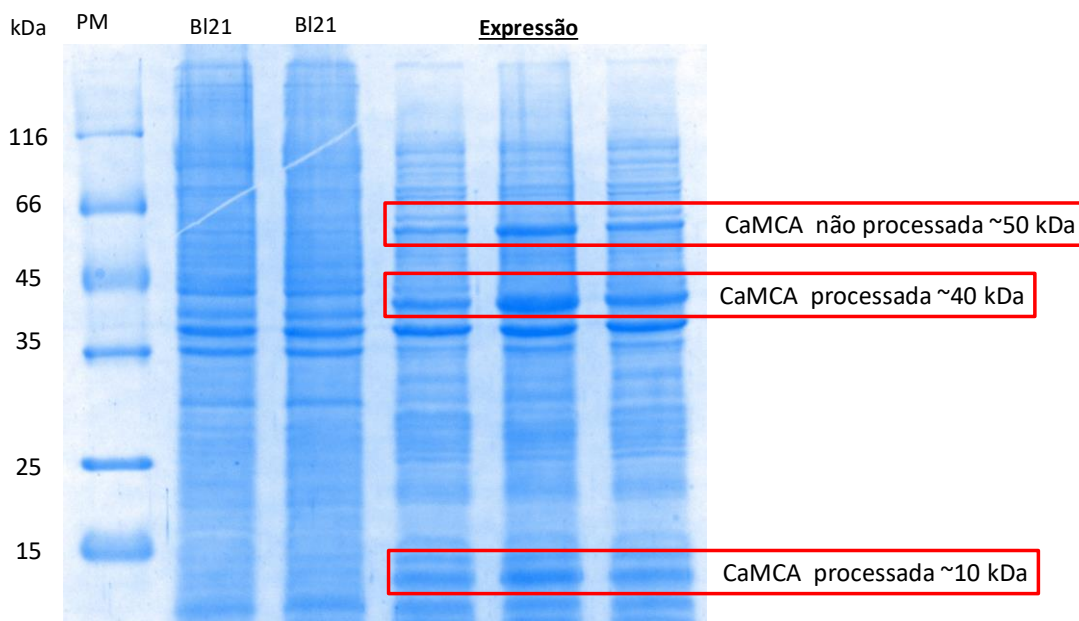
Após ligação, o DNA recombinante foi introduzido na cepa DH5 α e confirmado por PCR de colônia com *primers* T7 (**Dados não mostrados**), em seguida, as colônias positivas foram transfectadas para a bactéria competente BL21(DE3) – cepa capaz de induzir a expressão do gene – e também confirmadas por PCR de colônia (**Figura 02**), verificando que todas as colônias estavam positivas.

Figura 02 – Eletroforese em gel de agarose 1% da CaMCA recombinante transformada na BL21(DE3).



Para análise da expressão da proteína recombinante, foi realizado um piloto de expressão, induzindo a expressão com IPTG, este reagente promoverá o aumento da enzima T7 RNA polimerase, que ativará o promotor T7 e por indução indireta fará a expressão da proteína recombinante, a fim de encontrar as melhores condições de expressão, o piloto foi realizado à 20° C overnight, variando as concentrações de IPTG (0,1, 0,25 e 1 mM), a análise desse teste foi realizada por gel SDS-Page (figura 03), sabe-se por meio do site bioinformatics.org que a proteína CaMCA fusionada a uma cauda com 6 histidinas possui peso molecular de 50 KDa em sua forma processada e em sua forma processada apresenta um peso molecular em torno de 40 KDa.

Figura 03 - Eletroforese SDS-PAGE 15%. Ensaios de expressão a 20°C para CaMCA-pET28a (+) para 18 horas de indução com 0,25mM de IPTG. Os retângulos em vermelho indicam as bandas de expressão. A coluna 1 representa o peso molecular. As colunas 2 representa a BI21 DE3 vazia sem IPTG; A coluna 3 representa a BL21 DE3 vazia com 0,25mM de IPTG; as colunas 4 – 6 são a BL21-CaMCA com 0,25mM correspondentes aos erlenmeyr 1 a 3 respectivamente.



CONCLUSÕES

No presente trabalho, conseguimos amplificar e clonar com êxito a metacaspase CaMCA de *Candida albicans* no vetor pET-28a e transfectar esse cassete de expressão na *E.coli* BL21(DE3)pLysS, confirmamos que a clonagem foi realizada com êxito através de sequenciamento de DNA, onde a sequência codificante presente no cassete de expressão é capaz de traduzir a CaMCA sem nenhuma mutação, com esse clone em mãos pretendemos iniciar o processo de expressão da CaMCA para caracterização bioquímica desta protease e com isso desenvolvermos inibidores para essa enzima como potencial fármaco contra a candidíase.

AGRADECIMENTOS

FAPESP, CNPq e FAEP

REFERÊNCIAS

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.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972.

KROEMER, G.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M. E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKLONNY, M. V.; MALORNI, W.; KNIGHT, R. A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S.; MELINO, G.; NOMENCLATURE COMMITTEE ON CELL, D. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ**, v. 12 Suppl 2, p. 1463-7, Nov 2005.

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.

MADEO, F.; HERKER, E.; MALDENER, C.; WISSING, S.; LACHELT, S.; HERLAN, M.; FEHR, M.; LAUBER, K.; SIGRIST, S. J.; WESSELBORG, S.; FROHLICH, K. U. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. **Mol Cell**, v. 9, n. 4, p. 911-7, Apr 2002.