**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**
**LAURA DE AZEVEDO MAFFEIS DALZOTO**

# IDENTIFICAÇÃO DE DOIS SÍTIOS CATALÍTICOS NA METACASPASE DE *Saccharomyces cerevisiae* ATRAVÉS DE MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS

Mogi das Cruzes, SP
2023

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**

**LAURA DE AZEVEDO MAFFEIS DALZOTO**

# IDENTIFICAÇÃO DE DOIS SÍTIOS CATALÍTICOS NA METACASPASE DE *Saccharomyces cerevisiae* ATRAVÉS DE MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Ferreira Marcondes Machado

Mogi das Cruzes, SP

2023

**FINANCIAMENTO**




**Ficha catalográfica**
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Dalzoto, Laura de Azevedo Maffeis
D153i Identificação de dois sítios catalíticos na metacaspase de *Saccharomyces cerevisiae* através de mutações sítio dirigidas / Laura de Azevedo Maffeis Dalzoto. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2023.
87 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Maurício Ferreira Marcondes Machado.

1.Saccharomyces cerevisiae 2. Cisteína Proteases 3. Mutação/ genética I. Machado, Maurício Ferreira Marcondes II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título.

CDD 660.6

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

Tel.: (11) 4798-7000
0800 19 2001
www.umc.br

# ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quatorze horas do dia dezesseis de fevereiro de dois mil e vinte e três, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação intitulada "IDENTIFICAÇÃO DE DOIS SÍTIOS CATALÍTICOS NA METACASPASE DE *Saccharomyces cerevisiae* ATRAVÉS DE MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS", para obtenção do grau de mestre pelo(a) candidato(a) **Laura de Azevedo Maffeis Dalzoto**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de mestre. A comissão examinadora estava constituída dos senhores professores doutores Maurício Ferreira Marcondes Machado, e Wagner Alves de Souza Júdice, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Marcelo Ferreira Marcondes Machado, da Universidade Federal de São Paulo. Sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A sessão pública da defesa da dissertação foi aberta pelo senhor presidente da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Aprovada (aprovado(a) /reprovado(a)) por Unanimidade (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 16 de fevereiro de 2023.

| Comissão Examinadora | Julgamento |
|---|---|
| Prof. Dr. Marcelo Ferreira Marcondes Machado | Aprovada (aprovado(a) / reprovado(a)) |
| Prof. Dr. Wagner Alves de Souza Júdice | Aprovada (aprovado(a) / reprovado(a)) |
| Prof. Dr. Maurício Ferreira Marcondes Machado | Aprovada (aprovado(a) / reprovado(a)) |

# AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar o meu caminho e me amparar até aqui, por me dar discernimento e paciência ao longo dessa jornada.

A minha família por sempre apoiar meus sonhos e me auxiliar na conquista dos meus objetivos, sem vocês não estaria concluindo mais essa fase na minha vida, a minha mãe, Daniela, que desde sempre esteve ao meu lado, ajudando em cada batalha, dedicando seu tempo, horas de sono, em cada detalhe para que os dias fossem mais leves, obrigada por todo amor e carinho, agradeço ao meu pai, Juliano, por ter lutado comigo em busca dos meus estudos, por me dar sabedoria e me guiar muitas vezes quando não sabia para onde prosseguir. Em especial aos meus avós, Lígia, Paulo e Julia (*in memoriam*), pela pessoa que me tornei, por todos valores passados desde pequena, vocês são parte dessa vitória.

Agradeço ao meu namorado, Willian, por me encorajar sempre e me ver de uma forma única, por ser tão dedicado a nós, você é a minha base e meu melhor amigo, sou grata pela nossa família, por tudo que estamos construindo e por realizar um dos meus maiores sonhos.

Ao meus amigos do grupo de pesquisa localizado no Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB), que ao longo dos anos se tornaram minha segunda família, a Taíz Reis, minha eterna gratidão, essa história começa com você e não tem melhor pessoa pra saber como esses anos nos fortaleceram, sou grata por ter uma amiga incrível, parceira pra todas horas, a Mariana Trujilho, minha companheira de jornada, amadurecemos juntas no percorrer desse caminho, obrigada por ser uma amiga maravilhosa e tão doce, nosso trio daqui para sempre. A Vitoria Rios, obrigada por ser como uma irmã, pelas brigas (de mentira), por tornar meus dias melhores, por todos os momentos e pelos que vierem ainda. Ao João Pedro e Ane Duarte, por serem IC's tão prestativos, atenciosos e carinhosos, vocês são sensacionais.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Maurício Machado, por me abrir portas as quais não achei que seriam alcançáveis, por todas oportunidades, por tentar oferecer o melhor para seus alunos, obrigada por me guiar nesse caminho, por acreditar e dedicar seu tempo, pela paciência em ensinar e mostrar que buscar conhecimento é essencial para nossa evolução.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Marcondes, pela colaboração neste trabalho, por nos receber em seu laboratório e pela paciência em ensinar técnicas que foram essenciais no desenvolvimento desse projeto.

A todos professores que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento ao longo dessa trajetória, em especial aos professores da Pós Graduação em Biotecnologia, por todo conhecimento fornecido para minha formação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro para a execução do presente trabalho e a Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) pelo suporte e por fornecer condições para que esse projeto fosse desenvolvido e concluído.

*“Todas as coisas que eu nunca disse, por tanto tempo, estão aqui, em meus olhos. Todos têm oceanos para sobrevoar, desde que você tenha coragem para fazer isso. É inconsequência? Talvez..., mas o que os sonhos sabem sobre limites?”*

(Amelia Earhart)

# RESUMO

As metacaspases são cisteíno-proteases pertencentes ao clã CD da família C14, e possuem características importantes, como a especificidade por clivagem após resíduos básicos (Arg/Lys), além de depender do íon cálcio para exercer sua atividade catalítica, ou seja, para estarem ativas, ao contrário do que se observa nas caspases que carecem do processo de dimerização para se tornarem ativas, já as metacaspases sofrem um autoprocessamento, primeiramente no N-terminal e posteriormente no C-terminal, tornando-se ativas. As metacaspases são definidas pela presença da subunidade grande ($P_{20}$) e subunidade pequena ($P_{10}$) e são classificadas em: tipos I, II e III. A metacaspase do tipo I possui como característica um pró-domínio no N-terminal da enzima, que antecede uma região rica em glutamina e asparagina. Na levedura *Saccharomyces* cerevisiae é encontrada uma metacaspase do tipo I, este organismo codifica uma única metacaspase, denominada como *Yeast Caspase 1* (YCA1), que vem sendo exaustivamente estudada no processo de morte celular programada por apoptose. A apoptose foi descrita inicialmente em organismos multicelulares, no entanto hoje já se sabe que as células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* exibem características apoptóticas semelhantes ao que ocorre em organismos pluricelulares. Como objetivo geral neste trabalho propomos obter por clonagem YCA1 recombinante, em sua forma íntegra e truncada, contendo mutações sítio dirigidas dos resíduos $Cys^{155}$ e $Cys^{276}$, e posteriormente expressar e purificar essas proteínas recombinantes. Os mutantes foram obtidos pela técnica de sobreposição de *primers* e clonagem pelo método *T5 exonuclease DNA assembly* (TEDA), usando como vetor de expressão o pET28(a)+. As proteínas foram expressas através da indução com isopropil-β-D-tiogalactosidase (IPTG) em sistema de *E. coli* BL21(DE3)pLysS e a purificação das amostras foi realizada em duas etapas, por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose e por cromatografia de exclusão molecular. A obtenção dos mutantes YCA1-C155A, YCA1-C276A, YCA1-C155/276A, tYCA1-C155A e tYCA1-C276A foi realizada com êxito, e foram confirmadas pela técnica de *western blotting*. Através das análises de *SDS-PAGE* dos mutantes íntegros, foi possível identificar que o resíduo $Cys^{155}$, trata-se de uma cisteína catalítica importante para a etapa de autoprocessamento da YCA1, e que isso pode estar relacionado diretamente com a localização do N-terminal da enzima. Já a análise do *SDS-PAGE* dos mutantes truncados, trouxe uma perspectiva diferente sobre o processamento da YCA1, reforçando os dados obtidos no *western blotting* das formas truncadas, que levam a hipótese de um segundo processamento intermolecular entre as metacaspases já ativas, semelhante ao que ocorre entre as caspases para gerar sua forma ativa. Demonstramos também que os processamentos que levam a geração da forma ativa da enzima ocorrem no C-terminal da proteína diferentemente do que é descrito. Em conclusão, demonstramos a presença de uma segunda cisteína catalítica na estrutura da YCA1, bem como apresentamos uma nova teoria em torno da ativação desta enzima, demonstrando processamentos antes não descrito, sendo um autoprocessamento e um processamento intermolecular.

**Palavras-chave:** Metacaspase. *Saccharomyces cerevisiae*. Mutação. Cisteína.

# ABSTRACT

Metacaspases are cysteine proteases belonging to the CD clan of the C14 family, and have important characteristics, such as cleavage specificity after basic residues (Arg/Lys), in addition to depending on the calcium ion to exert their catalytic activity, that is, to be active, contrary to what is observed in caspases that require the dimerization process to become active, metacaspases undergo self-processing, first at the N-terminus and later at the C-terminus, becoming active. Metacaspases are defined by the presence of the large subunit ($P_{20}$) and small subunit ($P_{10}$) and are classified into: types I, II and III. Type I metacaspase is characterized by a pro-domain at the N-terminus of the enzyme, which precedes a region rich in glutamine and asparagine. A type I metacaspase is found in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this organism encodes a single metacaspase, called Yeast Caspase 1 (YCA1), which has been extensively studied in the process of programmed cell death by apoptosis. Apoptosis was initially described in multicellular organisms, however it is now known that *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells exhibit apoptotic characteristics similar to what occurs in multicellular organisms. As a general objective of this work, we propose to obtain by cloning recombinant YCA1, in its full and truncated form, containing site-directed mutations of residues $Cys^{155}$ and $Cys^{276}$, and subsequently to express and purify these recombinant proteins. Mutants were obtained by overlapping primers and cloning by the T5 exonuclease DNA assembly (TEDA) method, using pET28(a)+ as an expression vector. The proteins were expressed through induction with isopropyl-β-D-thiogalactosidase (IPTG) in an E. coli BL21(DE3)pLysS system and the purification of the samples was performed in two steps, by affinity chromatography on a Ni-Sepharose column and by size exclusion chromatography. Obtaining the mutants YCA1-C155A, YCA1-C276A, YCA1-C155/276A, tYCA1-C155A and tYCA1-C276A was successfully performed, and were confirmed by the western blotting technique. Through SDS-PAGE analyzes of intact mutants, it was possible to identify that the $Cys^{155}$ residue is an important catalytic cysteine for the self-processing step of YCA1, and that this may be directly related to the location of the N-terminus of enzyme. The SDS-PAGE analysis of the truncated mutants, however, brought a different perspective on the processing of YCA1, reinforcing the data obtained in the western blotting of the truncated forms, which lead to the hypothesis of a second intermolecular processing between the already active metacaspases, similar to what occurs between caspases to generate its active form. We also demonstrate that the processes that lead to the generation of the active form of the enzyme occur at the C-terminus of the protein differently from what is described. In conclusion, we demonstrate the presence of a second catalytic cysteine in the structure of YCA1, as well as presenting a new theory around the activation of this enzyme, demonstrating previously undescribed processes, being a self-processing and an intermolecular processing.



**Keywords**: Metacaspase. *Saccharomyces cerevisiae*. Mutation. Cysteine.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** – Principais sub-tipos de morte celular regulada.....17
**Figura 2** – Via extrínseca e via intrínseca da morte celular por apoptose .....19
**Figura 3** – Representação do conceito de endopeptidase e exopeptidase .....21
**Figura 4** – Local de clivagem de substratos pelas exopeptidases e endopetidases.22
**Figura 5** – Representação da interação dos sub-sítios de uma protease.....23
**Figura 6** – Representação estrutural da papaína .....25
**Figura 7** – Representação do ataque nucleofílico de uma cisteíno-protease ao substrato peptídico.....26
**Figura 8** – Classificação das císteino-proteases em clãs e famílias.....27
**Figura 9** – Mecanismo de ativação proposto para as caspases e metacaspases....28
**Figura 10** – Comparação das caspases e metacaspases.....29
**Figura 11** – Estrutura cristalográfica da metacaspase de *Saccharomyces cerevisiae* .....30
**Figura 12** – Estruturas tridimensionais da TbMCA2 e da YCA1.....31
**Figura 13** – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de células de *Saccharomyces cerevisiae*.....32
**Figura 14** – Sequência completa do gene que codifica a metacaspase de *Saccharomyces cerevisiae* (YCA1), contendo 1299 pares de bases.....36
**Figura 15** – Mutação sítio dirigida por técnica de sobreposição de *primers*. .....39
**Figura 16** – Alinhamento da sequência da YCA1 com a sequência da TbMCA2.....50
**Figura 17** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação gerado na primeira etapa da reação de sobreposição de *primers* .....52
**Figura 18** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação da segunda etapa da reação de sobreposição de *primers*.....53
**Figura 19** – Método *T5 exonuclease DNA assembly* (TEDA).....55
**Figura 20** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação do vetor .....56
**Figura 21** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação com os *primers* TEDA.....57
**Figura 22** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação com os *primers* da região T7 .....58

**Figura 23** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação dos plasmídeos obtidos em colônias de *E. coli* DH5α .....58
**Figura 24** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação do DNA plasmidial com os *primers* da região T7 .....59
**Figura 25** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação dos plasmídeos obtidos em colônias de *E. coli* BL21(DE3)pLysS .....60
**Figura 26** – Mapa do plasmídeo, pET28(a)+, com o gene da YCA1 inserido.....61
**Figura 27** – *SDS-PAGE* da análise da expressão das proteínas YCA1 íntegras e truncadas.....62
**Figura 28** – Cromatograma da purificação da YCA1 íntegra em coluna de resina de afinidade $Ni^{2+}$-Sepharose .....64
**Figura 29** – *SDS-PAGE* das frações eluídas no cromatograma .....64
**Figura 30** – Cromatograma da dessalinização da YCA1 em coluna de exclusão molecular HiTrap .....65
**Figura 31** – *SDS-PAGE* das frações eluídas no cromatograma da dessalinização..66
**Figura 32** – *SDS-PAGE* das amostras após purificação da YCA1 íntegra e dos mutantes com concentrações padronizadas .....67
**Figura 33** – *SDS-PAGE* das amostras após purificação da YCA1 truncada e dos mutantes com concentrações padronizadas .....69
**Figura 34** – Estrutura tridimensional da YCA1 evidenciando o sítio catalítico .....70
**Figura 35** – Estrutura tridimensional da YCA1 e TbMCA2, sobrepostas, evidenciando os sítios catalíticos .....72
**Figura 36** – *Western Blotting* das formas íntegras através de reconhecimento por anticorpo primário anti-6XHis-Tag.....73
**Figura 37** – *Western Blotting* das formas truncadas através de reconhecimento por anticorpo primário anti-6XHis-Tag.....75
**Figura 38** – Modelo da reação de conversão de enzima de baixa afinidade para enzima de alta afinidade .....76

# LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – *Primers* utilizados na amplificação do gene da YCA1 para inserção da mutação pontual (em **negrito** o novo códon para troca do aminoácido e produção da mutação) .....37

**Tabela 2** – *Primers* projetados para amplificação do gene da YCA1 utilizados na reação TEDA.....37

**Tabela 3** – *Primers* projetados para amplificação do vetor pET28(a)+ utilizados na reação TEDA.....37

**Tabela 4** – *Primers* utilizados para amplificação da região T7 (promotora e terminadora) que flanqueia o gene da YCA1 .....38

**Tabela 5** – Descrição dos *primers* usados na primeira etapa para inserção da mutação .....38

**Tabela 6** – Quantidade de pares de bases aproximado dos fragmentos obtidos nas reações de PCR I (FW e RV) dos mutantes C155A, C276A e C155/276A. .....52

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| λ | Comprimento de Onda |
| AIF | Fator Indutor de Apoptose |
| AtMC9 | Metacaspase-9 de *Arabidopsis thaliana* |
| $CaCl_2$ | Cloreto de Cálcio |
| CgMCA-I | Metacaspase-I de *Candida glabrata* |
| DISC | Complexo de Sinalização Indutor de Morte |
| DMSO | Dimetil Sulfóxido |
| DO | Densidade Ótica |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| ERO'S | Espécies reativas de oxigênio |
| FADD | Domínio de Morte Associado a Fas |
| FW | *Forward* |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| HEPES | Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico |
| IPTG | Isopropil-β-D-tiogalactosidase |
| KCl | Cloreto de Potássio |
| KOH | Hidróxido de Potássio |
| LB | Luria Bertani |
| MCA | Metacaspase |
| MCR | Morte Celular Regulada |
| $MgCl_2$ | Cloreto de Magnésio |
| $MnCl_2$ | Cloreto de Manganês |
| $Na_2HPO_4$ | Fosfato de Sódio Dibásico |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NaOH | Hidróxido de Sódio |
| pb | Pares de Bases |
| PBS | Solução Salina Tamponada com Fosfato |

| | |
|---|---|
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PEG | Polietilenoglicol |
| RV | *Reverse* |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| *SDS-PAGE* | Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio |
| TAE | Tris-Acetato-EDTA |
| TbMCA2 | Metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* |
| TbMCA3 | Metacaspase-3 de *Trypanosoma brucei* |
| TbMCA4 | Metacaspase-4 de *Trypanosoma brucei* |
| TEDA | T5 *exonuclease DNA assembly* |
| TEMED | Tetrametiletilenodiamina |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| TR | Truncada |
| TRADD | Domínio de Morte Associado a Receptor TNF |
| TRIS | Tris(hidroximetil)aminometano |
| tYCA1 | YCA1 truncada |
| UV | Ultravioleta |
| WT | *Wild Type* |
| YCA1 | *Yeast Caspase 1* |

# ABREVIAÇÕES DOS AMINOÁCIDOS

| NOME DOS AMINOÁCIDOS | 3 LETRAS | 1 LETRA |
|---|---|---|
| Ácido aspártico | Asp | D |
| Ácido glutâmico | Glu | E |
| Alanina | Ala | A |
| Arginina | Arg | R |
| Asparagina | Asn | N |
| Cisteína | Cys | C |
| Fenilalanina | Phe | F |
| Glicina | Gly | G |
| Glutamina | Gln | Q |
| Histidina | His | H |
| Isoleucina | Ile | I |
| Leucina | Leu | L |
| Lisina | Lys | K |
| Metionina | Met | M |
| Prolina | Pro | P |
| Serina | Ser | S |
| Tirosina | Tyr | Y |
| Treonina | Thr | T |
| Triptofano | Trp | W |
| Valina | Val | V |

## SUMÁRIO


**1 INTRODUÇÃO ..... 16**

**1.1 APOPTOSE ..... 17**

**1.2 PROTEASES ..... 20**

**1.2.1 Classificação das proteases ..... 21**

**1.2.2 Cisteíno-proteases ..... 24**

**1.3 METACASPASE ..... 27**

**1.5 *Saccharomyces cerevisiae* ..... 32**

**1.5.1 Modelo de Estudos e Aplicações Tecnológicas ..... 33**

**2 OBJETIVO ..... 35**

**2.1 OBJETIVO GERAL ..... 35**

**2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 35**

**3 MATERIAIS E MÉTODOS ..... 36**

**3.1 ETAPAS DE AMPLIFICAÇÕES ..... 36**

**3.1.1 Desenvolvimento da sequência dos *primers* ..... 36**

**3.1.2 DNA molde ..... 38**

**3.1.3 Amplificação para inserção da mutação no DNA codificante da YCA1 usando a reação de extensão de sobreposição de *primer* ..... 38**

**3.1.4 Amplificação do plasmídeo pET28(a)+ com os *primers* do TEDA ..... 40**

**3.2 PREPARAÇÃO DAS BACTÉRIAS *Escherichia coli* DH5α E BL21(DE3)pLysS COMPETENTES PARA TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO ..... 41**

**3.3 PROCEDIMENTO DE MONTAGEM DE DNA COM T5 EXONUCLEASE ..... 42**

**3.3.1 Triagem das colônias positivas ..... 43**

**3.4 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL POR MINIPREP PELO MÉTODO DE LISE ALCALINA E CONFIRMAÇÃO DA INTEGRIDADE DO PLASMIDEO ..... 44**

**3.5 TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS DE *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS COM O PRODUTO DA MINIPREP ..... 44**

**3.6 ENSAIOS PARA EXPRESSÃO DOS MUTANTES DA YCA1 RECOMBINANTE ÍNTEGRA E TRUNCADA ..... 45**

**3.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (*SDS-PAGE*) ..... 45**

**3.8 LISE CELULAR DAS EXPRESSÕES ..... 46**

**3.9 PURIFICAÇÃO DOS MUTANTES DA YCA1 ..... 46**
**3.10 *WESTERN BLOTTING* ..... 47**
**3.11 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA ..... 48**
**4 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 49**
**4.1 MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS ..... 49**
**4.2 CLONAGEM COM T5 EXONUCLEASE (TEDA) ..... 54**
**4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ..... 60**
**4.4 *WESTERN BLOTTING* DE CONFIRMAÇÃO DAS PROTEÍNAS ..... 73**
**5 CONCLUSÃO ..... 77**
**REFERÊNCIAS ..... 79**

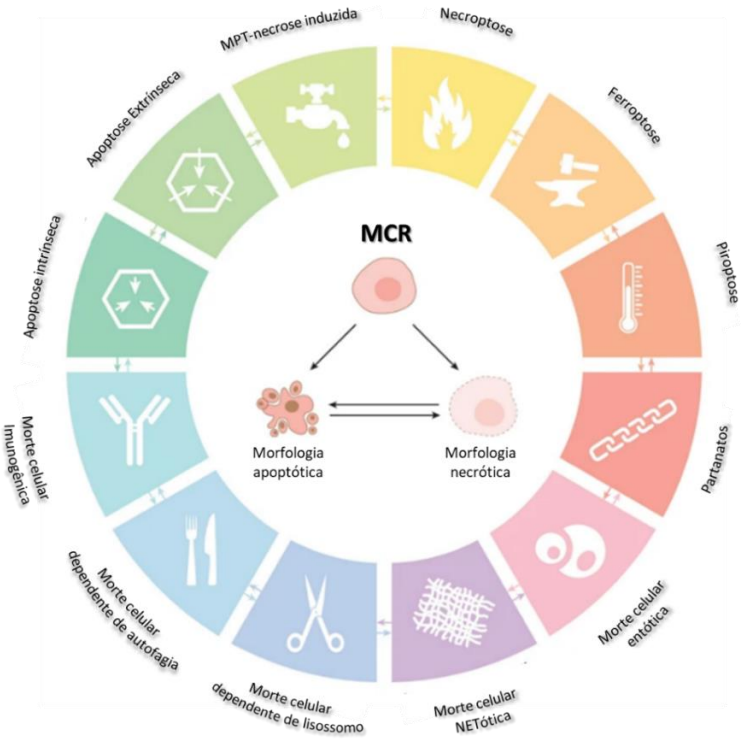
# 1 INTRODUÇÃO

A morte celular é um mecanismo mediado por uma série de eventos moleculares e bioquímicos, e tem como principal função manter a homeostase de um organismo. Ocorre quando a célula é exposta a uma condição desfavorável no seu microambiente intracelular ou extracelular como, por exemplo o envelhecimento da célula ou a exposição a agentes tóxicos, respectivamente, de forma irreversível ocorre a ativação de uma cascata de transdução de sinais que levam a morte da célula. Acreditava-se que a morte celular era um processo que ocorria apenas de duas formas, sendo ela programada ou descontrolada, entretanto, ao longo do tempo, descobriu-se outras vias que podem desencadear a morte de uma célula (MADEO *et al.*, 2002a; GALLUZZI, *et al.* 2018; YAN; ELBADAWI; EFFERTH, 2020).

