

## **CLONAGEM DA METACASPASE (PbMCA) DE *Paracoccidioides brasiliensis* RECOMBINANTE**

Laura Francisca Leite do Prado de Souza<sup>1</sup>; Marcelo Fernandes Marcondes<sup>2</sup>; Mauricio Fernandes Marcondes Machado<sup>3</sup>

1. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: laura\_prado2013@hotmail.com
2. Professor da Universidade Federal de São Paulo; e-mail: marcelo.marcondes@unifesp.br
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: mauriciomachado@umc.br

Área do conhecimento: **Biologia Molecular**

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

### **INTRODUÇÃO**

Todas as células dividem, diferenciam-se e morrem. A morte celular pode ocorrer por processos agressivos como a necrose ou controlados por meio da autofagia ou apoptose (GALLUZZI *et al*, 2012; KROEMER *et al*, 2005). Em mamíferos, a apoptose é controlada por enzimas denominadas caspases, já em eucariotos inferiores, como plantas, fungos e protozoários, este processo é mediado por enzimas chamadas metacaspases (CARMONA-GUTIERREZ *et al*, 2010; MOTTRAM *et al*, 2003; UREN *et al*, 2000). A diferença entre estas proteases se dá na afinidade pelo substrato, as caspases hidrolisam após resíduos de ácido aspártico, enquanto as metacaspases clivam após resíduos de arginina ou lisina na posição P<sub>1</sub> (MACHADO *et al*, 2013; VERCAMMEN *et al*, 2007). O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é o agente causador da paracoccidioidomicose, doença de grande prevalência nos países da América Latina (ARRUDA *et al*, 2015), este patógeno é capaz de codificar uma única metacaspase, o presente projeto buscou clonar esta protease para futuramente caracterizá-la bioquimicamente, o que poderá auxiliar na formulação de substratos para o controle e tratamento desta doença.

### **OBJETIVOS**

Clonar a metacaspase de *Paracoccidioides brasiliensis* (PbMCA) em sistema heterólogo de *Escherichia coli*.

### **METODOLOGIA**

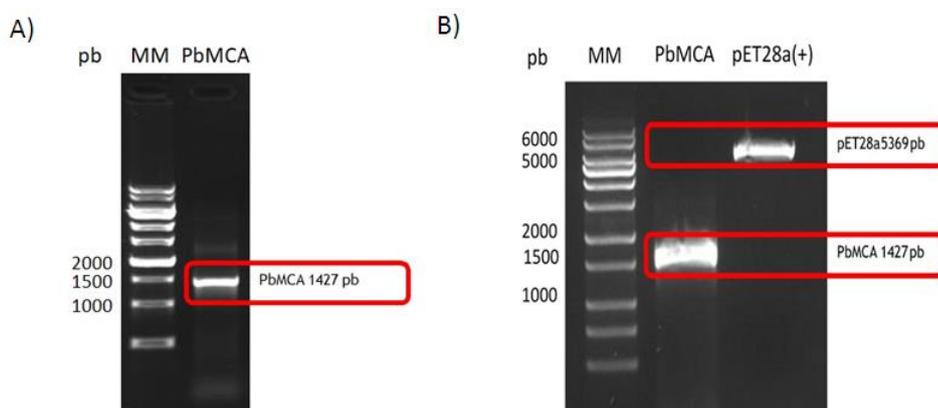
Para obtenção da proteína recombinante, o gene sintético da metacaspase de Pb foi amplificado utilizando *primers* específicos para o gene e a enzima Taq DNA polymerase (Thermo), purificado com kit (Promega) e digerido com as enzimas de restrição NheI e EcoRI, posteriormente, foi direcionalmente inserido no vetor pET-28a (+), que também foi digerido com as mesmas enzimas utilizadas na clivagem do gene. O vetor com o inserto foi por transformação com choque térmico introduzidos na bactéria competente DH5 $\alpha$ , a transformação foi confirmada por PCR de colônia, utilizando *primers* desenhados a partir da sequência do próprio vetor, denominados de *primers* T7, a averiguação da obtenção do clone sem a presença de mutação foi feita mediante sequenciamento pela técnica de Sanger. O clone foi extraído da DH5 $\alpha$  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