A classificação dos tipos de morte celular baseava-se nas alterações morfológicas que ocorriam durante o evento, sendo tipo I (apoptose), tipo II (autofagia) e tipo III (necrose). No entanto, por meio das descobertas de outras vias, surgiu-se a necessidade de classificar o tipo de morte celular de acordo com outros parâmetros, além das características morfológicas, tais como os mecanismos bioquímicos, a ativação de proteínas específicas e a liberação de mediadores (GIAMPIETRI; PAONE; D'ALESSIO, 2014; GALLUZZI, *et al.* 2018; D'ARCY, 2019) .

Dessa forma, temos atualmente dois grandes grupos para classificar os tipos de morte, a saber, a morte celular acidental e a morte celular regulada. Tal nomenclatura é decorrente, como já descrito, da necessidade de um novo tipo de classificação em decorrência do avanço dos estudos e a progressão de descobertas de novas vias de sinalização que levam a morte celular. A MCR abrange vários tipos de morte celular que podem apresentar morfologia necrótica e/ou apoptótica (Figura 1), entretanto cada uma com seu mecanismo molecular e particularidade. A classificação atual abrange os sub-tipos de morte: necroptose, ferroptose, piroptose, partanatos, morte celular entótica, morte celular NETótica, morte celular dependente de lisossomo, morte celular dependente de autofagia, morte celular imunogênica, apoptose intrínseca, apoptose extrínseca e necrose induzida por transição de permeabilidade mitocondrial (MPT – *Mitochondrial Permeability Transition*). Dentre os sub-tipos de morte regulada apresentados a apoptose é a principal via discutida na literatura (GALLUZZI, *et al.* 2018; D'ARCY, 2019).

**Figura 1** – Principais sub-tipos de morte celular regulada




Fonte: Galluzzi *et al.* (2018, p. 488 – com adaptação)
Classificação dos tipos de Morte Celular Regulada que podem apresentar morfologia apoptótica e/ou morfologia necrótica.

## 1.1 APOPTOSE

A apoptose é um tipo de morte celular programada que desempenha um papel crucial na embriogênese, renovação tecidual, desenvolvimento imunológico, controle de desenvolvimento do câncer e em outros processos biológicos que necessitam da eliminação de células a fim de garantir a sobrevida ou o desenvolvimento de uma população celular (YAN; ELBADAWI; EFFERTH, 2020; OBENG, 2021).

Em 1972, o termo apoptose foi proposto pelos cientistas John F. R. Kerr, Andrew H. Wyllie e Alastair R. Currie, da Universidade de Edimburgo, para descrever a morte fisiológica das células. Os cientistas observaram que, durante o processo de apoptose, a célula passa por alterações morfológicas bem definidas e altamente reguladas (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Inicialmente, observa-se diminuição no volume celular, que é seguido de condensação da cromatina (picnose). Devido ao encolhimento celular, as células ficam menores, o citoplasma fica mais denso e as organelas mais compactadas. Estas alterações

iniciais resultam no colapso celular, com a formação dos chamados corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados para que não causem inflamação no tecido, assim como ocorre na morte celular por necrose (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972).

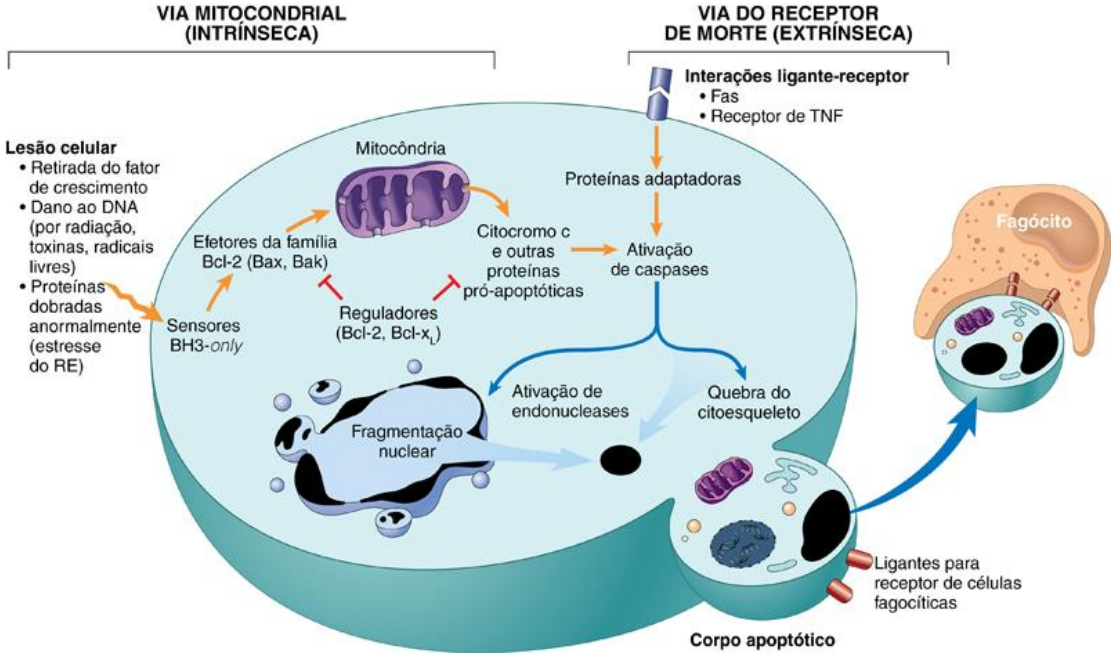
A apoptose foi descrita inicialmente em organismos multicelulares (SILVA *et al.*, 2005; EISENBERG *et al.*, 2010) e acreditava-se que era um evento exclusivo desse grupo de seres vivos (CARMONA-GUTIERREZ *et al.*, 2018). Entretanto, em 1997, foi relatado por Madeo *et al.* uma forma de morte celular com características apoptóticas em organismo unicelular e, desde então, a apoptose em levedura tem sido alvo de estudos (MADEO *et al.*, 1997). Semelhante ao que ocorre em mamíferos, as células de levedura *S. cerevisiae* exibem características apoptóticas como a condensação da cromatina, a ruptura do DNA, a externalização da fosfatidilserina para o folheto externo da membrana plasmática, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e a liberação de fatores pró-morte como, por exemplo, o citocromo *c* (MADEO *et al.*, 1999; MADEO *et al.*, 2002b). As características apoptóticas observadas em *S. cerevisiae* também foram descritas, em 2019, para *Candida albicans* (LI *et al.*, 2019).

São descritas duas principais vias que desencadeiam a morte celular por apoptose: a via mitocondrial (intrínseca) e a via dependente do receptor de morte (extrínseca) (FLEISHER, 1997). A morte celular por apoptose através da via intrínseca, também conhecida como a via mitocondrial, envolve uma série de eventos bioquímicos. Esse tipo de morte é desencadeado por perturbações na homeostase, como exemplo, dano ao DNA, retirada do fator de crescimento, sobrecarga de ERO’s, exposição a toxinas, entre outros. Essa via é dependente da liberação de fatores pró-apoptóticos e antiapoptóticos que regulam a permeabilização da membrana externa da mitocôndria. A liberação dos fatores é controlada pelas proteínas da família Bcl-2 (D’ARCY, 2019; YAN; ELBADAWI; EFFERTH, 2020; OBENG, 2021).

A liberação desses fatores pró-morte levam a formação de poros na membrana mitocondrial, causando a sua ruptura e a exposição de proteínas apoptóticas e tóxicas como citocromo c, Smac/DIABLO, endonuclease G, Omi/HtrA2, fator indutor de apoptose (AIF – *Apoptosis Inducing Factor*), entre outras, desencadeando assim o processo de apoptose. Uma vez no citoplasma, essas proteínas apoptóticas são capazes de ativar a caspase 9, que, por sua vez, ativa a caspase-3 executora, induzindo a cascata de caspases e, por fim, a apoptose completa da célula (Figura 2) (GREEN; KROEMER, 2004; GALLUZZI *et al.*, 2018; NAGATA, 2018; D’ARCY, 2019).

Já a via extrínseca da morte celular por apoptose é caracterizada pela interação de ligantes específicos com receptores de morte transmembrana encontrados na superfície da célula, por isso sendo conhecida também como a via dependente de receptor de morte (Figura 2) (D'ARCY, 2019; YAN; ELBADAWI; EFFERTH, 2020).

**Figura 2** – Via extrínseca e via intrínseca da morte celular por apoptose




Fonte: Kumar, Abbas e Aster (2018, p. 39)
Ambas as vias de morte por apoptose, extrínseca e intrínseca, culminam na ativação da cascata de caspases, entretanto a indução é diferente em cada uma. Na via intrínseca, ou via mitocondrial, é ativada por algum tipo de lesão celular que desencadeia proteínas da família Bcl-2, iniciando com a ativação de moléculas pró-apoptóticas pela proteína BH3, a deficiência de proteínas reguladoras (antiapoptóticas) faz com que a membrana mitocondrial fique permeável a substâncias, como o citocromo c, que ao adentrar o citosol faz a ativação de caspases. Já a via extrínseca, ou via do receptor de morte, é caracterizada pela formação de um "complexo de sinalização indutor da morte" que é formado pela ligação de um ligante ao receptor, esse complexo ativa caspases e resulta na morte por apoptose, assim como na outra via.

Os receptores de morte são membros da superfamília de fator de necrose tumoral (TNF – *Tumor Necrosis Factor*). Os receptores e seus ligantes que melhor caracterizam a via extrínseca da apoptose são os modelos FasR/FasL e TNFR1/TNFα (AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999; GALLUZZI *et al.*, 2018). Quando ocorre a ligação dos receptores Fas e TNF com o seu ligante em específico, tem-se a liberação de proteínas adaptadoras: domínio de morte associado à Fas (FADD – *Fas Associated Death Domain*) e domínio de morte associado a receptor TNF (TRADD – *TNF Associadted Death Domain*). Ambas proteínas adaptadoras aderidas ao receptor de morte associam-se a pró-caspase 8, fazendo com que ocorra a formação de um

complexo de sinalização indutora de morte (DISC – *Death Inducing Signaling Complex*) que resultará na ativação da pró-caspase 8 e desencadeará a cascata de caspases para que ocorra a morte da célula (GALLUZZI *et al.*, 2018; NAGATA, 2018; D'ARCY, 2019; OBENG, 2021).

## 1.2 PROTEASES

Também conhecidas como peptidases, proteinases ou enzimas proteolíticas, as proteases são definidas como um grupo de enzimas cuja função catalítica é hidrolisar ligações peptídicas entre aminoácidos, que juntos formam uma proteína. (HOOPER, 2002; CASTRO *et al.*, 2011). As proteases são encontradas em quase todos os organismos, englobando inclusive os vírus e fazem parte do grupo das hidrolases. Elas são altamente especializadas e possuem especificidade pelo substrato, o que determina crucialmente sua função, sendo essenciais para o desenvolvimento celular (RANI; RANA; DATT, 2012; SALVESEN; HEMPEL; COLL, 2016).

As proteases participam ativamente de inúmeras vias e processos biológicos, que vão além da liberação de pequenos peptídeos e aminoácidos gerados na hidrólise das ligações peptídicas (RANI; RANA; DATT, 2012; SALVESEN; HEMPEL; COLL, 2016). Essas moléculas tem papel importante em diversos mecanismos biológicos como na via de coagulação sanguínea, via do sistema complemento, regulação do ciclo celular e nas vias de apoptose, além de participar do metabolismo, no transporte de proteínas secretoras através das membranas e possuírem a capacidade de realizar modificações e ativar proteínas por clivagem expressas como zimogênios (RANI; RANA; DATT, 2012; CHAKRABARTY *et al.*, 2019).

Geralmente as proteases são expressas na forma inativa (zimogênios) e, por isso, necessitam passar por uma etapa de ativação, que geralmente consiste em uma clivagem proteolítica com a finalidade de remover ou fazer um rearranjo de uma região da proteína que bloqueia o acesso ao sítio ativo. A atividade das proteases é altamente regulada, pois a falha pode levar a uma série de doenças, como por exemplo o desenvolvimento do câncer e a neurodegeneração (CHAKRABARTY *et al.*, 2019).

Estudos envolvendo proteases são importantes devidos a sua ampla aplicação como reagentes laboratoriais, clínicos e industriais, tanto quanto sua aplicação em

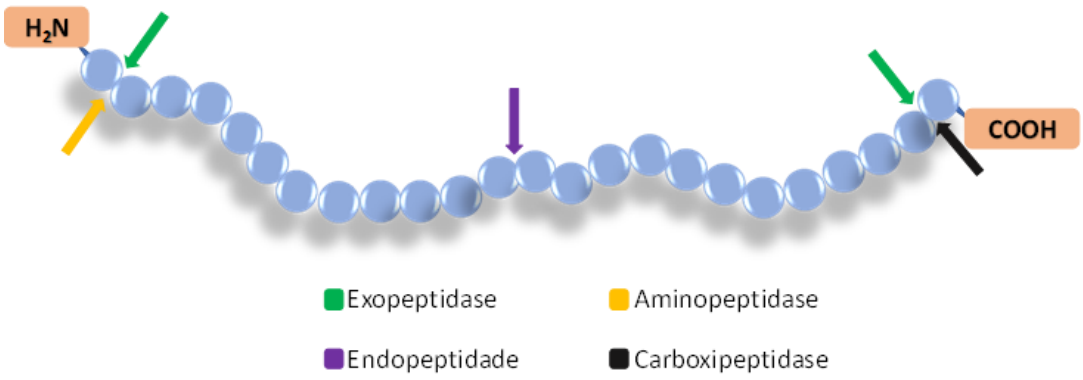
terapias médicas. A investigação da sua interação com substratos e inibidores auxilia no desenvolvimento de agentes terapêuticos na área farmacêutica (MÓTYÁN; TÓTH; TÖZSÉR, 2013). Assim, por possuírem uma vasta diversidade em relação a processos fisiológicos e por serem empregadas na área biotecnológica, os estudos em torno das proteases atraem muita atenção na tentativa de explorar suas inúmeras aplicações e aprofundar o entendimento no que tange estrutura e função (RANI; RANA; DATT, 2012).

### 1.2.1 Classificação das proteases

As proteases podem ser classificadas tendo como base o local de clivagem da ligação peptídica, a partir do seu mecanismo catalítico (natureza química do resíduo do sítio ativo) e por sua similaridade estrutural (HOOPER, 2002; RANI; RANA; DATT, 2012).

No que se refere ao local de clivagem das proteases, estas podem ser classificadas em endopeptidases ou exopeptidases, assumido como base o local de clivagem no substrato (Figura 3) (BARRETT, 1994). As exopeptidases clivam seus substratos a partir da hidrólise nas extremidades do polipeptídeo, nas porções amino-terminal (N-terminal) ou carboxi-terminal (C-terminal), sendo então denominadas como aminopeptidases e carboxipeptidases, respectivamente, de acordo com o local de ação (BARRETT, 1994; HOOPER, 2002; RANI; RANA; DATT, 2012).

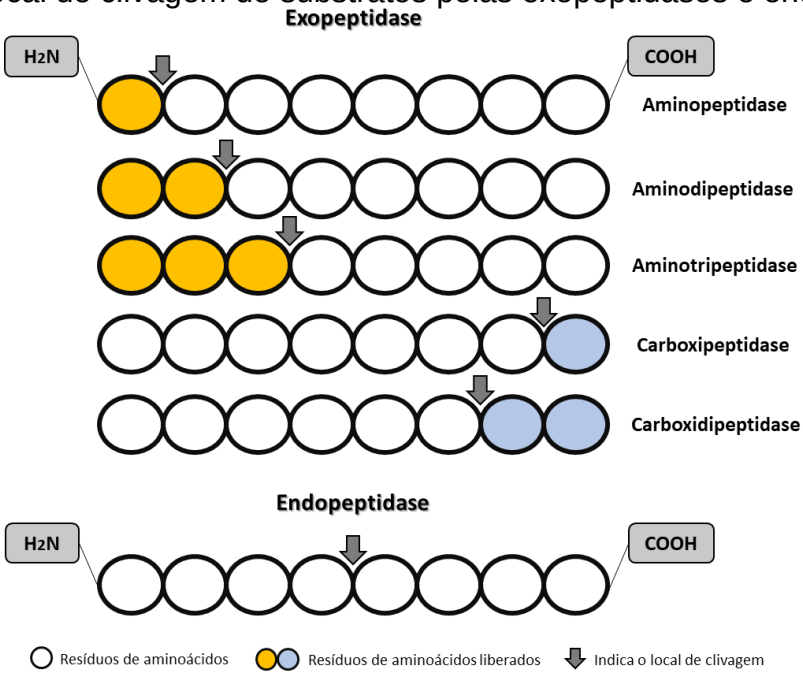
**Figura 3** – Representação do conceito de endopeptidase e exopeptidase




Fonte: Ceuleers *et al.* (2016, p. 10278 – com adaptação)
Demonstração ilustrativa de uma proteína, em azul, onde cada circulo representa um aminoácido. As setas demonstram os locais de clivagem pelos diferentes tipos de protease. Porção aminoterminal ($H_2N$) e porção carboxiterminal (COOH).

As aminopeptidases atuam no N-terminal e, após a hidrólise, podem liberar um resíduo de aminoácido (aminopeptidase), um dipeptídeo (aminodipeptidase) ou um tripeptídeo (aminotripeptidase). Já as carboxipeptidases agem no C-terminal e liberam, após a hidrólise, um único resíduo de aminoácido (carboxipeptidase) ou um dipeptídeo (carboxidipeptidase) (Figura 4). As carboxipeptidases ainda podem ser classificadas de acordo com o resíduo presente no sítio ativo da enzima, como por exemplo, se uma cisteína compõem o sítio ativo é denominado como cisteína-carboxipeptidase (BARRETT, 1994; RANI; RANA; DATT, 2012).

**Figura 4** – Local de clivagem de substratos pelas exopeptidases e endopetidases




Fonte: Mahajan e Badgujar (2010, p. 2056 – com adaptação)

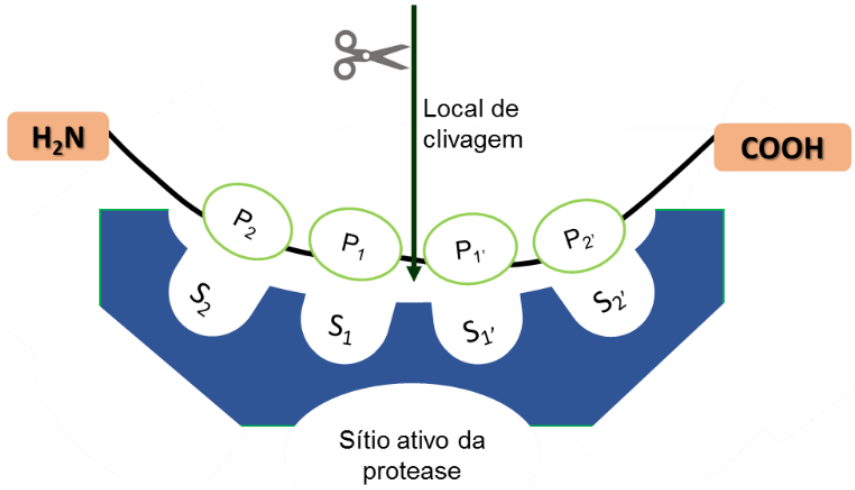
As endopeptidases são classificadas como as proteases que atuam clivando as ligações peptídicas nas regiões internas da cadeia do polipeptídeo, afastadas das extremidades terminais (Figura 4) e são divididas em subgrupos de acordo com seu mecanismo (BARRETT, 1994; RANI; RANA; DATT, 2012). Nos subgrupos das endopeptidases temos as oligopeptidases que se encaixam nessa classificação, agindo na clivagem de pequenos substratos menores que proteínas (BARRETT, 1994).

O sítio ativo da protease, ou também conhecido como sítio catalítico, é o local na estrutura tridimensional da proteína onde o substrato se ligará para que ocorra a hidrólise. Essa região é dividida em diferentes sub-sítios com alto grau de

especificidade para os resíduos de aminoácidos que compõem os substratos. Uma nomenclatura foi proposta por Schechter e Berger (1967) para classificar os sub-sítios das proteases de acordo com o local de clivagem e das extremidades separadas. Sendo assim denotou-se P (de peptídeo) para os resíduos de aminoácidos do substrato e S para o sub-sítios do sítio ativo da protease (HOOPER, 2002).

A numeração é determinada de dentro para fora, e os aminoácidos hidrolisados a partir do sítio catalítico em direção ao N-terminal são denominados como $P_1$, $P_2$, $P_3$, etc., e os sub-sítios que interagem com esses resíduos de aminoácidos são nomeados como $S_1$, $S_2$, $S_3$, etc. Os aminoácidos hidrolisados a partir do sítio catalítico em direção ao C-terminal são denominados como $P_1$', $P_2$', $P_3$', etc., e os sub-sítios que interagem com esses resíduos de aminoácidos são nomeados como $S_1$', $S_2$', $S_3$', etc. (Figura 5) (SCHECHTER; BERGER, 1967; HOOPER, 2002; CHAKRABARTY *et al.*, 2019).

**Figura 5** – Representação da interação dos sub-sítios de uma protease




Fonte: Schechter e Berger (1967, p. 157 – com adaptação)
Em azul é representado os sub-sítios de uma protease interagindo com os aminoácidos do substrato, representado pelos círculos verdes. Porção aminoterminal ($H_2N$) e porção carboxiterminal (COOH).

A hidrolise da ligação peptídica ocorre entre $P_1$ e $P_1$', e essa pode ser denominada como ligação cindível. Para que ocorra a hidrólise da ligação peptídica é necessário que os sub-sítios tenham interação com substrato, por exemplo $P_1$ tem que interagir com $S_1$ para que ocorra a hidrolise após $P_1$' que por sua vez também necessita interagir com $S_1$', entretanto os sub-sítios interagem de formas diferentes com os aminoácidos de cada substrato, fazendo assim com que apresentem especificidade ao substrato para realizar a clivagem (HOOPER, 2002).

Com o avanço dos estudos em torno das proteases, foi observando-se a necessidade de classificá-las de uma forma mais detalhada e, em 1993, Rawlings e Barrett estabeleceram um sistema para classificação das proteases de acordo com os resíduos que compõem seu sítio ativo, onde são distribuídas em famílias e clãs. No banco de dados MEROPS (https://www.ebi.ac.uk/merops/) encontram-se as informações sobre a classificação das proteases. Primeiramente são categorizadas através do resíduo presente no sítio ativo, posteriormente sendo agrupadas em famílias que possuem relação em suas sequências. Então, as famílias são classificadas em clãs que tem como base evidências relacionadas à estrutura da enzima, como por exemplo, a disposição dos aminoácidos catalíticos na proteína, a sua estrutura terciária e a semelhança dos aminoácidos no sítio catalítico (RAWLINGS; BARRETT, 1993; HOOPER, 2002; MÓTYÁN; TÓTH; TÖZSÉR, 2013; RAWLINGS; BARRETT; FINN, 2016).

A classificação das proteases pode ser baseada no resíduo catalítico presente no sítio ativo da proteína, responsável por realizar o ataque nucleofílico no substrato, que é a primeira parte da reação de proteólise. Com base nisso e de acordo com o banco de dados MEROPS existem diversas classes de proteases como as cisteíno-proteases, serino-proteases, treonil-proteases, aspartil-proteases, metalo-proteases, glutamato-proteases, e outras que possuem o sítio catalítico desconhecido ou que possuem mais de um sítio ativo (RAWLINGS, 2009; RAWLINGS *et al.*, 2018; CHAKRABARTY *et al.*, 2019).

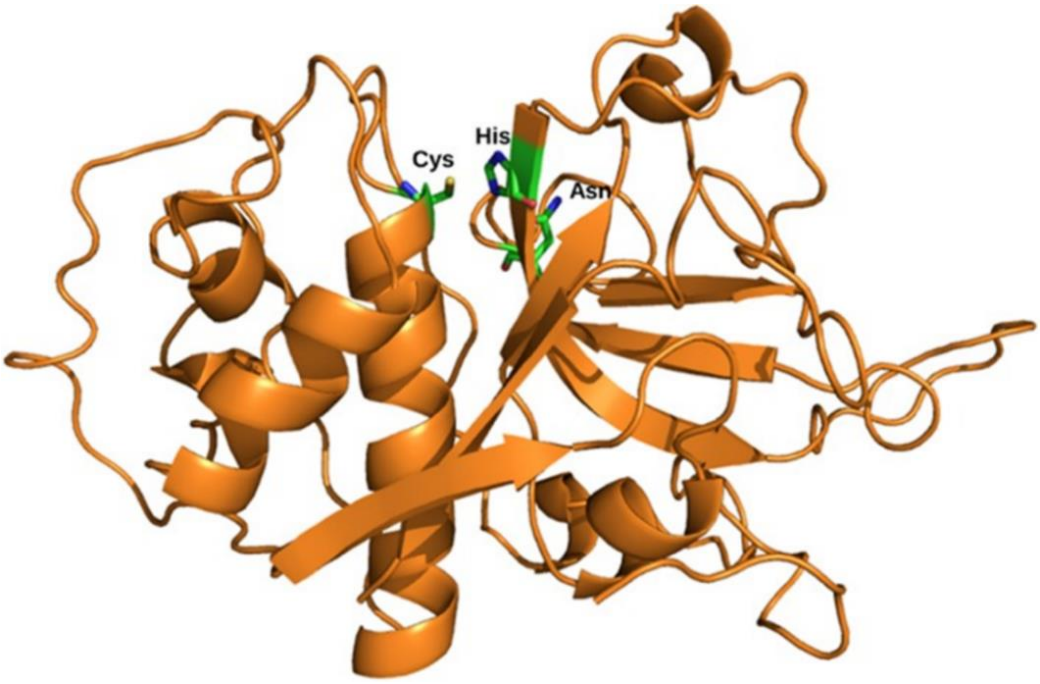
### 1.2.2 Cisteíno-proteases

As cisteíno-proteases são uma classe de enzimas envolvidas em múltiplas funções biológicas, como na morte celular programada, e por tal circunstâncias são muito importantes para estudo na área farmacêutica, visando a descoberta de moléculas com potencial farmacológico destinadas ao tratamento de doenças que levam ao desenvolvimento de quadros graves, como o câncer, doenças causadas por protozoários, como a malária, doenças causadas por fungos, como a candidíase, entre outras que podem ser altamente prejudiciais ao homem (HOOPER, 2002; RANI; RANA; DATT, 2012; VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016). Essa classe de proteases são encontradas em todos organismos vivos, tanto em eucariotos quanto em procariotos, mais recentemente sendo evidenciadas em vários tipos de vírus, como no SARS-CoV-

2, o vírus causador da pandemia do coronavírus 2019 (COVID-19) (RANI; RANA; DATT, 2012; GAO *et al.*, 2021).

Em 1937, foi extraída da *Carica papaya* (mamão) a primeira císteino-protease identificada e caracterizada, denominada papaína (VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016). Após anos sua estrutura tridimensional foi elucidada por Drenth *et al.* (1968) e, a partir disso, foi possível determinar os resíduos presentes no seu sítio ativo o qual é constituído por Cisteína-Histidina-Asparagina (Cys-His-Asn) e que juntos formam uma tríade catalítica (Figura 6). A papaína serviu como modelo para estudo bioquímicos e moleculares da classe das cisteíno-proteases, sendo a enzima mais conhecida dentre todas as enzimas dessa classe (RANI; RANA; DATT, 2012; VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016).

**Figura 6** – Representação estrutural da papaína



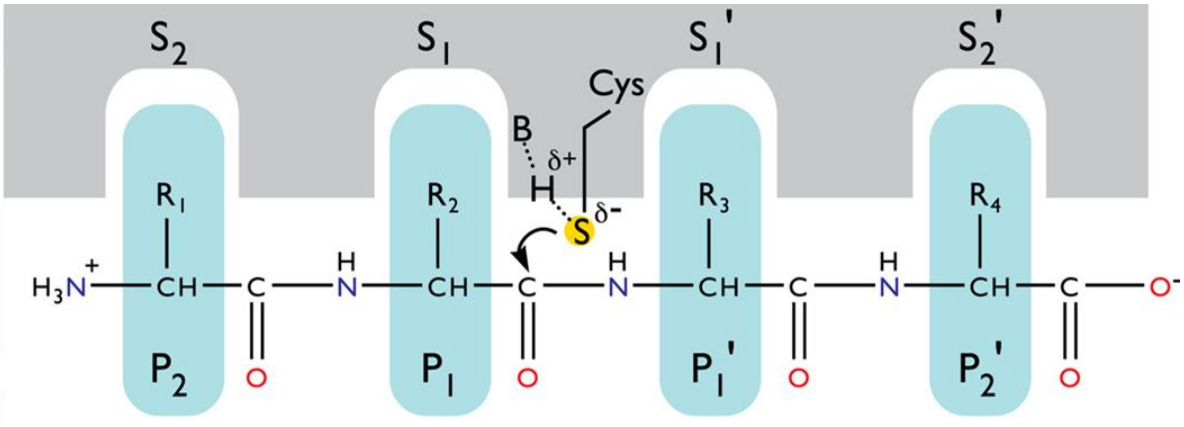

Fonte: Verma, Dixit e Pandey (2016, p. 3)
Estrutura tridimensional da papaína, uma cisteíno-protease. Em verde são evidenciados os resíduos do seu sítio ativo constituído por $Cys^{25}$, $His^{159}$ e $Asn^{175}$

A atividade de todas as cisteíno-proteases é dependente de uma díade catalítica formada por histidina e cisteína (His-Cys). A variação da presença ou ausência de um terceiro aminoácido serve para auxiliar no direcionamento e estabilização do anel imidazólico da histidina no momento da hidrólise, resultando assim na formação de uma tríade catalítica como demonstrado pela presença do

resíduo de asparagina no sítio ativo da papaína (OTTO; SCHIRMEISTER, 1997; CASTRO *et al.*, 2011).

A reação de hidrólise é mediada por um ataque nucleofílico realizado pela cisteína catalítica na carbonila da ligação peptídica do substrato, e o anel imidazólico do resíduo de histidina é importante nesse ataque pois atua aumentando a nucleofilicidade do resíduo de cisteína através da doação de prótons (Figura 7). É formado o primeiro intermediário tetraédrico tioéster após o ataque nucleofílico da cisteína ao carbono reativo, liberando como fragmento o N-terminal do substrato. A estabilização desse intermediário é feita por ligações de hidrogênio entre o substrato e um resíduo de glutamina altamente conservado. Após estabilização, a ligação tioéster é hidrolisada para a liberação de um ácido carboxílico a partir do substrato restante (OTTO; SCHIRMEISTER, 1997; CASTRO *et al.*, 2011; VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016).

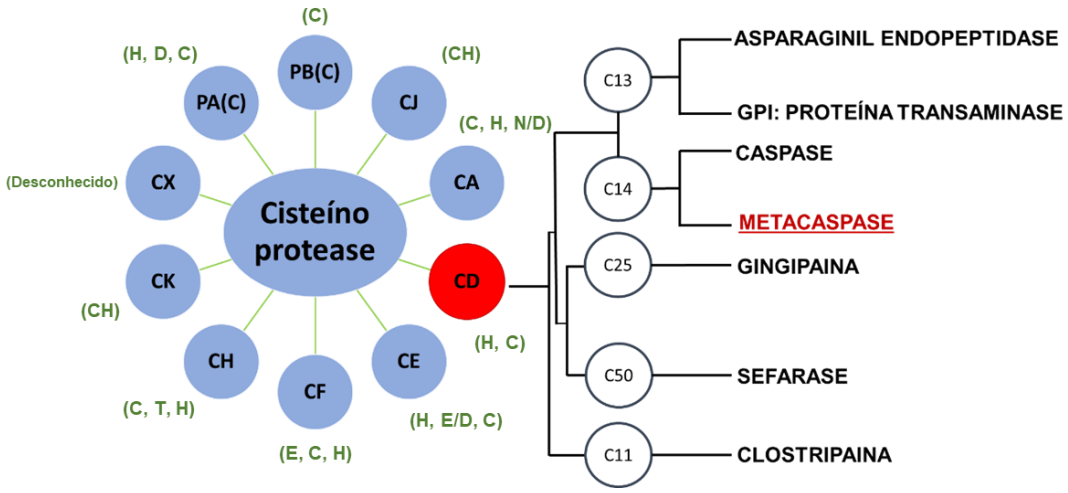
**Figura 7** – Representação do ataque nucleofílico de uma cisteíno-protease ao substrato peptídico




Fonte: Atkinson, Babbitt e Sajid (2009, p. 21)
Representação ilustrativa do sítio ativo de uma protease, demonstrando a ligação de um substrato peptídico ao sub-sítio da cisteíno-protease, essa ligação gera um ataque nucleofílico que posiciona o enxofre da cisteína (S) próximo a carbonila da ligação peptídica que será clivada. O enxofre da cisteína do sítio ativo é particularmente nucleofílico devido à presença de uma base química indispensável (B), como a histidina, que atua realizando a doação de prótons.

Com base na classificação atual do banco de dados MEROPS, existem mais de 10 clãs na classe das cisteíno-proteases que são divididos com base na estrutura terciária das famílias que os compõem, e mais de 50 famílias divididas entre esses, classificadas com base na sua similaridade estrutural (Figura 8) (RAWLINGS *et al.*, 2018).

**Figura 8** – Classificação das císteino-proteases em clãs e famílias




Fonte: Mottram *et al.* (2003, p. 182 – com adaptação)
Representação dos clãs, em azul, que compõem a classe de proteases que possuem como resíduo de catálise a cisteína nas cisteíno-proteases. Em verde, as letras representam os aminoácidos que junto a cisteína (C) são importantes para a catálise, como (D) ácido aspártico, (E) ácido glutâmico, (H) histidina, (N) asparagina, (T) treonina. Em vermelho, está o clã CD que possui a díade catalítica (His/Cys), e as famílias que o compõem. Em destaque, dentro da família C14, encontram-se as caspases e metacaspases.

A família C14 do clã CD das cisteíno-proteases reúne um determinado grupo de enzimas de grande interesse que estão envolvidas na morte celular programada. São elas, as caspases, metacaspases e paracaspases (MININA *et al.*, 2017). O clã CD envolve as proteases dependente de cisteína com uma única dobra nas folhas α e β, que consiste em uma subunidade grande ($P_{20}$) contendo a díade catalítica de Histidina/Cisteína (His/Cys) e a subunidade pequena ($P_{10}$). As proteases da família C14, como as metacaspases, vêm sendo estudadas intensamente por estarem relacionadas no controle de funções celulares como o ciclo celular e o controle do envelhecimento (TSIATSIANI *et al.*, 2011; MININA *et al.*, 2017).

## 1.3 METACASPASE

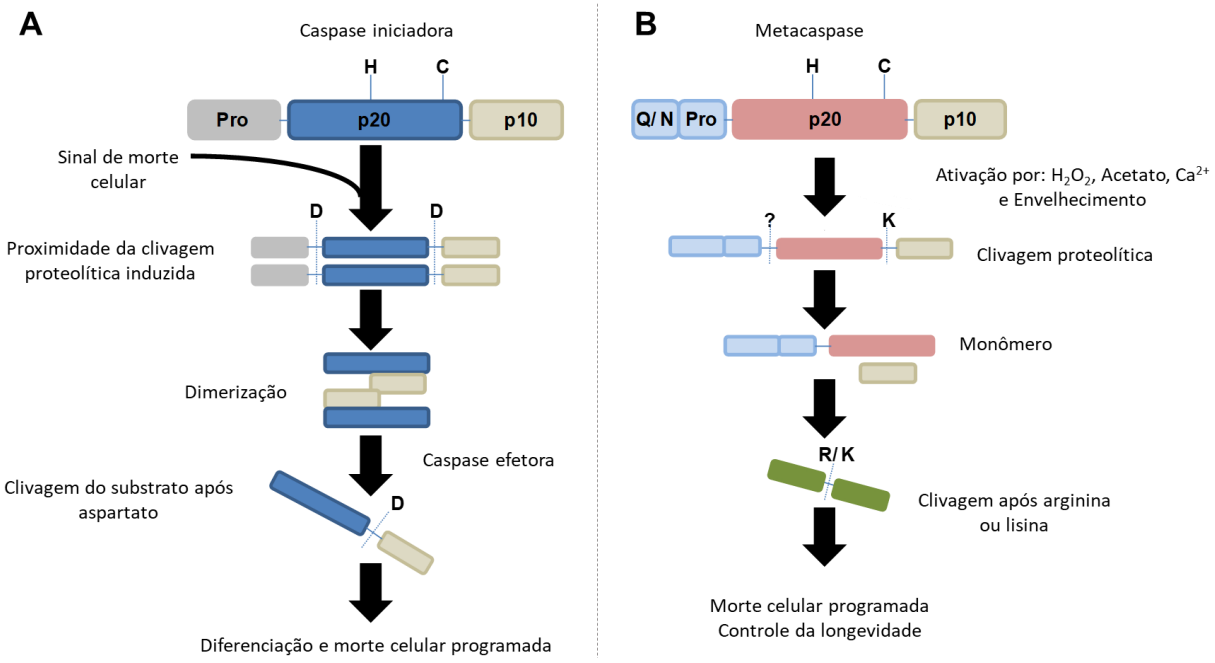
Uma cisteíno-protease com similaridade estrutural às caspases de mamíferos foi identificada em células eucariotas simples por Uren *et al.* (2000) utilizando-se de ferramentas de bioinformática. A metacaspase, como passou a ser chamada, foi então identificada em plantas, fungos e protozoários, mas notou-se sua ausência em mamíferos (UREN *et al.*, 2000).

As caspases são sintetizadas como zimogênios e possuem uma díade catalítica His/Cys (H e C), assim como as metacaspases. São compostas por um pró-

domínio que antecede as duas subunidades $P_{20}$ (grande) e $P_{10}$ (pequena), e tornam-se enzimaticamente ativas após sofrerem um clivagem proteolítica após dois resíduos de ácido aspártico (D). Após essa clivagem, ocorre a dimerização das duas subunidades tanto $P_{20}$ quanto $P_{10}$, resultando na chamada caspase efetora (Figura 8) (UREN *et al.*, 2000; HILL; NYSTRÖM, 2015; KLEMENČIČ; FUNK, 2019).

As metacaspases, diferentemente das caspases, podem ter a presença ou não de um pró-domínio rico em prolina e/ou de uma região rica em glutaminas e asparaginas, não sendo necessário passar pelo processo de dimerização para estarem ativas, pois são ativas na forma monomérica, entretanto carecem da presença do íon cálcio, que possui papel de cofator, para o desempenho de sua atividade (HILL; NYSTRÖM, 2015; KLEMENČIČ; FUNK, 2019). Diferente das caspases que clivam substratos após um resíduo de ácido aspártico, as metacaspases clivam seus substratos após resíduos básicos de arginina ou lisina na posição $P_1$, como demonstrado na Figura 9 (VERCAMMEN *et al.,* 2004; MACHADO *et al.,* 2013).

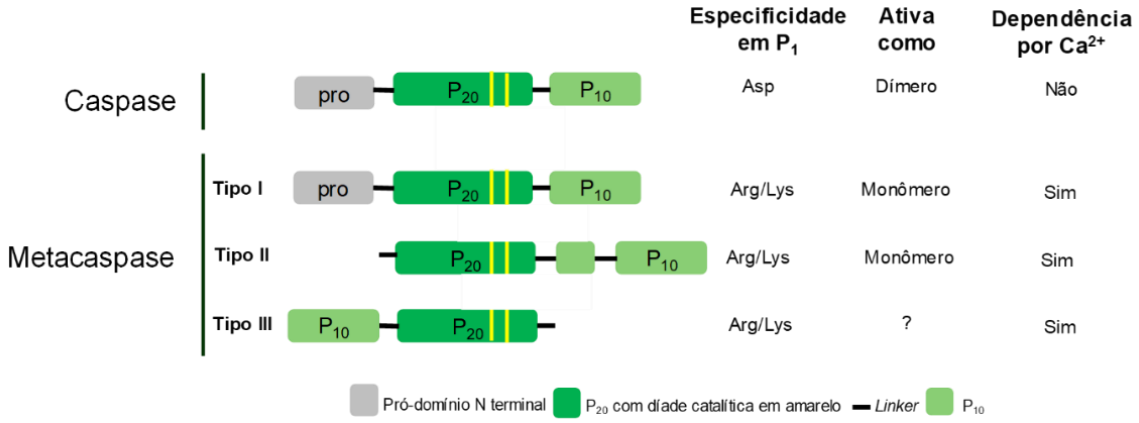
**Figura 9** – Mecanismo de ativação proposto para as caspases e metacaspases




Fonte: Hill e Nyström (2015, p. 526 – com adaptação)
Figura A: Representação ilustrativa da estrutura da caspase durante sua clivagem, pró-domínio (pro), subunidade $P_{20}$ e subunidade $P_{10}$, resíduos de ácido aspártico (D). Figura B: Representação ilustrativa proposta para a metacaspase durante seu autoprocessamento. Todos os três tipos de metacaspases são compostas pelas subunidades $P_{20}$ onde está localizada a díade catalítica His/Cys (H e C) e $P_{10}$, além de possuírem uma região rica em glutamina e asparagina (Q/N) na subunidade $P_{20}$. A metacaspase I possui a presença de um pró-domínio (pro).