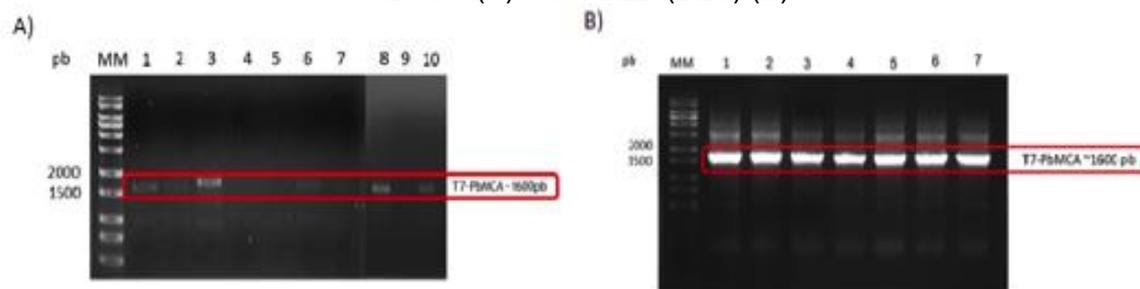
A amplificação do gene (PbMCA) e a digestão do inserto PbMCA e do vetor pET-28a (Figura 1) foi analisada por eletroforese de agarose 1%, e se mostraram positivas, com banda de ~1427 pb para amplificação e digestão da metacaspase de Pb, tamanho condizente com o gene no banco de dados GeneBank, e ~5369 pb na digestão do pET-28a, tamanho apresentado no mapa do vetor.

**Figura 1** – Eletroforese em gel de agarose da amplificação do gene PbMCA (A) e da digestão do inserto e do vetor (B)



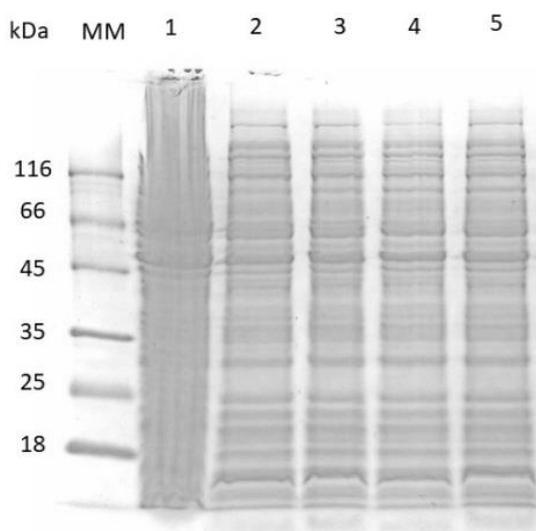
Após ligação, o DNA recombinante foi introduzido na cepa DH5 $\alpha$  e confirmado por PCR de colônia com *primers* T7 (Figura 2), a análise em gel de agarose mostrou a presença de 5 colônias positivas, extraiu-se o plasmídeo destas colônias e com este material foi realizado sequenciamento, através deste percebemos que a clonagem foi realizada sem a presença de mutações. 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 2), verificando que todas as colônias estavam positivas.

**Figura 2** – Eletroforese em gel de agarose da transformação do DNA recombinante na cepa DH5 $\alpha$  (A) e em BL21(DE3) (B)



A avaliação da expressão foi feita através de um piloto de expressão, a indução foi realizada a 20°C overnight, variando as concentrações de IPTG (0,1; 0,25 e 1 mM) a fim de encontrar a melhor condição de expressão, a avaliação do teste foi realizada mediante gel de SDS-Page (**Figura 3**), sabe-se que a PbMCA possui peso molecular de ~53 Kda, porém a imagem a imagem não permite distinguir a enzima de interesse, uma vez que o controle (BL21) está muito arrastado, ademais não há nenhuma banda na altura de 53 Kda que apresente intensidade diferenciada.

**Figura 3** - Eletroforese de SDS-Page, ensaios iniciais de expressão a 20°C, variando as concentrações de IPTG, onde 1 refere-se ao controle BL21(DE3) e 2, 3, 4, 5 diz respeito ao clone sem indução de IPTG, com 0,1 mM, 0,25 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente.



Estes resultados sugerem que a proteína entrou em corpo de inclusão, a sua aglomeração foi tão grande que ela não conseguiu penetrar na canaleta, por isso, não conseguimos distingui-la no gel. Esta aglomeração pode ser decorrente de grande quantidade de resíduos de glutamina e asparagina (Q e N) na região N-terminal (região hidrofóbica), sequências repetidas do pro-domínio de Q e N no N-terminal são responsáveis pela autoagregação proteica (WONG et al, 2012).

## CONCLUSÕES

A clonagem foi realizada com sucesso, já que o clone foi produzido sem a presença de mutações, e todas as etapas do projeto foram cumpridas dentro do prazo estipulado, porém, no piloto de expressão não foi possível observar de maneira nítida a expressão da metacaspase, sugerindo que a enzima possa estar entrando em corpo de inclusão, está hipótese é consolidada pelos artigos de Erhardt (2010) e Wong (2012) que apontam o envolvimento de muitos resíduos de glutamina e asparagina (Q e N) na região N-terminal de metacaspase para a troca conformacional proteica, deixando-a insolúvel e facilitando a formação de corpos de inclusão.

## 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.

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.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUNEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 1, p. 107-20, Jan 2012.

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.

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.

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.

## **AGRADECIMENTOS**

FAPESP, CNPq e FAEP.