Dentre as metacaspases temos uma subdivisão em tipos baseada nas diferenças estruturais entre elas que é demonstrado na Figura 10.

**Figura 10** – Comparação das caspases e metacaspases




Fonte: Klemenčič e Funk (2019, p. 2 – com adaptação)
Composição dos domínios e características das caspases e metacaspases. Em cinza o pró-domínio no N-terminal (pro) presente nas caspases e metacaspases do tipo I. A metacaspase do tipo II possui um domínio vinculador entre as subunidades $P_{20}$ e $P_{10}$. Na metacaspase do tipo III a subunidade menor $P_{10}$ antecede a subunidade grande $P_{20}$.

A metacaspase do tipo I contém um pró-domínio N-terminal rico em prolina e motivo dedo de zinco. A metacaspase tipo II não possui pró-domínio, porém, possui um domínio vinculador com vários resíduos de aminoácidos que separam a subunidade $P_{20}$ catalítica e $P_{10}$ reguladora. Já a metacaspase tipo III sofre um rearranjo diferente, a subunidade $P_{10}$ antecede a subunidade $P_{20}$ encontrando-se localizada no N-terminal (MININA *et al*., 2017; KLEMENČIČ; FUNK, 2019).

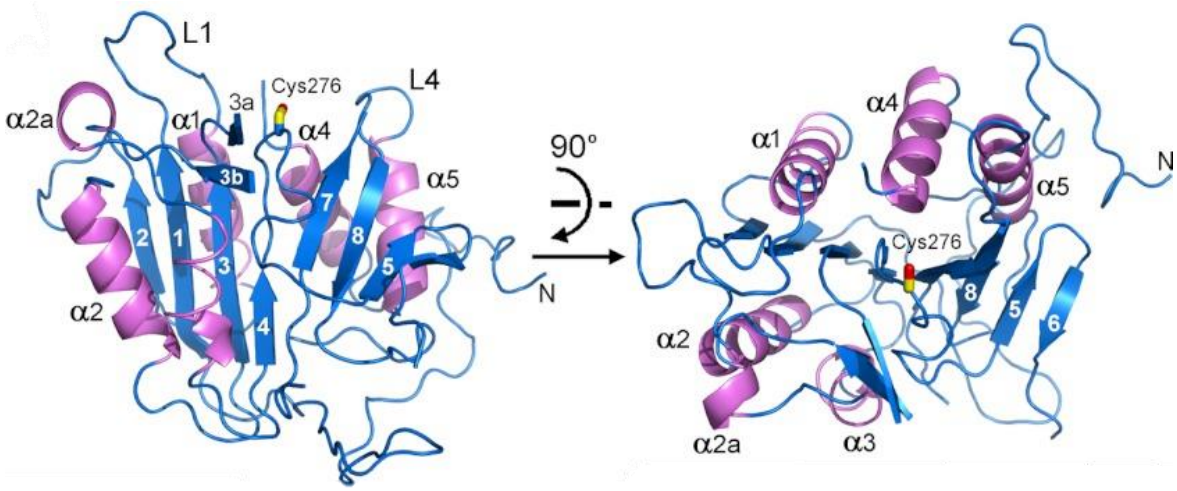
O estresse celular leva a liberação de sinais de morte que induzem a ativação da metacaspase e resulta em um autoprocessamento (TSIATSIANI *et al.*, 2011). Esse autoprocessamento ocorre após a interação do cálcio com a metacaspase, porém, esse não é um pré-requisito para sua atividade enzimática (MOSS *et al.*, 2007). Apesar de não ser um fator determinante para a atividade da metacaspase, o seu autoprocessamento está diretamente relacionado com o aumento da sua atividade catalítica, influenciada pelos níveis de cálcio (MACHADO *et al.*, 2013). Em estudos utilizando a metacaspase tipo 2 de *Trypanosoma brucei*, verificou-se que a etapa de autoprocessamento é essencial para a realocação do N-terminal a fim de expor os resíduos do sítio catalítico e permitir assim a ação da enzima sobre substratos proteicos grandes e não apenas em oligopeptídeos (GILIO *et al.*, 2017).

## 1.4 *YEAST CASPASE* 1 (YCA1)

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura que codifica uma única metacaspase, denominada como ***Y****east* ***Ca****spase* **1** (YCA1) (SHRESTHA *et al.*, 2019). A YCA1 é uma metacaspase do tipo I e diversos estudos demonstram que sua expressão está relacionada diretamente a morte celular (apoptose) induzida por estresse oxidativo e senescência celular, regulação do ciclo celular e a eliminação de agregados de proteínas na levedura *S. cerevisiae* (MADEO *et al.*, 2002b; TSIATSIANI *et al*., 2011; SHRESTHA *et al.*, 2019). Foi demonstrado por Lee *et al*. (2008) que a YCA1 regula ativamente o ciclo celular da levedura, atuando precisamente na transição da fase $G_1$ para a fase S e, quando é inibida a atividade da enzima ou na ausência do gene nota-se uma transição de $G_1$ para S tardia em estudos de comparação entre cepas nocautes (Δyca1) e selvagens (BY4741).

A estrutura cristalográfica da YCA1 foi revelada por Wong, Yan e Shi (2012), os quais observaram a presença das subunidades grande ($P_{20}$) e pequena ($P_{10}$), e conseguiram determinar por análise do sequenciamento de peptídeos do N-terminal que o autoprocessamento pode ocorrer nas extremidades carboxílicas das lisinas 331 e 334. A estrutura da YCA1 é composta por oito folhas β e cinco α-hélices (α1 a α5), três hélices localizadas em um lado (α1, α4 e α5) e duas hélices do outro (α2 e α3), com três alças ordenadas (L1, L2 e L4), sendo que o resíduo catalítico, a cisteína 276 está localizado na alça L2 (Figura 11) (WONG; YAN; SHI, 2012).

**Figura 11** – Estrutura cristalográfica da metacaspase de *Saccharomyces cerevisiae*



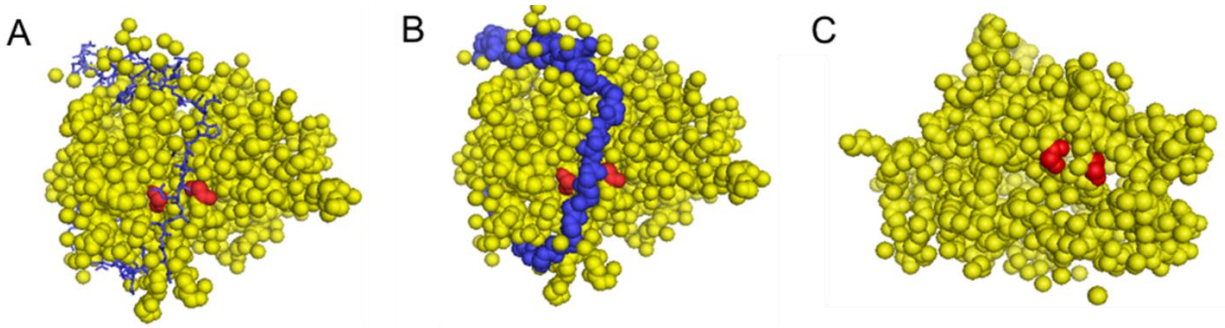

Fonte: Wong, Yan e Shi (2012, p. 29254)
Estrutura tridimensional da YCA1. As oito folhas β são demonstradas em azul, as cinco alfa hélices são demonstradas em rosa, em colorido é destacado a cisteína catalítica ($Cys^{276}$).

Com o intuito de demonstrar o autoprocessamento dessa metacaspase, Wong, Yan e Shi (2012) realizaram ensaios utilizando a enzima pura na presença do íon $Ca^{2+}$ e demonstraram que esse processamento ocorre no C-terminal e no N-terminal, sendo que no primeiro é liberado um fragmento menor quando realizado uma análise eletroforética em gel de *SDS-PAGE*, evidenciando uma banda abaixo de 14 kDa chamado de subunidade pequena, e o segundo liberando um fragmento com banda em torno de 45 kDa chamada de subunidade grande (WONG; YAN; SHI, 2012).

Estudos realizados por Erhardt, Wegrzyn e Deuerling em 2010, revelaram que os aminoácidos que compõem a região do N-terminal da YCA1 interferem na solubilidade desta molécula, enfatizando que a região rica em glutamina e asparagina (Q/N) é fortemente relacionada a esse processo.

Quando comparada a estrutura da YCA1 com a estrutura da metacaspase 2 de *Trypanosoma brucei* (TbMCA2), verifica-se que ambas possuem semelhanças como a presença dos resíduos de ligação do cálcio, a díade catalítica e os resíduos de lisina onde ocorre o autoprocessamento. Entretanto, algumas características únicas podem ser destacadas, como a estrutura do N-terminal na TbMCA2, caracterizado por um N-terminal alongado que circunda toda a proteína, influenciando diretamente no acesso ao seu sítio ativo, diferentemente do que se encontra na YCA1 (Figura 12). Quando sobrepostas as estruturas tridimensionais dessas proteínas, é possível observar que os aminoácidos de ligação ao cálcio, dado por quatro ácidos aspárticos, ocupam posições quase idênticas, o que sugere que a região de ligação do cálcio é conservada entre as metacaspases (MCLUSKEY *et al.*, 2012; WONG; YAN; SHI, 2012; MACHADO *et al.*, 2013).

**Figura 12** – Estruturas tridimensionais da TbMCA2 e da YCA1

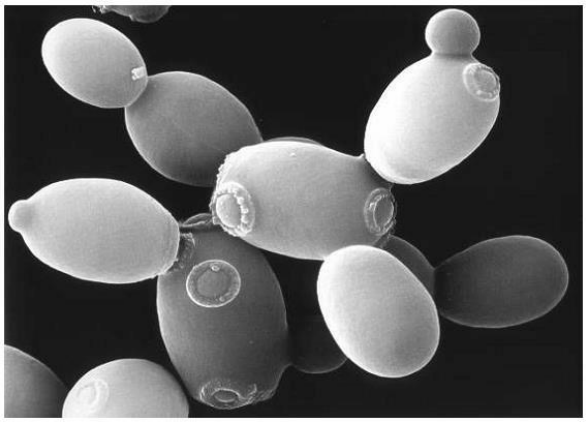



Fonte: McLuskey *et al.* (2012); Wong, Yan e Shi (2012).
(A) e (B) Estrutura tridimensional da TbMCA2, destacando o N-terminal, em azul, nota-se que esse circunda toda a proteína ocupando o sítio de interação do substrato e encobrindo os resíduos catalíticos destacados em vermelho (PDB: 4AF8). (C) Na YCA1, o sítio de interação com o substrato encontra-se desobstruído (PDB: 4F6P).

## 1.5 *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura não patogênica que realiza fermentação gerando etanol e dióxido de carbono, sendo classificada como eucarioto unicelular no reino dos fungos. Sua morfologia é ovoide e sua divisão se dá por brotamento (Figura 13), podendo apresentar-se como haplóides, diplóides ou poliplóides. É um microrganismo aeróbio facultativo, ou seja, se ajusta metabolicamente na presença e ausência de oxigênio, e sua duplicação se dá a cada 90 minutos sob temperatura de crescimento entre 20 e 30º C (GODDARD; GREIG, 2015; SALARI; SALARI, 2017; TULLIO, 2022).

**Figura 13** – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de células de *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: Aref (2014, p. 14)

Em 1996, a *S. cerevisiae* teve seu genoma totalmente sequenciado pelos pesquisadores Goffeau *et al*. como parte do projeto genoma e, a partir desse momento, ocorreu um avanço no desenvolvimento tecnológico voltado ao ramo da biotecnologia (GOFFEAU *et al.*, 1996). Várias tecnologias foram testadas e desenvolvidas usando como modelo a levedura *S. cerevisiae*, devido ao conhecimento aprofundado sobre características como sua estrutura, que fornece base para aplicar em outros organismos (CHERRY *et al.*, 2012). Ainda nos dias atuais, dentre as espécies microbianas, a *S. cerevisiae* é um dos microrganismos mais amplamente utilizados para estudos e aplicações tecnológicas, desde pesquisas científicas até a utilização em produções industriais em larga escala (TULLIO, 2022).

### 1.5.1 Modelo de Estudos e Aplicações Tecnológicas

A levedura *S. cerevisiae* possui ampla aplicação tanto no ramo industrial quanto na área tecnológica, sendo muito utilizada como fermento principalmente na panificação e produção de cerveja. Por não ser patogênica, o seu manuseio é simples, o que facilita no processo de cultivo e emprego no campo da ciência (SALARI; SALARI, 2017).

O uso da *S. cerevisiae* como modelo de estudo têm contribuído para a compreensão de processos biológicos oriundos de células eucarióticas, seja no ponto de vista bioquímico, molecular ou celular, auxiliando também na observação de processos ligados ao desenvolvimento de doenças em humanos (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000; GODDARD; GREIG, 2015). Como exemplo, podemos citar os estudos relacionados ao processo de morte celular que utilizam como modelo a *S. cerevisiae*, e que foram úteis para o entendimento a respeito das vias de morte celular em organismos pluricelulares (CARMONA-GUTIERREZ *et al.,* 2010; CARMONA-GUTIERREZ *et al.*, 2018; SHRESTHA *et al.,* 2019).

A utilização da *S. cerevisiae* no ramo industrial é ampla, abrange desde o ramo alimentício até a produção de fármacos, por meio de abordagens que utilizam a engenharia genética. Alguns estudos com a levedura destacam seu uso como suplemento alimentar, a fim de carrear nutrientes de difícil absorção como os oligoelementos (zinco, ferro, selênio, etc.), além da aplicação como probiótico regulador da flora intestinal. Existem até mesmo estudos em torno do seu uso como pós-biótico na indústria cosmética. Há também a aplicação na produção de biofármacos, como na síntese de proteínas heterólogas, como por exemplo, a insulina e anticorpos monoclonais. (DUARTE *et al.*, 2022; SUN *et al.*, 2022; TULLIO, 2022).

Por possuir a capacidade de fermentar açúcar em etanol, a *S. cerevisiae* tem ampla utilização na produção de biocombustíveis, podendo ser geneticamente manipulada e modificada metabolicamente para a produção de outros tipos de álcoois com características superiores, como o butanol, e até mesmo para produção de biodiesel. Também é utilizada como fermento biológico, o que se destaca por ser uma das aplicações iniciais dessa levedura na indústria alimentícia, sendo utilizada na produção de bolos, pães, laticínios, como queijos e iogurtes, produção de bebidas alcoólicas, como a cerveja, e bebidas não alcoólicas, como o leite fermentado e chás (ABID *et al.*, 2022; TULLIO, 2022).

Existem muitas perspectivas futuras em torno do uso da *S. cerevisiae* pela sua fácil manipulação, cultivo e crescimento, e pelas inúmeras ferramentas genéticas aplicáveis. Essas aplicações dizem respeito a projetos voltados ao desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, como exemplo substituir a extração de leite bovino por cepas da levedura geneticamente modificadas que produzem a proteína do leite em larga escala, garantindo maior segurança alimentar e sustentabilidade, chamada de “agricultura celular”. A agricultura celular engloba um conjunto de técnicas voltadas à obtenção de produtos animais através de cultura de células, substituindo o uso de gado, caça ou pesca, visto que a pecuária tem um grande impacto ambiental na emissão de gases e do bem estar animal, contribuindo para mudanças climáticas e contaminação do ecossistema (TULLIO, 2022).

Com base em todas as informações fornecidas sobre o impacto dos estudos em torno da *S. cerevisiae*, nosso trabalho teve como intuito aprofundar o conhecimento sobre a YCA1, a única metacaspase encontrada nessa levedura e que e que participa no processo de morte celular por apoptose, que ocorre também em outros organismos patogênicos, assim corroborando para a descoberta de possíveis alvos farmacológicos, que pode auxiliar no tratamento de doenças causadas por fungos. Portanto, esse trabalho teve como objetivo revelar, através de mutações sítio dirigidas, a importância de uma segunda cisteína catalítica para o autoprocessamento e ativação da metacaspase YCA1.

# 2 OBJETIVO

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir a metacaspase de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante na sua forma íntegra (YCA1) e com a deleção da porção N-terminal (tYCA1) contendo as mutações sítio dirigidas das cisteínas $Cys^{155}$ e $Cys^{276}$.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Neste trabalho propomos obter as metacaspases YCA1 e tYCA1 contendo mutações pontuais baseadas na estrutura cristalográfica dessa enzima (WONG; YAN; SHI, 2012), e estudar a influência desses resíduos na ativação da proteína. Para isso foi necessário:

- Realizar a produção dos mutantes da YCA1 e tYCA1 C155A e C276A, além do duplo mutante C155/276A da YCA1.
- Submeter o produto da amplificação a reação com a enzima T5 exonuclease e clonar em células de *Escherichia coli* DH5α;
- Extrair o DNA mutado e transformar em células de *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS;
- Expressar, purificar as proteínas obtidas e confirmar por *western blotting*.
- Realizar experimentos de *SDS-PAGE* para avaliação do processo de autoprocessamento das enzimas mutadas.

# 3 MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1 ETAPAS DE AMPLIFICAÇÕES

Nessa etapa inicial foram realizadas uma série de amplificações, com o intuito de inserir a mutação e preparar tanto o gene quanto o vetor para obter o clone através da reação na presença da T5 exonuclease, usando o método *T5 Exonuclease DNA Assembly* (TEDA), o qual será detalhado posteriormente no item 3.3.

### 3.1.1 Desenvolvimento da sequência dos *primers*

Os iniciadores para amplificação foram desenhados com base na sequência completa do gene da metacaspase YCA1 depositada no banco de dados da Uniprot (2022) como demonstrado na Figura 14.

**Figura 14** – Sequência completa do gene que codifica a metacaspase de *Saccharomyces cerevisiae* (YCA1), contendo 1299 pares de bases

5′TGTATCCAGGTAGTGGACGTTACACCTACAACAACGCTGGTGGTAATAATGGCTACCAACGGCCCATGGCTCC
TCCACCTAACCAGCAGTATGGACAGCAATATGGTCAGCAATATGAACAGCAGTATGGACAGCAATATGGGCAACA
AAATGATCAGCAATTCAGTCAGCAATATGCTCCACCACCAGGTCCTCCCCCTATGGCTTATAACAGGCCTGTGTA
TCCCCCCCCTCAATTCCAGCAGGAACAGGCAAAGGCACAATTAAGCAACGGCTACAACAATCCTAATGTAAACGC
ATCCAATATGTACGGTCCACCCCAGAATATGTCATTACCTCCACCTCAAACACAAACTATTCAAGGTACAGACCA
ACCTTATCAGTATTCTCAATGTACTGGGCGTAGAAAGGCTTTGATTATCGGTATAAACTACATAGGTTCAAAAAA
TCAACTGCGTGGTTGTATCAATGATGCTCATAACATCTTCAACTTTTTGACTAATGGGTACGGTTACAGTTCAGA
TGACATTGTCATATTAACTGATGATCAGAACGATTTGGTCAGGGTTCCCACTAGGGCTAATATGATTAGGGCCAT
GCAATGGTTGGTCAAGGATGCGCAACCCAATGATTCTTTGTTCCTTCATTATTCTGGACATGGTGGCCAAACTGA
AGATTTGGATGGGGACGAAGAAGATGGGATGGATGATGTTATATATCCGGTCGATTTCGAAACTCAAGGGCCAAT
TATCGACGATGAAATGCACGATATAATGGTGAAGCCCTTACAACAAGGTGTTAGACTAACAGCATTGTTTGACTC
TTGTCATTCGGGTACAGTGTTGGATCTTCCATATACCTATTCTACTAAGGGTATTATTAAGGAGCCCAATATTTG
GAAGGATGTTGGCCAAGATGGCCTGCAAGCAGCTATTTCATATGCCACAGGAAACAGGGCTGCTTTGATTGGTTC
TTTAGGTTCTATATTCAAGACCGTTAAGGGAGGTATGGGCAATAATGTGGATAGAGAACGCGTGAGACAGATCAA
ATTCTCAGCAGCAGATGTTGTTATGTTATCAGGTTCGAAGGATAATCAAACTTCTGCAGATGCTGTCGAAGATGG
GCAAAATACAGGTGCAATGTCCCACGCCTTCATCAAGGTTATGACTTTACAACCACAGCAATCATATTTATCTCT
TTTACAGAACATGAGGAAAGAATTGGCTGGTAAGTATTCTCAAAAACCACAATTATCATCGTCACACCCTATTGA
CGTAAATCTGCAATTTATTATGTAG3′

Fonte: Uniprot (2022)

A construção dos *primers* para a inserção da mutação pontual foi desenhado tendo como base a estrutura cristalográfica elucidada por Wong, Yan e Shi (2012). Para cada mutação foram desenhados *primers forward* (5’-3’) e *reverse* (3’-5”), demonstrados na Tabela 1, de modo que o códon do aminoácido alvo fosse substituído pelo códon que codifica uma alanina.

**Tabela 1** – *Primers* utilizados na amplificação do gene da YCA1 para inserção da mutação pontual (em **negrito** o novo códon para troca do aminoácido e produção da mutação)

| Primer | Sequência |
|---|---|
| C155A *Forward* | 5' AAATCAACTGCGTGGT**GCT**ATCAATGATGCTC 3' |
| C155A *Reverse* | 5' GAGCATCATTGAT**AGC**ACCACGCAGTTGATTT 3' |
| C276A *Forward* | 5’ ACAGCATTGTTTGACTCT**GCT**CATTCGGGTACAGTGTTG 3’ |
| C276A *Reverse* | 5’ CAACACTGTACCCGAATG**AGC**AGAGTCAAACAATGCTGT 3’ |

Os *primers* para a reação TEDA foram projetados com base na sequência do gene da YCA1 e do plasmídeo pET28(a)+. Na Tabela 2 encontram-se os *primers* projetados para a amplificação do gene da YCA1 íntegro e truncado contendo as mutações.

**Tabela 2** – *Primers* projetados para amplificação do gene da YCA1 utilizados na reação TEDA

| Primer | Sequência |
|---|---|
| YCA1 *Forward* | 5’ CTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGTATCCAGGTAGTGGACGT 3’ |
| tYCA1 *Forward* | 5’ CTGGTGCCGCGCGGCAGCCATGCACAATTAAGCAACGGCTAC 3’ |
| YCA1 *Reverse* | 5’ GTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGCTACATAATAAATTGCAGATTTAC 3’ |

Na Tabela 3 é apresentado a sequência dos *primers* utilizados para a amplificação do vetor pET28(a)+.

**Tabela 3** – *Primers* projetados para amplificação do vetor pET28(a)+ utilizados na reação TEDA

| Primer | Sequência |
|---|---|
| pET28 *Forward* | 5’ CTCGAGCACCACCACCACCACCACT 3’ |
| pET28 *Reverse* | 5’ CATATGGCTGCCGCGCGGCAC 3’ |

Os *primers* amplificadores da região T7 (Tabela 4) foram projetados para a primeira etapa da reação da PCR da mutação, tanto quanto para as amplificações por PCR para confirmação, como a PCR de colônia.

**Tabela 4** – *Primers* utilizados para amplificação da região T7 (promotora e terminadora) que flanqueia o gene da YCA1

| Primer | Sequência |
|---|---|
| T7 *Forward* | 5’ TAATACGACTCACTATAGGG 3’ |
| T7 *Reverse* | 5’ TAGTTATTGCTCAGCGGTGG 3’ |

### 3.1.2 DNA molde

Para realização das amplificações contendo as mutações desejadas, utilizamos como molde o clone da YCA1 em vetor de expressão pET28(a)+, obtidos anteriormente por nosso grupo. O plasmídeo pET28(a)+ possui 5369 pb de comprimento e inclui uma região promotora e terminadora T7 que flanqueia o gene de interesse quando é inserido, sendo importante para a transcrição e expressão de proteínas em *Escherichia coli*.

### 3.1.3 Amplificação para inserção da mutação no DNA codificante da YCA1 usando a reação de extensão de sobreposição de *primer*

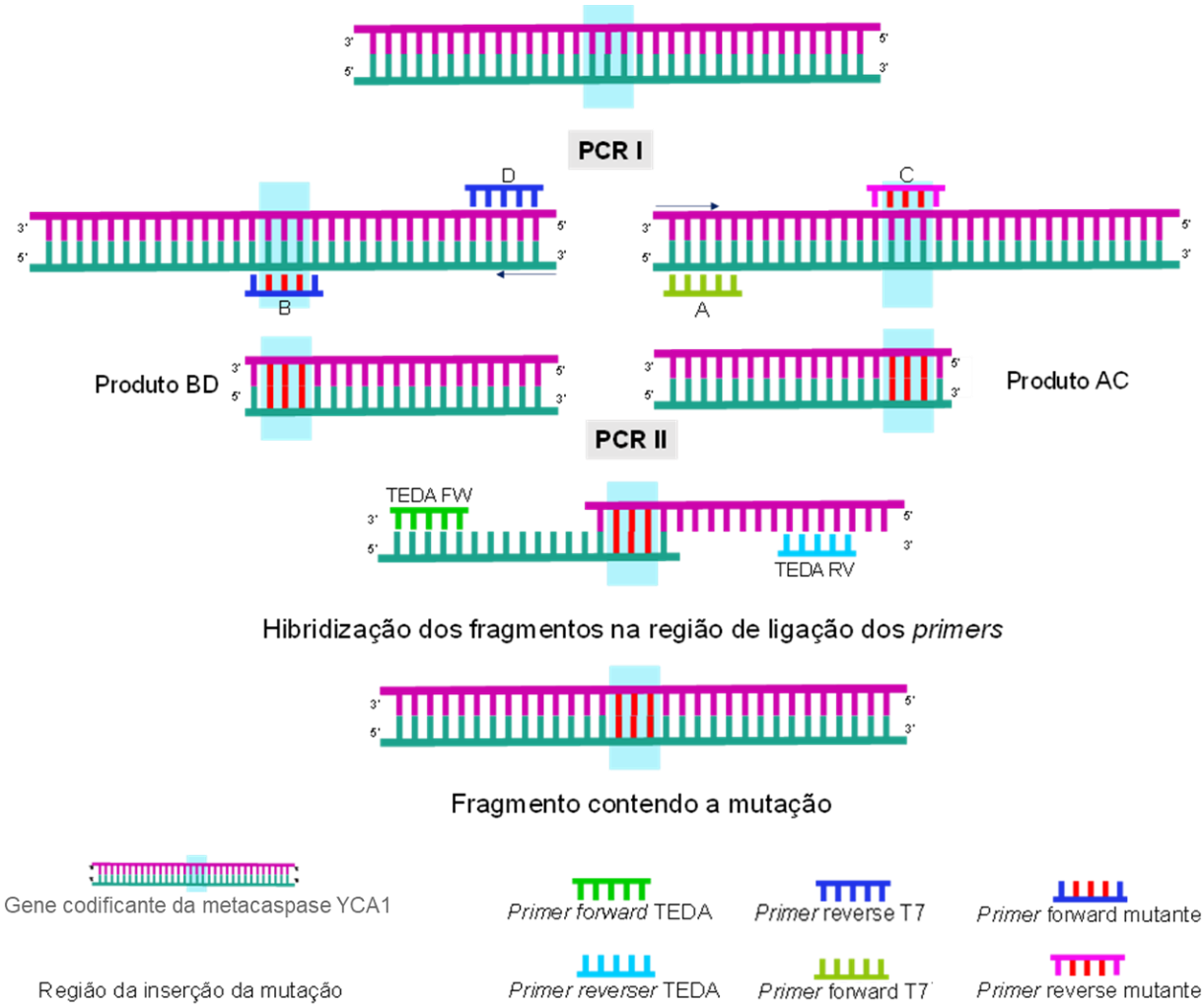
Para realizarmos as mutações pontuais através dessa amplificação nos baseamos no protocolo de Ho *et al.* (1989) com modificações. A técnica de sobreposição de *primer* consistente em amplificar o gene em duas etapas, gerando fragmentos que irão ser complementares, usando *primers* flanqueadores do gene (A e D) complementares a sequência alvo, que são os *primers* da região T7, e *primers* internos contendo a mutação desejada (B e C), que são os *primers* da mutação (Tabela 5), separadamente de forma que se hibridizem posteriormente.

**Tabela 5** – Descrição dos *primers* usados na primeira etapa para inserção da mutação

| ***Primer*** | **Função** | **Descrição** |
|---|---|---|
| C155A *Forward* | Inserir a mutação | B |
| C155A *Reverse* | Inserir a mutação | C |
| C276A *Forward* | Inserir a mutação | B |
| C276A *Reverse* | Inserir a mutação | C |
| T7 *Forward* | Flanqueador do gene | A |
| T7 *Reverse* | Flanqueador do gene | D |

Realizamos as reações em tubos distintos, uma para o sentido *forward* e outro para o *reverse*, denominadas como PCR-I *Forward*, na qual utilizou-se o *primer forward* da mutação e o *primer reverse* T7, e PCR-I *Reverse,* na qual utilizou-se o *primer reverse* da mutação e o *primer forward* T7, criando assim os fragmentos AC e DB, respectivamente (Figura 15).

**Figura 15** – Mutação sítio dirigida por técnica de sobreposição de *primers.*




Fonte: Ho *et al.* (1989, p. 54 – com adaptação)
Na PCR I ocorrem duas reações, utilizando os *primers* B/D (PCR I-FW) e A/C (PCR I-RV). B e C são os primers para mutação e irão substituir o códon original. Os fragmentos formados (BD e AC) são misturados para a PCR II, essa etapa utiliza os primers TEDA, que são projetados para inserir 15 bases nitrogenadas no sentido 5'-3' de cada fita. Com os fragmentos formados na primeira etapa são complementares, ocorre hibridização e a amplificação do fragmento completo, havendo a inserção da mutação.

A reação foi realizada utilizando a TransStart® FastPfu Fly DNA Polimerase (Transgen), seguindo as orientações do fabricante, e foi realizada em um termociclador T100 *Thermal Cycler* (Bio-Rad) nas seguintes condições: (1) 1 ciclo a

98º C por 1 minuto (desnaturação inicial), (2) repetições de 30 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 98º C por 30 segundos (desnaturação), 55º C por 30 segundos (anelamento) e 72º C por 45 segundos (extensão), e (3) 1 ciclo extra de 10 minutos a 72º C (extensão final).

O produto da amplificação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose preparado a 1% (m/v) contendo 0,75 µg/mL de brometo de etídio em tampão TAE (TRIS 80 mM; Ácido Acético glacial 40 mM; EDTA 2,5 mM, em pH 8,3). Em seguida foi submetido a uma tensão de 80 V durante 30 minutos em cuba horizontal. Após migração, o gel foi analisado sob luz UV no fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad).

Após a confirmação da amplificação dos fragmentos da primeira etapa, realizamos uma etapa de purificação do produto usando o kit *Easypure PCR Purification* (Transgen Biotech) e seguimos para a segunda etapa da reação. Para a PCR II foram utilizados 10 ng de cada produto da reação anterior e os *primers* desenhados para a reação do TEDA, usando YCA1 *forward* e YCA1 *reverse* para as formas íntegras, e tYCA1 *forward* e YCA1 *reverse* para as formas truncadas (Tabela 2). As extremidades complementares formadas na região de ligação dos *primers*, B e C, se hibridizam (Figura 14) neste segundo PCR para criar o produto final contendo a sequência mutada. As condições da reação foram alteradas para: (1) 1 ciclo a 98º C por 30 segundos (desnaturação inicial), (2) repetições de 35 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 98º C por 10 segundos (desnaturação), 62º C por 15 segundos (anelamento) e 72º C por 30 segundos (extensão), e (3) 1 ciclo extra de 10 minutos a 72º C (extensão final). A análise foi realizada da mesma forma descrita anteriormente.

### 3.1.4 Amplificação do plasmídeo pET28(a)+ com os *primers* do TEDA

Para a amplificação do pET28(a)+ foram desenhados *primers* específicos (Tabela 3) para a realização da reação do TEDA, esses *primers* inserem em torno de 15 bases nitrogenadas que formam as extremidades homólogas entre inserto e vetor. A reação foi construída utilizando 60 ng de DNA molde e 25 pmol de cada *primer forward* e *reverse* TEDA. A reação foi catalisada pela TransStart® FastPfu Fly DNA Polimerase (Transgen), seguindo as orientações do fabricante.

As condições da amplificação compreenderam as seguintes etapas: (1) 1 ciclo a 98º C por 30 segundos (desnaturação inicial), (2) repetições de 35 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 98º C por 20 segundos (desnaturação), 72º C por 2 minutos (anelamento e extensão), e (3) 1 ciclo extra de 10 minutos a 72º C (extensão final). A análise foi realizada da mesma forma descrita anteriormente no item 3.1.3. Após as etapas de amplificações, foram preparadas as bactérias competentes que serão utilizadas nas próximas etapas.

## 3.2 PREPARAÇÃO DAS BACTÉRIAS *Escherichia coli* DH5α E BL21(DE3)pLysS COMPETENTES PARA TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO

O protocolo adotado foi elaborado com base no trabalho descrito por Inoue, Nojima e Okayama (1990), sendo otimizadas algumas condições frente ao protocolo descrito por Hanahan (1983). Foram utilizadas duas linhagens de bactérias hospedeiras: *E. coli* DH5α e *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

O primeiro passo foi inocular uma colônia isolada da bactéria, semeada anteriormente, em 40 mL de meio Luria Bertani (LB) (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L). Após 18 horas foram inoculada amostras em 3 erlenmeyers de 1 L contendo 250 mL de meio *Super Optimal Broth* (SOB) (triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L contendo 5 mL/L de $MgCl_2$ 2M – pH 7,0 NaOH) com diferentes volumes de pré-inoculo: 1° utilizando 10 mL do pré-inóculo, 2° utilizando 4 mL do pré-inóculo e o 3° utilizando 2 mL do pré-inóculo.

A suspensão foi incubada durante a noite em *shaker* em uma temperatura de 18° C sob agitação de 180 rpm. Após 18 horas acompanhamos a densidade ótica a 600 nm de comprimento de onda ($DO_{600}$) a cada 45 minutos até que a cultura atingiu a $DO_{600}$ entre 0,35 – 0,5. Em seguida as células foram submetidas as seguintes etapas: (1) banho de gelo durante 10 minutos; (2) seguida de centrifugação 2500 xg durante 10 minutos a 4° C; (3) desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 1/3 do volume original (250 mL → 80 mL) em solução ITB *ice cold* ($CaCl_2$ 15 mM; KCl 250 mM; $MnCl_2$ 55mM e HEPES 10 mM – pH 6,7 KOH); (4) em seguida foi incubada no gelo durante 10 minutos e centrifugou-se da mesma forma que na etapa 2; (5) as células foram ressuspensas em 1/12,5 do volume original (250 mL → 20 mL) de ITB *ice cold*; (6) adicionou-se 7% de DMSO (1,4 mL), homogeneizou-se cuidadosamente, seguido de incubação no gelo durante 10 minutos; (7) por fim, as

células foram separadas em alíquotas de 100 µL em tubos esterilizados, e procedeu com o congelamento ultra rápido ($N_2$ líquido). As alíquotas foram armazenadas no freezer a -80 °C.

## 3.3 PROCEDIMENTO DE MONTAGEM DE DNA COM T5 EXONUCLEASE

Para a realização do procedimento de montagem de DNA com T5 exonuclease, em inglês T5 exonuclease DNA assembly (TEDA), nos baseamos no trabalho descrito por Xia *et al.* (2019). Este trabalho descreve um método que combina a ação da T5 exonuclease e os mecanismos de reparo da *E. coli*. Trata-se de um método eficiente e de baixo custo que pode ser utilizado para protocolos de clonagem e mutação sítio dirigida. A metodologia baseia-se na montagem de fragmentos de DNA com extremidades homólogas utilizando exclusivamente a ação da T5 exonoclease capaz de remover as bases nitrogenadas apenas na direção 5´- 3´ (XIA *et al.*, 2019).

A primeira etapa para realização do TEDA, foi a preparação da solução estoque 5X (0,5 M TRIS; 50 mM $MgCl_2$; 50 mM DTT; PEG 8000 0,25 g/mL$^{-1}$, em pH 7,5 ajustado com HCl). A solução foi armazenada em alíquotas de 1 mL no freezer a -80° C. Para o preparado da solução 5X TEDA + T5 exonuclease, acrescentou-se 10 unidades da T5 exonuclease (ThermoFisher) em uma alíquota de 1 mL e preparamos alíquotas de 100 µL.

A reação foi preparada seguindo as orientações descritas por Xia *et al.* (2019) quanto as condições ótimas para a reação TEDA. A proporção da reação foi 1:4 (vetor/inserto). Utilizamos 100 ng do vetor pET28(a)+ linearizado, e para calcularmos a concentração do inserto, utilizamos a Equação 1 (Eq. 1) abaixo.

$$ng\ Inserto = \frac{ng\ Vetor\ x\ pb\ Inserto}{pb\ Vetor} \qquad \text{(Eq. 1)}$$

O vetor linearizado e os insertos foram obtidos por amplificação via PCR e as extremidades homólogas foram introduzidas na reação usando os *primers* específicos do TEDA. Ambos, vetor e inserto, foram purificados utilizando kit de purificação *Easypure PCR Purification* (Transgen Biotech). O vetor, posteriormente a purificação, foi tratado com a enzima de restrição DpnI, a fim de clivar o material molde, sob

condições em termociclador: (1) 37º C por 3h e (2) 80º C por 20 minutos para inativação da enzima.

Para cada reação TEDA foi utilizado 4 µL da solução 5X TEDA + T5 exonuclease, na qual adicionou-se a solução à mistura dos fragmentos do inserto e vetor linearizado e completou a reação com água ultra pura para o volume final de 20 µL, a mistura preparada foi então homogeneizada e incubada a 30° C durante 40 minutos.

Procedemos com o protocolo de transformação através de choque térmico utilizando 7 µL da solução reacional para uma alíquota de 100 µL de células competentes *E. coli* DH5α. As células foram incubadas por 30 minutos em gelo, submetidas a choque térmico a 42° C por 90 segundos e depois transferidos para gelo durante 2 minutos, em seguida acrescentou-se 800 µL de meio LB. A suspensão foi incubada em um agitador a 37 °C durante 60 minutos. Após o tempo de incubação, o material foi centrifugado, descartou-se 700 µL do sobrenadante e o *pellet* formado foi ressuspendido nos 100 µL restantes. As alíquotas de 100 µL obtidas foram espalhadas em placas de LB contendo canamicina (50 µg/mL). As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C.

### 3.3.1 Triagem das colônias positivas

Para confirmar a inserção do plasmídeo gerado na reação do TEDA em células de *E. coli* DH5, foi realizado uma PCR de colônia utilizando os *primers* da região T7, que flanqueia o gene. Para isso, selecionou-se algumas colônias aleatoriamente, preparou-se uma placa controle que foi incubada à 37º C, *overnight* e diluiu-se a colônia diretamente na reação de PCR, que foi preparada utilizando a Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia) seguindo as orientações do fabricante. A reação foi levada a termociclador nas seguintes condições: (1) 1 ciclo a 94º C por 10 minutos (desnaturação inicial), (2) repetições de 35 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 98º C por 45 segundos (desnaturação), 50º C por 30 segundos (anelamento) e 72º C por 90 segundos (extensão), e (3) 1 ciclo extra de 10 minutos a 72º C (extensão final). A análise foi realizada da mesma forma descrita anteriormente no item 3.1.3.

## 3.4 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL POR MINIPREP PELO MÉTODO DE LISE ALCALINA E CONFIRMAÇÃO DA INTEGRIDADE DO PLASMIDEO

Com a confirmação dos clones positivos na etapa anterior realizou-se um pré-inóculo das colônias positivas em 5 mL meio LB (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L) contendo canamicina (50 µg/mL), que foram posteriormente incubadas em *shaker overnight* a 37º C, sob agitação constante de 180 rpm. Após 18 horas, centrifugou-se 2 mL de cada pré-inóculo e o *pellet* foi submetido a extração do plasmídeo contendo o inserto de interesse pelo método de lise alcalina através do kit *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific). Os produtos da extração foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Scientific).

Para a confirmação da integridade dos plasmídeos obtidos, foi realizado uma PCR utilizando os *primers* da região T7, que flanqueia o gene. A reação foi preparada utilizando a Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia) seguindo as orientações do fabricante. A reação foi levada a termociclador nas seguintes condições: (1) 1 ciclo a 94º C por 2 minutos (desnaturação inicial), (2) repetições de 35 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 98º C por 45 segundos (desnaturação), 50º C por 30 segundos (anelamento) e 72º C por 90 segundos (extensão), e (3) 1 ciclo extra de 10 minutos a 72º C (extensão final). A análise foi realizada da mesma forma descrita anteriormente no item 3.1.3.

## 3.5 TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS DE *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS COM O PRODUTO DA MINIPREP

O material obtido após a extração plasmidial por miniprep foi então submetido a inserção na bactéria através da técnica de transformação por choque térmico na cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS para serem utilizadas na expressão proteica. Foi realizado da mesma forma descrita no item 3.3, onde transformamos em *E. coli* DH5α. Um total de 10 ng do DNA recombinante foi submetido a transformação em 100 µL de *E. coli* BL21(DE3)pLysS competentes. Posteriormente foi realizado uma reação de PCR utilizando os *primers* da T7 em 5 colônias escolhidas aleatoriamente e a reação foi avaliada como já descrito anteriormente no item 3.3.1.

## 3.6 ENSAIOS PARA EXPRESSÃO DOS MUTANTES DA YCA1 RECOMBINANTE ÍNTEGRA E TRUNCADA

Os ensaios de expressão foram realizados em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. A partir das colônias positivas (item 3.5) prosseguimos com a expressão das enzimas. A expressão foi realizada a partir de um pré-inóculo da colônia preparada em 10 mL em meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina e incubada *overnight* a 37 °C, sob agitação de 180 rpm. Após o tempo da incubação, 2 mL do pré-inóculo foram transferidos para 600 mL de meio LB e incubado sob as mesmas condições anteriores. Realizou-se o acompanhamento da densidade ótica em $\lambda$ = 600 nm ($DO_{600}$) até alcançar uma faixa entre 0,6 – 0,8.

A expressão em *E. coli* BL21(DE3)pLysS foi induzida com isopropil-β-D-tiogalactosidase (IPTG), pois o pET28(a)+ possui o *operon lac* que na presença de lactose permite a transcrição do gene. Como o IPTG é um análogo deste composto que não é degradado pela bactéria, utilizamos o mesmo para a indução. Portanto, neste momento da expressão foi adicionado IPTG em uma concentração de 0,25 mM/mL e ajustamos a temperatura para 20°C. As células permaneceram incubadas durante 18 h.

Para verificar a expressão, foi retirado 1 mL e centrifugado a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em água e tampão de amostra e submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, descrito a seguir.

## 3.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (*SDS-PAGE*)

Para a realização da eletroforese em *SDS-PAGE*, o gel de corrida foi preparado com uma malha de 15% de acrilamida, partindo das seguintes soluções: acrilamida 30% (acrilamida 30%, bis-acrilamida 0,8%), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v), TEMED 0,12%, persulfato de amônio 100 mg/mL (p/v) e tampão TRIS/HCl 1,0 M, em pH 8,8. O gel de entrada foi preparado em uma concentração de 4% de acrilamida utilizando as soluções descritas acima, diferindo apenas no tampão, neste caso o TRIS/HCl 0,5 M, em pH 6,8.

As amostras foram preparadas em tampão de amostra [TRIS/HCl 60 mM, SDS 2% (p/v), glicerol 6% (v/v), azul de bromofenol 10% e β-mercaptoetanol a 3% (v/v), em pH 6,8] e aquecidas em banho seco a 100° C por 10 minutos. A corrida eletroforética

foi realizada na presença de tampão de corrida (TRIS/HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 1% - pH 8,3), em uma cuba de eletroforese sob uma corrente elétrica de 125 V. Utilizamos um marcador de peso molecular padrão de 14,4 kDa a 116 kDa (Thermo Scientific).

Após corrida eletroforética, o gel foi corado com Comassie brilhante blue R250 (Vetec) e a documentação foi realizada no equipamento fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad), as imagens foram capturadas com o auxílio do programa ImageLab v.4.0 (BioRad).

## 3.8 LISE CELULAR DAS EXPRESSÕES

As expressões preparadas anteriormente foram centrifugadas a 10.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* congelado *overnight* a -20º C com tampão de lise [TRIS 50 mM, NaCl 50 mM, glicerol 5% (v/v), 0,01% triton X-100 (v/v), em pH 8,0]. No dia seguinte, o material foi submetido a lise mecânica através de sonicação (10 ciclos de 40 segundos a 50 Hz) seguido de incubação com 1 mg/mL de lisozima (Sigma) durante 1 hora no gelo. Posteriormente, adicionou-se 1 M de $MgCl_2$ e 1 U/mL de DNAse e incubou-se durante 1 hora em temperatura ambiente no agitador. Por fim, o material foi centrifugado a 13.000 rpm para remover os detritos insolúveis. O sobrenadante foi filtrado usando um filtro com poro de 0,45 µm.

## 3.9 PURIFICAÇÃO DOS MUTANTES DA YCA1

A purificação dos mutantes íntegros e truncados da YCA1 foi realizada por cromatografia de afinidade, método pelo qual ocorre a separação das proteínas de acordo com a afinidade a um ligante, uma vez que os clones produzidos neste trabalho inserem um sequência de seis histidina na porção N-terminal.

O sobrenadante obtido durante a etapa de lise (descrito no item 3.8) foi injetado na coluna HisTrap™ HP (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com tampão de partida (TRIS 50mM, NaCl 100mM, em pH 7,5). A eluição da enzima foi realizada por etapas usando o sal imidazol, nas concentrações de 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM e 500 mM do tampão de eluição (TRIS 50 mM, NaCl 100mM, Imidazol 1 M, em pH 7,5). A purificação foi realizada utilizando o equipamento AKTA-Start (GE Healthcare), em um fluxo de 1 mL/min, e a eluição das proteínas foram

acompanhadas por espectrofotometria em comprimento de onda de 280 nm, o material da eluição foi coletado em alíquotas de 1 mL. O grau de pureza da enzima foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (conforme descrito no item 3.7).

Após a cromatografia de afinidade foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular com o intuito de realizar a remoção do sal imidazol através da troca de tampão. É uma técnica cromatográfica na qual as proteínas são separadas por meio de seus tamanhos e massas moleculares. Para este experimento, foi utilizada uma coluna com uma resina constituída por uma base polimérica (Sephadex). A coluna utilizada foi HiTrap™ 26/10 Desalting de 5 mL (GE Healthcare), e o tampão utilizado para esta proteína foi o tampão de eluição (TRIS 50 mM, NaCl 100 mM, em pH 7,5). Esse experimento também foi realizado no aparelho AKTA Start (GE Heathcare), em um fluxo de 5 mL/min, e a eluição das proteínas foram acompanhadas por espectrofotometria em comprimento de onda de 280 nm, o material da eluição foi coletado em alíquotas de 1 mL. As proteínas obtidas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% para análise de sua pureza.

### 3.10 *WESTERN BLOTTING*

Para a confirmação da produção das proteínas realizamos a técnica de *Western blotting* com anticorpo *6x-His Tag Antibody* (MA1-21315-HRP – ThermoFisher). Após a corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida foi colocado em contato com a uma membrana de PVDF (Bio-Rad), e posteriormente em uma cuba de transferência Trans-Blot Turbo (Bio-Rad), seguindo as orientações do fabricante.

A membrana foi então lavada com solução bloqueadora PBS ($Na_2HPO_4$ 10 mM, NaCl 150 mM - pH 7,4) com adição de 5 % de albumina e 0,01 % *Tween 20*, e mantida sob agitação constante durante 1h em temperatura ambiente. Utilizamos o anticorpo específico Anti-6X His Tag (ThermoFisher) diluído na proporção 1:30.000 em PBS (1x) com adição de 5% de albumina e 0,01% de *Tween 20.* A membrana foi incubada a 4°C sob agitação durante aproximadamente 18 horas.

Após o período de incubação, a membrana foi lavada com tampão de lavagem PBS + *Tween* 0,01% por 10 minutos (3X), com a finalidade de retirar qualquer resquício de albumina da membrana. A revelação da membrana de PVDF foi feita através do método de quimiluminescência com uso do Kit SuperSignal-West Pico

(ThermoFisher) diluído 1:1, que continham as soluções com substrato orgânico *SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution* e solução reveladora *Luminol Encharc Solution*, o resultado foi avaliado com o auxílio do aparelho fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad).

## 3.11 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA

A concentração das proteínas obtidas foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Scientific). Mensuramos as amostras com base na absorbância em λ = 280 nm, usando diretamente 2 µL pelo método de gota em caminho óptico de 1 mm, a partir do coeficiente de extinção molar (YCA1 íntegra = 49865 $M^{-1}.cm^{-1}$ e YCA1 truncada 31985 $M^{-1}.cm^{-1}$), obtida com o auxílio da ferramenta de identificação dos parâmetros físico-químicos de proteínas no servidor ExPASy (https://web.expasy.org/protparam/) com base na sequência de aminoácidos de cada uma das isoformas, utilizando a equação “Abs = C X Σ X d”, onde: Abs = absorbância da amostra; C = concentração da amostra; Σ = coeficiente de extinção molar; d = caminho óptico percorrido.

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *S. cerevisiae* codifica uma única metacaspase do tipo I, a YCA1. Esse tipo de metacaspase possui como característica um pró-domínio N-terminal, que apresenta uma região rica em glutaminas e asparaginas (Q/N) (ERHARDT; WEGRZYN; DEUERLING, 2010). Já foi previamente descrito na literatura que essa região possui uma grande influência para a precipitação e agregação dessa enzima. Devido a esse fato, utilizamos para esse estudo a YCA1 na sua forma íntegra, contendo 432 aminoácidos, e em sua forma truncada (tYCA1), que possui a deleção de 86 aminoácidos da porção N-terminal, mesma forma anteriormente utilizada para a elucidação da estrutura cristalográfica da YCA1 por Wong, Yan e Shi (2012).

## 4.1 MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS

As mutações sítio dirigidas realizadas neste trabalho foram baseadas na sequência do gene codificante da metacaspase de *S. cerevisiae* (YCA1) quando alinhada a sequência de aminoácidos da TbMCA2 de *Trypanosoma brucei* (Figura 15) e em resíduos essenciais identificados na estrutura cristalográfica dessa enzima (WONG; YAN; SHI, 2012).

Como observado para todas as metacaspases, a cisteína catalítica é conservada, compondo o sítio ativo da enzima junto a um resíduos de histidina, sendo a cisteína 276 o resíduo conservado na YCA1 ($Cys^{276}$). Entretanto, McLuskey *et al.* (2012) ao elucidarem a estrutura da TbMCA2 observaram que a mesma apresenta uma segunda cisteína que esta ligada ao autoprocessamento dessa metacaspase, identificada como resíduos $Cys^{92}$ (MCLUSKEY *et al.*, 2012), quando avaliamos as duas sequências dessas metacaspases, observamos que a YCA1 apresenta uma cisteína conservada na mesma posição a $Cys^{155}$ (Figura 16). A partir dessas informações e alinhamentos, identificamos os resíduos de interesse para esse estudo, e projetamos os *primers* para realizarmos as mutações da segunda cisteína ($Cys^{155}$) e da cisteína catalítica ($Cys^{276}$).

**Figura 16** – Alinhamento da sequência da YCA1 com a sequência da TbMCA2

```
YCA1        MYPGSGRYTYNNAGGNNGYQRPMAPPPNQQYGQQYGQQYEQQYGQQYGQQNDQQFSQQYA    60
TbMCA2      ----------------------MCSLI---------------------------------    5

YCA1        PPPGPPPMAYNRPVYPPPQFQQEQAKAQLSNGYNNPN------VNASNMYGPPQNMSLPP    114
TbMCA2      -----------TQLC-----DAGQLADYVGLGWLNAVSSQPYLVQALGLQPPPRRVDVDA    49

YCA1        P--QTQTIQGTDQPYQYSQC-TGRRKALIIGINYIGSKNQLRGCINDAHNIFNFLTNGYG    171
TbMCA2      AFRDAKGLH-GHQPWVATPLPGQTVRALFIGINYYGTSAALSGCCNDVKQMLATLQK-KG    107

YCA1        YSSDDIVILTD--DQNDLVRVPTRANMIRAMQWLVKDAQPNDSLFLHYSGHGGQTEDLDG    229
TbMCA2      LPINEAVILVDEDNFPGRTDQPTRDNIVRYMAWLVKDAKPGDVLFFHYSGHGTQCKS-RG    166

YCA1        DEEDGMDDVIYPVDFETQGPIIDDEMHDIMVKPLQQGVRLTALFDSCHSGTVLDLPYTYS    289
TbMCA2      DSDEKYDQCIAPVDFQKSGCIVDDDIHKLLFSRLPEKVRLTAVFDCCHSGSIMDLPFTYV    226

YCA1        TKGIIKEPNIWKDVGQDGLQAAISYATGNRAALIGSLGSIFKTVKGGMGNNVDRERVRQI    349
TbMCA2      CSGGEQASGTP-----------------------------------------HMKRIREG    245

YCA1        KFSAADVVMLSGSKDNQTSADAVEDGQ------NTGAMSHAFIKVMTLQ-PQQSYLSLLQ    402
TbMCA2      NDVLGDVMMISGCADEQTSADVKNTATFGTGSTGAGGAATQCITCMLMNNQSLSYGKLLI    305

YCA1        NMRKEL-AGKYSQKPQLSSSHPIDVNLQFIM-----------       432
TbMCA2      ETRDMLKRKGFKQVPQLSASKAIDLDQTFSLTEMFSVDRSIQ       347
```

Alinhamento das sequências primárias da YCA1 e TbMCA2. Na primeira linha a YCA1, contendo em seu composição 432 aminoácidos e na segunda linha a TbMCA2, contendo em sua composição 347 aminoácidos. Em amarelo é destacado o alinhamento das cisteínas, $Cys^{155}$ da YCA1 e $Cys^{92}$ da TbMCA2. Em azul o alinhamento das cisteínas catalíticas, $Cys^{276}$ da YCA1 e $Cys^{213}$ da TbMCA2.

Existem diversas técnicas desenvolvidas ao longo dos anos para a realização das mutações sítio dirigidas empregando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e que foram aprimoradas com o passar dos anos. A primeira estratégia traçada para realizar a mutação neste trabalho foi através da técnica mais conhecida e utilizada, a *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis System* (Stratagene), que consiste em utilizar em uma mesma reação de PCR pares de *primers* complementares contendo a troca do códon para a mutação, a fim de amplificar totalmente o plasmídeo realizando a mutação pontual no gene, entretanto, o uso dessa metodologia foi ineficiente durante os nossos experimentos, uma vez que a amplificação do plasmídeo total não foi eficaz. Acredita-se que isso pode ocorrer devido a hibridização dos *primers* que, por serem complementares, pode levar ao alinhamento e formação de "dímeros", reduzindo o rendimento da reação (EDELHEIT; HANUKOGLU; HANUKOGLU, 2009).

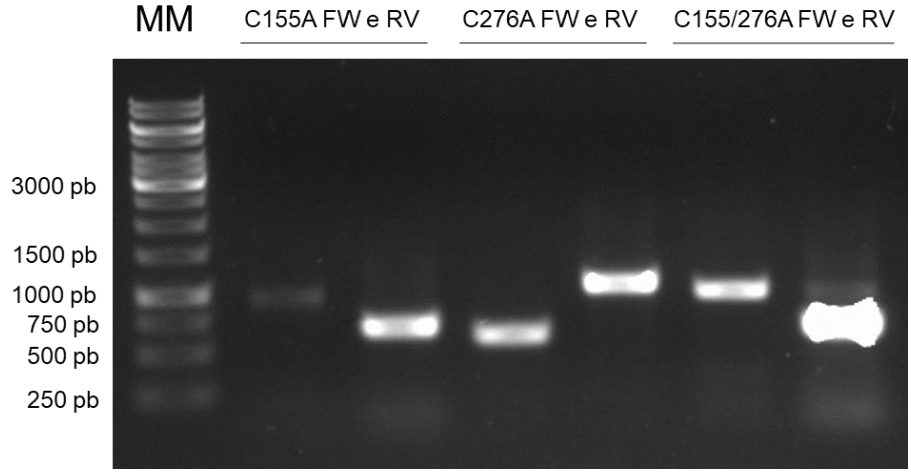
Com o intuito de evitar esse problema, utilizamos uma técnica alternativa para a obtenção dos mutantes da YCA1, que consiste na metodologia de sobreposição de *primers* descrita por Ho *et al.* (1989). A estratégia se baseia na realização de reações de PCR utilizando os *primers forward* e *reverse* separadamente. Assim, essa metodologia permite que sejam realizadas mutações de inserção, deleção e/ou substituição. O tipo de mutação sítio dirigida escolhida para esse trabalho foi a de substituição, nesse sentido, realizamos a troca de pares de bases que codificam um aminoácido importante na estrutura da proteína por outro, no caso para as mutações foi escolhido a troca por uma alanina. A escolha do aminoácido alanina ocorreu devido a sua estrutura simples e comum em proteínas, além da sua cadeia lateral curta, características que não impõem modificações e perturbações na estrutura secundária e terciária da proteína (GIBBS; ZOLLER, 1991).

A metodologia de amplificação através da sobreposição de *primers* é realizada em duas etapas. Na primeira etapa (PCR I) ocorre a amplificação de fragmentos que serão complementares utilizando *primers* (A e D) flanqueadores do gene e *primers* (B e C) internos contendo a mutação desejada, conforme demonstrado na Figura 14 apresentada no item 3.1.3.

Os *primers* B e C são responsáveis por realizar a troca do códon original pelo mutado, já que carregam essa alteração na sua sequência. Nessa primeira etapa, os fragmentos gerados desses mutantes são complementares entre si, um fator importante na segunda etapa dessa metodologia.

Como descrito no item 3.1.3, as reações são realizadas usando os *primers* separadamente, criando assim os fragmentos AC e DB (Figura 15). O fragmento DB é correspondente a reação PCR-I *forward* (FW) e o fragmento AC é correspondente a reação PCR-I *reverse* (RV), de forma que foi amplificado da região 5’-3’ até o local da mutação. Para as reações, foram utilizados os *primers* da região T7, que flanqueiam o gene no plasmídeo e, por esse detalhe, somam-se as regiões amplificadas os pares de bases correspondentes a região T7 do pET28(a)+, em torno de 300 pb. Na Figura 17 são demonstradas as amplificações realizadas nessa primeira etapa para a mutação dos resíduos $Cys^{155}$ e $Cys^{276}$, gerando os mutantes C155A, C276A e C155/276A.

**Figura 17** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação gerado na primeira etapa da reação de sobreposição de *primers*




Linhas: (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; Produtos da amplificação da PCR I-FW e PCR I-RV do mutante C155A, apresentando 1001 pb e 659 pb, respectivamente; Produtos da amplificação da PCR I-FW e PCR I-RV do mutante C276A, apresentando 633 pb e 1027 pb, respectivamente; Produtos da amplificação da PCR I-FW e PCR I-RV do mutante C155/276A, apresentando 1001 pb e 659 pb, respectivamente.

A partir da quantidade de pares de bases das bandas obtidas (Tabela 6) conseguimos avaliar que as amplificações dos fragmentos DB e AC foram realizadas com sucesso para todos os mutantes. As bandas obtidas quando somadas confirmaram a quantidade de pares bases referente ao tamanho do gene (1299pb) junto com a quantidade de pares de bases acrescentados através da amplificação da região T7 (361pb), os valores demonstrados na tabela são aproximados.

**Tabela 6** – Quantidade de pares de bases aproximado dos fragmentos obtidos nas reações de PCR I (FW e RV) dos mutantes C155A, C276A e C155/276A.

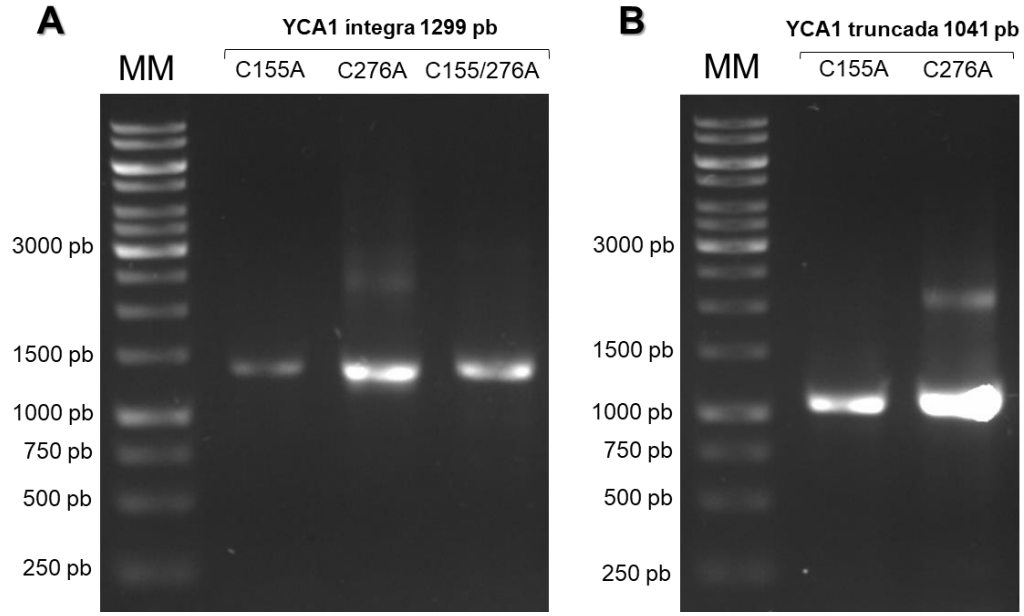
| Mutante | PCR-I FW | PCR-I RV |
|---|---|---|
| C155A | 1001 pb | 659 pb |
| C276A | 633 pb | 1027 pb |
| C155/276A | 1001 pb | 659 pb |

Com a confirmação dos fragmentos gerados na primeira etapa (PCR I), prosseguimos para a segunda etapa de PCR (PCRII). Nessa reação ocorre a sobreposição das regiões complementares amplificadas através dos *primers* (B e C) da mutação. Para a PCR II utilizamos *primers* específicos para amplificação do gene da YCA1 em sua forma íntegra ou truncada. Nas reações, foram usados na mesma proporção os fragmentos obtidos anteriormente, PCR-I FW e PCR-I RV, e a mudança

para obtenção da forma íntegra e truncada ocorreu apenas pela troca do *primer forward*. Os *primers* foram projetados visando a posterior reação do TEDA, acrescentando uma pequena sequência de pares de bases para reconhecimento e clivagem pela T5 exonuclease – uma enzima com função de retirar bases nitrogenadas do DNA no sentido 5'-3' – e que são complementares as extremidades da amplificação do plasmídeo pET28(a)+ na mesma região.

Como demonstrado na Figura 14, a região B e C se hibridizam nessa PCR e formam o molde para que os *primers* TEDA amplifiquem o gene contendo a mutação, gerando como produto final um único fragmento. A Figura 18 demonstra os fragmentos obtidos na amplificação das formas íntegras e truncadas dos mutantes da YCA1.

**Figura 18** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação da segunda etapa da reação de sobreposição de *primers*




Linhas: (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; (A) PCR II dos mutantes íntegros, YCA1 C155A, YCA1 C276A e YCA1 C155/276A. (B) PCR II dos mutantes truncados, respectivamente, tYCA1 C155A e tYCA1 C276A.

Através da análise das bandas obtidas confirmamos que a reação da PCR II ocorreu como esperado. Os fragmentos se hibridizaram e geraram os produtos finais no tamanho de ~1299 pb para os mutantes da YCA1 íntegra e ~1041 pb para os mutantes da tYCA1. Com as amostras purificas e dosadas, prosseguimos para a reação do TEDA.

## 4.2 CLONAGEM COM T5 EXONUCLEASE (TEDA)

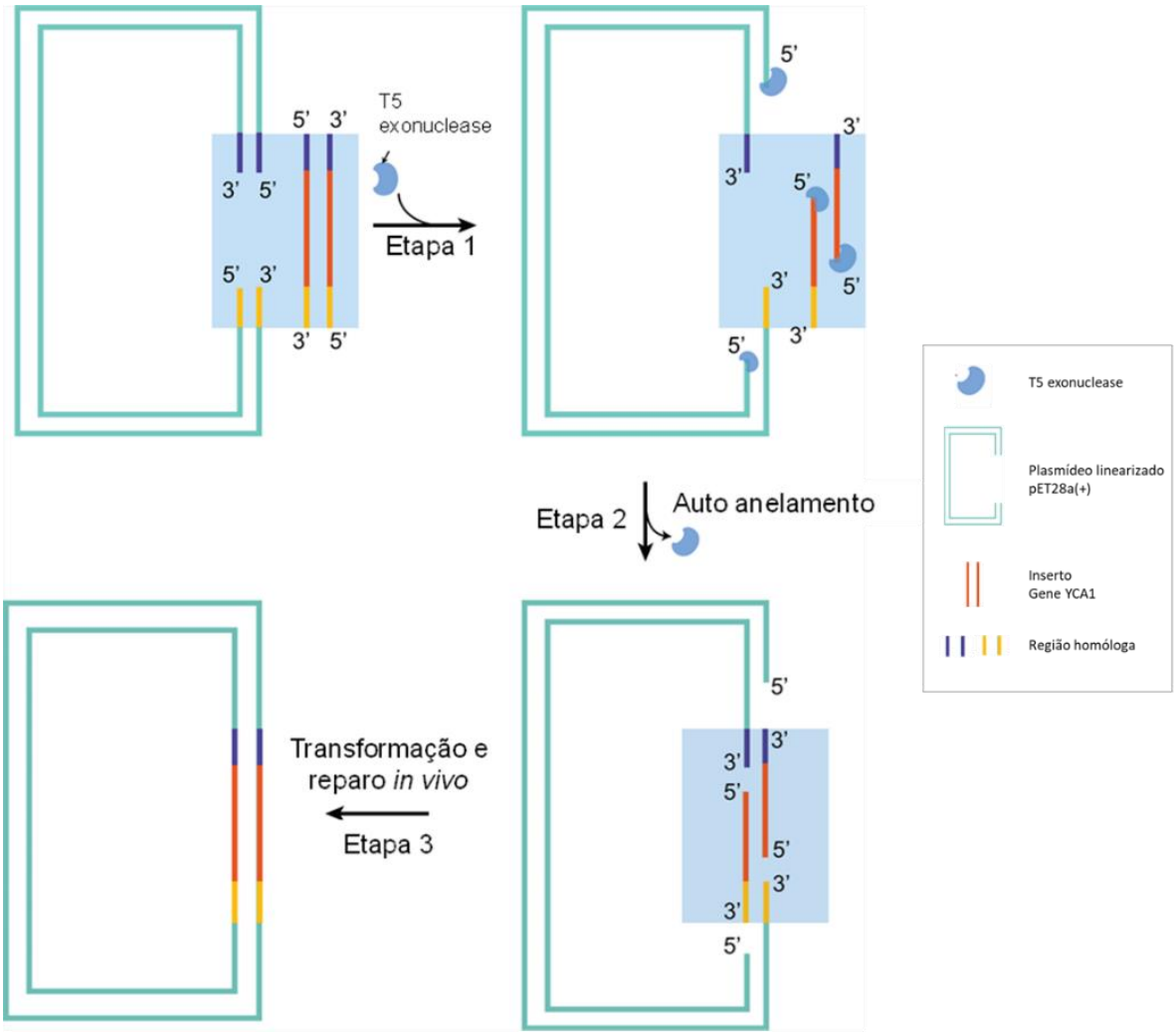
O uso dos *primers* específicos do TEDA na segunda etapa de amplificação foi utilizado baseando-se na montagem do DNA através da reação com a enzima T5 exonuclease. O primeiro método desenvolvido para a realização de clonagens foi através da digestão com enzimas de restrição e posterior ligação dos fragmentos complementares com DNA ligase (COHEN *et al.*, 1973). Embora ainda seja o método mais utilizado, ao tentarmos aplicar não obtivemos eficiência no desenvolver do trabalho e optamos por seguir com técnicas mais recentes.

Diferentes métodos de clonagem foram desenvolvidos na última década, visando a melhoraria na eficiência e geração de protocolos mais rápidos, simples e econômicos. Métodos foram desenvolvidos aprimorando a técnica mais convencional, que geram fragmentos com extremidades coesivas, e outros foram projetados de modo a obter os produtos com princípios diferentes, como ocorre nas técnicas *in vivo* e *in vitro* que utilizam de sequências homólogas (CHAO; YUAN; ZHAO, 2015).

As técnicas voltadas à montagem de DNA *in vitro* em geral são métodos fáceis e confiáveis, entretanto com custos altos por conta do uso de várias enzimas, como ocorre no método de Gibson no qual utilizam-se três enzimas; a T5 exonuclease, Phusion DNA polimerase e a Taq DNA ligase (CHAO; YUAN; ZHAO, 2015; XIA *et al.*, 2019).

O método T5 exonuclease DNA assembly (TEDA), foi projetado baseando-se na clonagem através de fragmentos de DNA com extremidades homólogas utilizando apenas uma enzima, a T5 exonuclease que é capaz de retirar bases nitrogenadas do DNA na direção 5’-3’ durante a incubação na presença de sequências com extremidades homólogas e do vetor linearizado. Assim, a T5 degrada a extremidade 5’ e gera fragmentos com extremidades 3’, passando de pontas cegas a pontas coesivas, que posteriormente se hibridizam uns aos outros. Portanto, no momento em que o produto dessa incubação é transformado em células hospedeiras, ocorre o reparo *in vivo* das lacunas pela ação das enzimas DNA polimerase e ligase, como demonstrado na Figura 19, onde a polimerase preenche os pares de bases nas lacunas entre as fitas complementares e ligase faz a ligação fosfodiéster entre os fragmentos formados (XIA *et al.*, 2019).

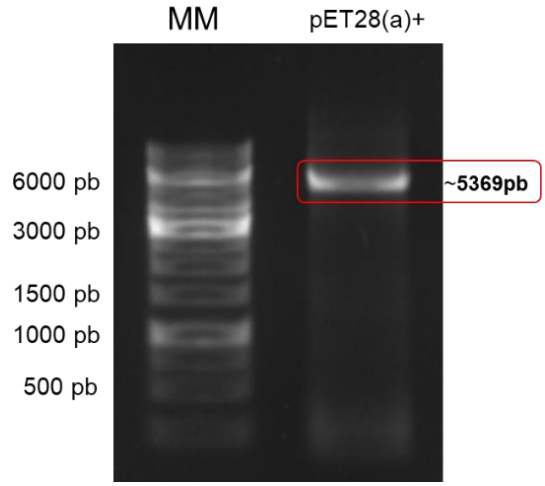
**Figura 19** – Método T5 exonuclease DNA assembly (TEDA)




Fonte: Xia *et al.* (2019, p. 2 – com adaptação)
Representação da ação da T5 exonuclease na reação do TEDA. O retângulo de linha dupla com uma lacuna representa um plasmídeo linearizado. As linhas verticais duplas representam o inserto. Linhas com a mesma cor indicam a região homóloga. Na primeira etapa 1: a exonuclease T5 corta as extremidades 5' do plasmídeo linearizado e do inserto para gerar as extremidades complementares. Etapa 2: Os fragmentos se anelam por complementariedade e se ligam uns aos outros. Etapa 3: O DNA é transformado em células *E. coli* DH5α e as lacunas são reparadas *in vivo*.

Para realizar a clonagem através do TEDA é necessário obter o vetor linearizado no qual o gene será inserido, e para nosso trabalho utilizamos o pET28(a)+, que foi amplificado utilizando os *primers* do TEDA. Na Figura 20 observamos o resultado dessa amplificação e por meio dos pares de bases do fragmento gerado, confirmamos a obtenção do plasmídeo linearizado.

**Figura 20** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação do vetor



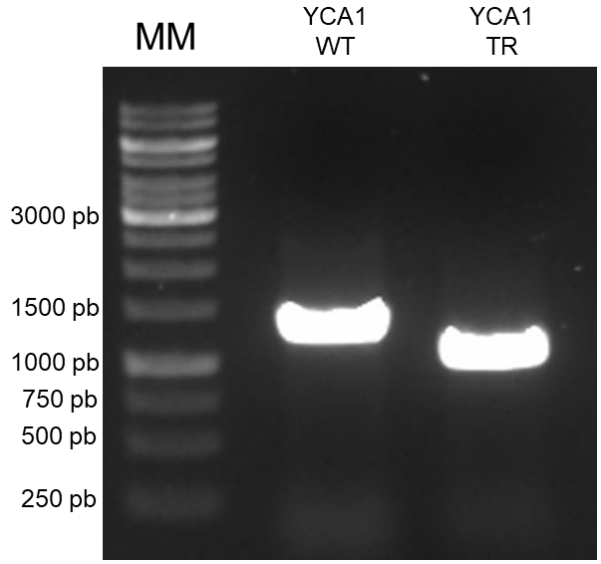

Linhas: (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; PCR de amplificação do vetor pET28(a)+ linearizado.

O DNA utilizado como molde para a reação de amplificação do vetor é proveniente de *E. coli,* obtido através de extração plasmidial por miniprep, e por esse motivo é um DNA metilado. A metilação do DNA é um processo realizado pelas bactérias afim de marcar e proteger seu próprio material genético contra a degradação quando, por exemplo, ocorre a invasão da célula por vírus. Assim, ocorre a distinção do DNA bacteriano para o DNA viral, com a marcação de um grupamento metil, portanto o material genético não marcado do vírus é degradado por enzimas de restrição de outras classes (LU; PATEL; BISSLER, 2002; MIERZEJEWSKA *et at.*, 2014). Com base nisso, realizamos a etapa de digestão do produto da amplificação com a enzima de restrição DpnI, uma endonuclease utilizada para clivar o DNA metilado, com a finalidade de degradar o material molde utilizado na reação de amplificação e assim evitar que na próxima etapa esse plasmídeo não esteja presente nas nossas bactérias quando formos realizar a extração do produto da transformação.

Após a digestão com DpnI, prosseguimos com a reação de clonagem, realizando a purificação dos produtos amplificados, assim como descrito no item 3.3. Com a finalidade de testar a técnica TEDA, realizamos a reclonagem da forma íntegra (WT) e truncada (TR) da YCA1.

Primeiramente, amplificamos o gene da YCA1 usando os *primers* TEDA, YCA1 *forward* e YCA1 *reverse* para obter a forma íntegra, e tYCA1 *forward* e YCA1 *reverse* para a forma truncada. Confirmamos a amplificação em gel de agarose (Figura 21). Como resultado, obtivemos bandas representando a forma íntegra com 1299 pb e a truncada com 1041 pb.

**Figura 21** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação com os *primers* TEDA



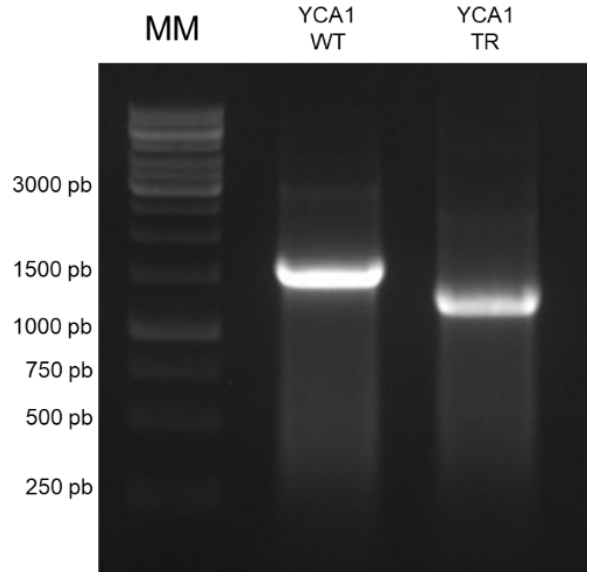

Linhas: (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; PCR de amplificação da YCA1 íntegra (WT); PCR de amplificação da YCA1 truncada (TR).

As amostras obtidas após purificação foram quantificadas em nanodrop. Os valores obtidos foram utilizados no cálculo de proporção para a reação do TEDA, que foram preparadas 1:4 (vetor/inserto) usando 100 ng de vetor e a quantidade do inserto foi calculado como descrito no item 3.3. Prosseguimos com a incubação e após, submetemos o produto a etapa de transformação através de choque térmico em cepas de *E. coli* DH5α, a escolha dessa cepa foi baseada na sua capacidade em estabilizar e amplificar o DNA inserido (KOSTYLEV *et al.*, 2015).

Os clones foram selecionados através do crescimento em meio de cultura com antibiótico canamicina, uma vez que o pET28(a)+ confere resistência a este antibiótico. Escolhemos aleatoriamente algumas colônias para realizarmos uma PCR confirmatória (resultado não demonstrado) e posteriormente selecionamos uma dessas colônias de cada para realizar a extração do plasmídeo através de miniprep.

Confirmamos o sucesso da clonagem através do resultado obtido após amplificação do produto da miniprep com os *primers* da região promotora e terminadora T7 (Figura 22). Utilizamos esse *primer*, pois a região T7 flanqueia o gene de interesse no vetor pET28(a)+, e se houve a ligação do gene ao plasmídeo haverá uma banda referente aos pares de bases desse somando-se ao da região T7, que acrescenta em torno de 300 pb.

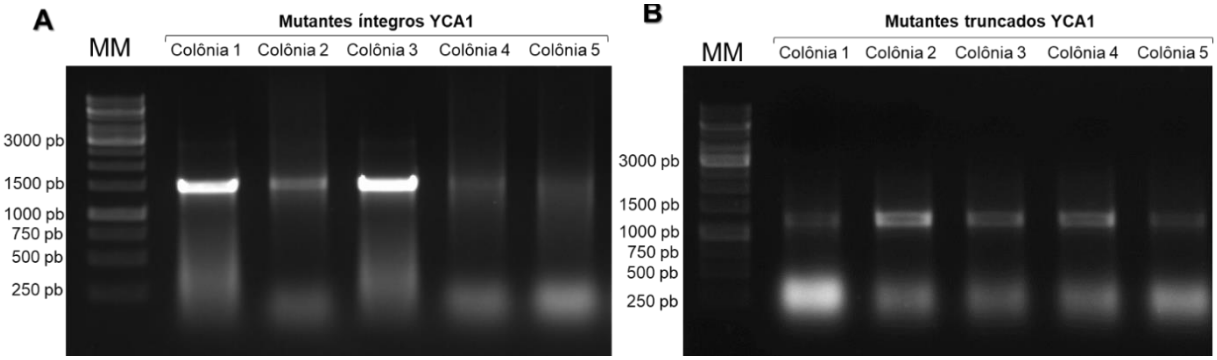
**Figura 22** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação com os *primers* da região T7




Linhas: (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; PCR do DNA plasmidial extraído da forma íntegra (YCA1 WT) e da forma truncada (YCA1 TR) da YCA1.

Podemos observar que a quantidade de pares de bases das bandas é condizente ao esperado, para a forma íntegra 1599 pb e para a forma truncada 1341 pb. Com a confirmação da eficiência do protocolo, aplicamos a mesma metodologia para a clonagem dos mutantes íntegros e truncados. A proporção de vetor/inserto utilizada nas reações foi a mesma (1:4), e após a obtenção das colônias confirmamos os clones positivos através da reação de amplificação com os *primers* da região T7 (Figura 23).

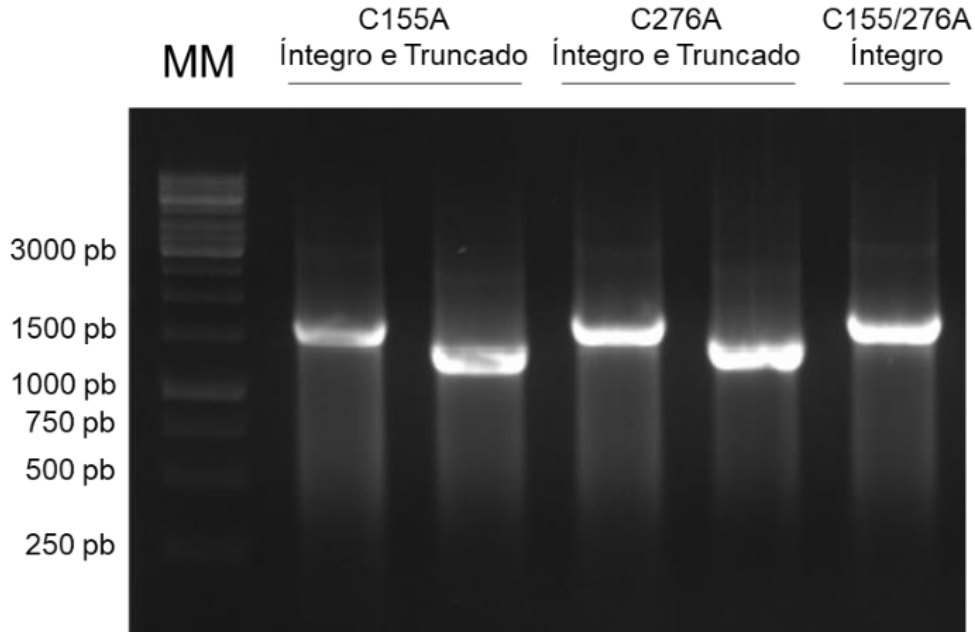
**Figura 23** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação dos plasmídeos obtidos em colônias de *E. coli* DH5α




Linhas: (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; (A) PCR de colônia da YCA1 íntegra mutante, na imagem como exemplo 5 colônias do mutante C155A; (B) PCR de colônia da tYCA1 mutante, na imagem como exemplo 5 colônias do mutante C276A.

Dentre os clones positivos, selecionou-se uma colônia de cada mutante para o preparo do pré-inóculo a fim de realizar a extração do DNA plasmidial por miniprep, obtido utilizando o kit comercial. Após a extração, o material adquirido foi submetido a uma amplificação utilizando os *primers* da região T7, assim como foi realizado anteriormente, para confirmamos a integridade dos plasmídeos. Na Figura 24 é demonstrado o resultado após eletroforose em gel de agarose do produto da amplificação dos plasmídeos extraídos, confirmando através dos fragmentos as formas íntegras e truncadas dos mutantes.

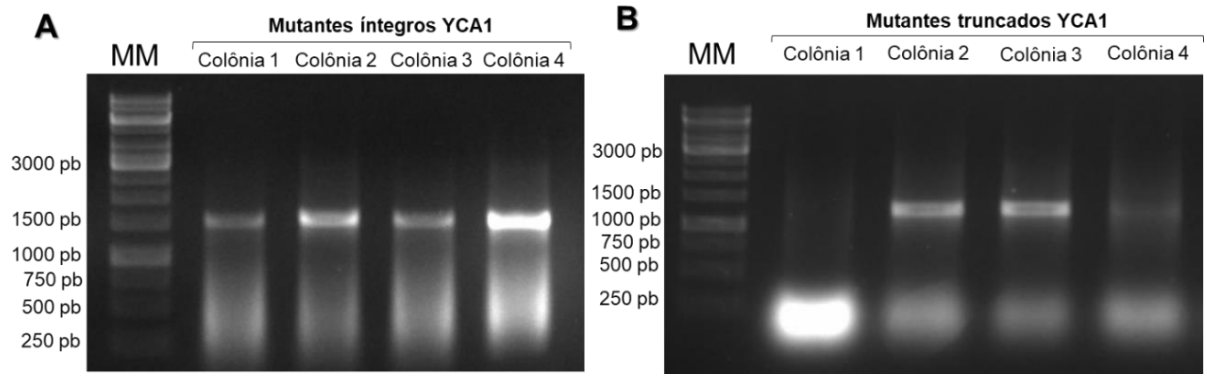
**Figura 24** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação do DNA plasmidial com os *primers* da região T7




Linhas: (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; Mutantes da YCA1 íntegros e truncados, respectivamente, YCA1 C155A, tYCA1 C155A, YCA1 C276A, tYCA1 C276A e YCA1 C155/276A.

Com a confirmação da clonagem, prosseguimos para submeter o produto da extração plasmidial por miniprep a etapa de transformação do produto em cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS com o objetivo de prepararmos os ensaios para a expressão das proteínas. A transformação foi feita por choque térmico e após a obtenção das colônias, confirmamos através da amplificação com os *primers* da região T7 a obtenção dos clones íntegros e truncados dos mutantes nas cepas de expressão, assim como foi realizado anteriormente (Figura 25).

**Figura 25** – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação dos plasmídeos obtidos em colônias de *E. coli* BL21(DE3)pLysS




Linhas: (MM) marcador molecular GeneRuler 1kb; (A) PCR de colônia da YCA1 íntegra mutante, na imagem como exemplo 4 colônias do mutante C155/276A; (B) PCR de colônia da tYCA1 mutante, na imagem como exemplo 4 colônias do mutante C276A.

Com o sucesso da transformação, seguimos para realizarmos os ensaios de expressão através das cepas *E. coli* BL21(DE3)pLysS para obtenção das proteínas.

## 4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

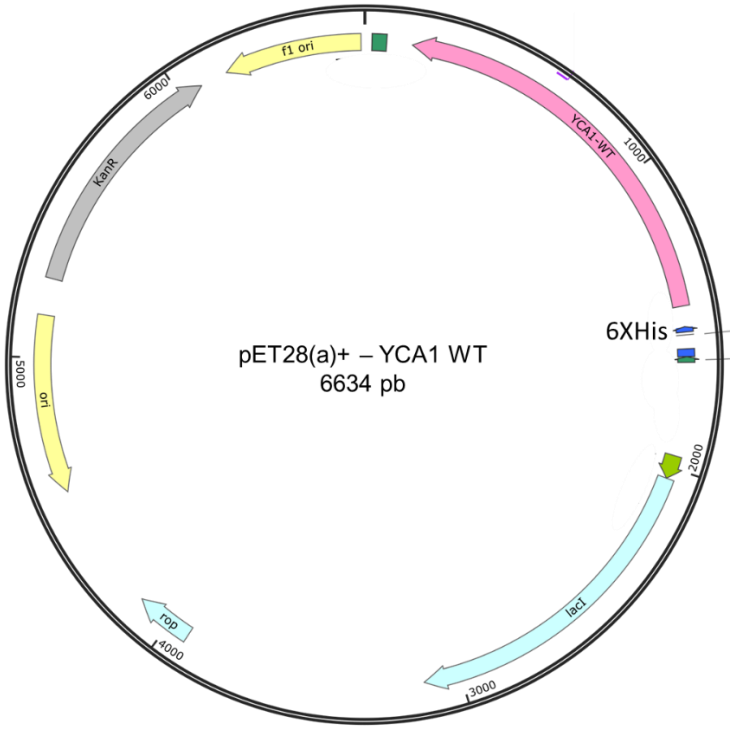
A *E. coli* é um dos microrganismos mais utilizados na produção de proteínas recombinantes, por ser uma bactéria de baixo custo, rápido crescimento e fácil de ser manipulada geneticamente (JIA; JEON, 2016). A escolha da cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS foi realizada por possuir em seu material o gene codificante da T7 RNA polimerase e outras características que a tornam uma boa escolha para expressão de proteínas recombinantes com alta eficiência. Contém um plasmídeo codificador de lisozima, enzima que inibe a T7 para que não haja expressão basal de proteínas que podem ser tóxicas a célula, e isso ocorre de forma que não interfira na expressão da proteína alvo após a indução. Além dessas características, a cepa possui deletado do seu genoma as informações para produção das proteases *Lon* e *OmpT*, que degradam proteínas estranhas ao microrganismo (STUDIER; MOFFATT, 1986; GOPAL; KUMAR, 2013).

A expressão da proteína é induzida por uma molécula análoga da lactose, o Isopropil-β-D-tiogalactosidase (IPTG), pois ele regula a transcrição da T7 RNA polimerase e consequentemente a expressão do gene. O gene de interesse está inserido no vetor de expressão pET28(a)+ (Novagen), um dos plasmídeos mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes, pois consegue produzir

grandes quantidades em um curto período de tempo. O pET28(a)+ possui elementos importantes, tais como: o gene que codifica a resistência ao antibiótico canamicina, possibilitando a seleção de colônias em meio de cultura; possui o *operon lac* e a região T7 (promotora e terminadora) que é regulada pelo repressor *lac*, e quando há lactose presente, o repressor *lac* se desliga do operador *lac* e permite que a T7 RNA polimerase se ligue para transcrever o gene de interesse e assim sintetizar a proteína alvo; possui uma região de poli-histidina (6xHis) que é inserida no N-terminal da proteína recombinante facilitando posteriormente o processo de purificação (GOPAL; KUMAR, 2013; JIA; JEON, 2016; SHILLING *et al.*, 2020).

Realizamos as expressões para as formas íntegras e truncadas a partir de uma colônia positiva selecionada no PCR confirmatório. Os ensaios foram executados como descrito no item 3.6. O gene da metacaspase YCA1 codifica a produção de uma proteína de 47,9 kDa, entretanto como citado anteriormente, o pET28(a)+ possui uma região para inserção de uma cauda de histidina (6xHis-Tag) (Figura 26), o que acrescenta alguns aminoácidos ao tamanho da proteína, sem modificar sua estrutura e função.

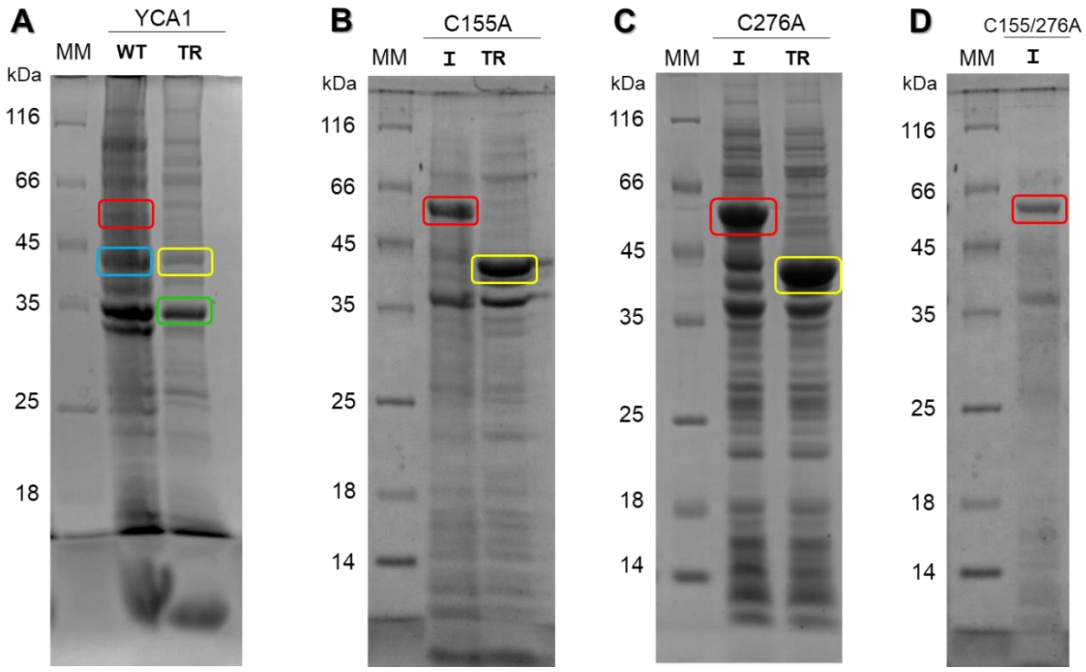
**Figura 26** – Mapa do plasmídeo, pET28(a)+, com o gene da YCA1 inserido




Mapa do pET28(a)+ demonstrando as regiões importantes. Em cinza, Kan, região que codifica a resistência ao antibiótico canamicina; em amarelo, ori, as regiões de origem de replicação; em azul claro, lacI, região do operador lac; em rosa o gene codificador da YCA1; em azul escuro a região de inserção da cauda de histidina.

O resultado após corrida em gel de *SDS-PAGE* e coloração é demonstrado na Figura 27, e a partir das informações anteriores conseguimos observar que as formas íntegras apresentam um peso molecular de aproximadamente 55 kDa e as formas truncadas apresentam um peso molecular de aproximadamente 43 kDa.

**Figura 27** – *SDS-PAGE da* análise da expressão das proteínas YCA1 íntegras e truncadas




Linhas: (MM) referente ao marcador molecular *Unstained Protein Marker*; (A) YCA1 íntegra (WT) e truncada (TR); (B) C155A íntegra (I) e truncada (TR); (C) C276A íntegra (I) e truncada (TR); (D) C155/276A íntegra (I). Retângulo em vermelho: expressão da forma íntegra. Retângulo em amarelo: expressão da forma truncada. Retângulo em azul: isoforma íntegra após processamento. Retângulo em verde: isoforma truncada após processamento.

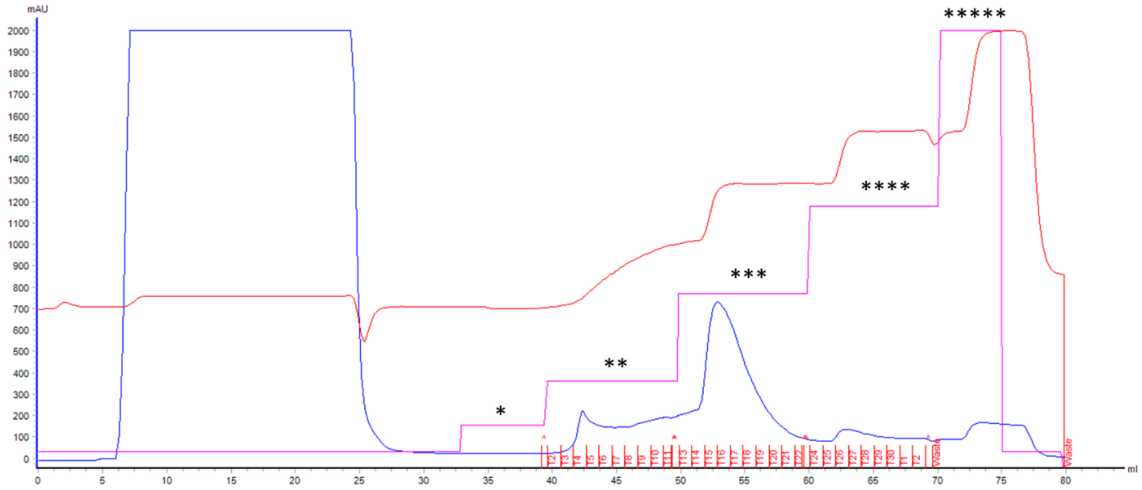
A YCA1 é expressa como uma pró-enzima constituída por um pró-domínio em seu N-terminal, uma subunidade grande ($P_{20}$) e uma subunidade pequena ($P_{10}$) (MADEO *et al.*, 2002b). Foi proposto por Wong, Yan e Shi (2012) que o autoprocessamento da metacaspase YCA1 resulta na clivagem dos seus domínios N-terminal e C-terminal, liberando no primeiro autoprocessamento dois fragmentos, uma subunidade grande (~43 kDa) e uma subunidade pequena (~12 kDa), respectivamente, sendo que a subunidade grande sofre, posteriormente, outro processamento, mais lento que o primeiro, gerando um fragmento com peso molecular de ~31 kDa. O autoprocessamento da metacaspase está relacionado diretamente com o aumento da sua atividade catalítica, permitindo que a enzima tenha ação sobre substratos proteícos grandes e não apenas oligopeptídeos (MOSS *et al.*, 2007; GILIO

*et al.*, 2017). A forma íntegra, quando processada, libera os fragmentos com peso molecular em torno de 43 kDa e 12 kDa, e a forma truncada libera os fragmentos com peso molecular em torno de 31 kDa e 12 kDa. A liberação desses fragmentos, resultantes do autoprocessamento, é demonstrada para os mutantes nas imagens após purificação, pois ocorrem de forma diferente.

Existem diversos métodos para purificação de proteínas recombinantes, as variáveis da estrutura da proteína e do vetor de expressão irão dizer qual a melhor escolha para rendimento, pureza e principalmente solubilidade da amostra. Geralmente, a técnica mais utilizada é a de cromatografia de afinidade realizada através da marcação do N-terminal ou C-terminal da proteína com pequenas sequências de aminoácidos que terão afinidade pela resina utilizada na coluna. Apesar de ser uma técnica muito eficiente, pode ocorrer a ligação de proteínas indesejadas a resina, que são eluídas posteriormente junto a proteína alvo. Para evitar esse problema, utilizam-se de purificações adicionais a partir de métodos diferentes, como a cromatografia de exclusão por tamanho e de troca iônica (MISHRA, 2020). Por esses fatores, nesse trabalho, utilizamos dois métodos de purificação, a fim de obtermos uma proteína com alto grau de pureza. Primeiramente, realizou-se uma cromatografia de afinidade para separar a proteína alvo das outras, e, posteriormente uma cromatografia de exclusão molecular para separar o sal imidazol utilizado na eluição da mesma.

O primeiro passo para a purificação do lisado das expressões da YCA1 foi utilizar uma resina de afinidade Níquel-Sepharose acoplada a um sistema automatizado de cromatografia líquida em coluna, modelo AKTA-Start (GE Healthcare), conforme descrito no item 3.9. A escolha da resina foi baseada na inserção da cauda de seis histidinas no N-terminal da proteína promovida pelo vetor pET28(a)+ durante a clonagem. O material injetado na coluna foi eluido por concentrações crescentes de imidazol (50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM e 500 mM). No eixo Y do cromatograma temos a absorbância em comprimento de onda de 280 nm. É possível verificar que, conseguimos acompanhar a eluição da amostra através do pico apresentado na eluição em 200 mM de imidazol (Figura 28). O cromatograma demonstrado foi padrão para todas as proteínas purificadas, variando apenas na altura do pico em 200 mM.

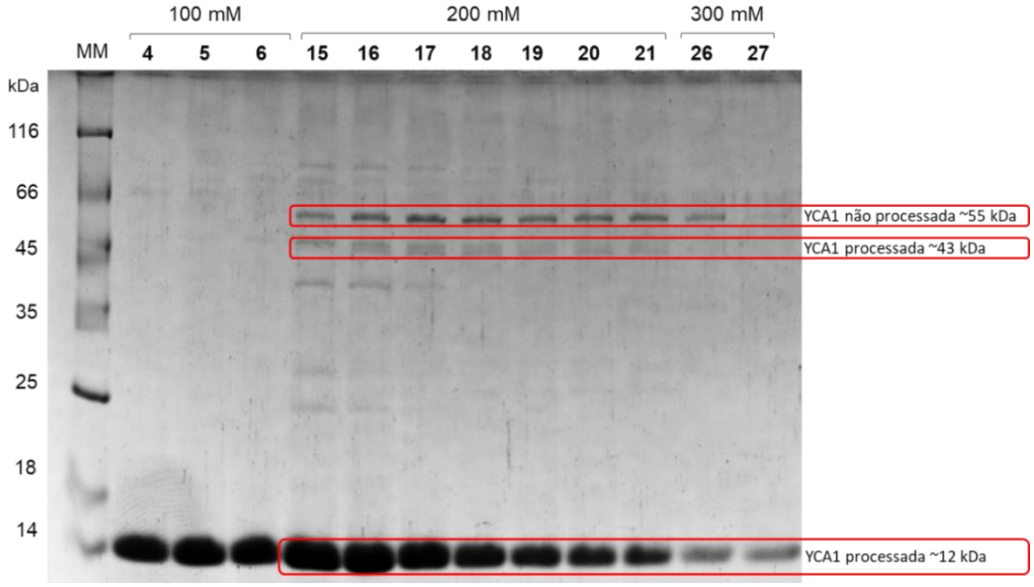
**Figura 28** – Cromatograma da purificação da YCA1 íntegra em coluna de resina de afinidade $Ni^{2+}$-Sepharose




No cromatograma a linha vermelha representa a condutividade. Linha azul, o perfil de purificação com absorbância monitorada em 280 nm. Linha rosa, o limiar de concentração de imidazol, sendo 50 mM (*), 100 mM (**), 200 mM (***), 300 mM (****) e 500 mM (*****), e as frações eluídas identificadas pelos números em vermelho demonstrando a sequência de tubos colhidos.

O material eluido nas concentrações de 100 mM, 200 mM e 300 mM foram coletados e avaliados através de eletroforese em gel *SDS- PAGE* (Figura 29), para verificarmos se a amostra foi purificada com eficiência. Como o perfil de purificação é idêntico para todas as formas das enzimas produzidas, ilustramos esse processo com a YCA1 íntegra.

**Figura 29** – *SDS-PAGE* das frações eluídas no cromatograma



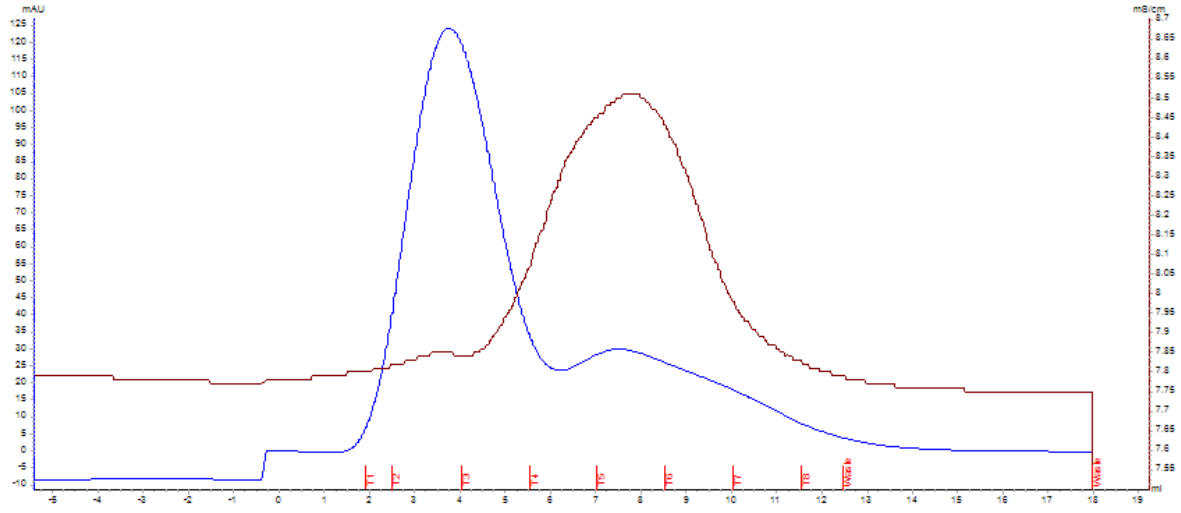

Linhas: (MM) referente ao marcador molecular *Unstained Protein Marker*. Número das linhas referentes aos tubos coletados nas eluições de 100 mM, 200 mM e 300 mM de imidazol. Retângulo em vermelho destacando as bandas referentes a isoformas não processadas e após autoprocessamento.

A análise dessa etapa demonstrou que a proteína foi eluída na presença 200 mM de imidazol, em duas isoformas, não processada com aproximadamente 55 kDa e em sua forma processada que libera dois fragmentos de aproximadamente 43 kDa e 12 kDa. Os números das canaletas são referentes aos tubos colhidos de acordo com a eluição no cromatograma.

Com o material obtido na primeira purificação, seguimos para a realização da segunda etapa de purificação, que consistiu em utilizar o método de cromatografia por exclusão molecular para retirar o sal imidazol, uma vez que esse quelante pode interferir na atividade catalítica da YCA1 que é uma enzima dependente do íon $Ca^{2+}$ para sua atividade (MACHADO *et al.*, 2013). Para essa etapa utilizamos uma coluna HiTrap® Desalting com resina Sephadex, uma matriz polimérica que contendo pequenos poros nos quais moléculas menores podem migrar enquanto moléculas maiores passam direto. Portanto, as moléculas menores ficarão mais tempo retidas na coluna e só irão sair com um maior tempo de eluição, enquanto as moléculas maiores terão menor tempo de retenção e sua saída da coluna será rápida (ULIYANCHENKO, 2014).

A Figura 30 representa o cromatograma padrão obtido nessa segunda etapa de purificação das formas íntegras e truncadas da YCA1.

**Figura 30** – Cromatograma da dessalinização da YCA1 em coluna de exclusão molecular HiTrap

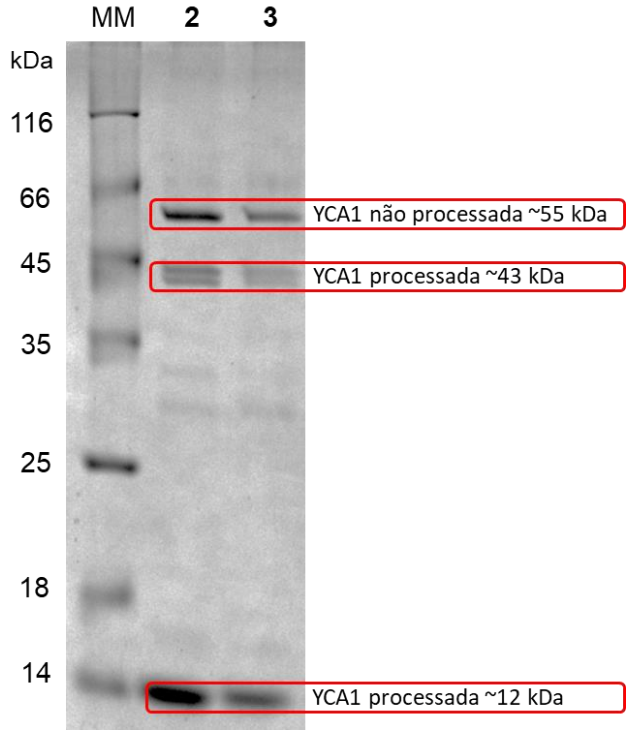



No cromatograma a linha em azul a amostra monitorada em absorbância de 280 nm. A linha marrom monitora a condutividade. Em vermelho temos as alíquotas referentes a eluição.

No exemplo é utilizado a dessalinização da forma íntegra da YCA1, o cromatograma demonstra que primeiramente a proteína foi eluída, onde observamos um pico em azul referente ao λ = 280 nm, e posteriormente observamos um pico em marrom referente a condutividade do imidazol e sua saída. Demonstrando assim a separação da proteína e do sal.

As amostras colhidas na purificação foram analisadas através de eletroforese em gel de *SDS-page*. O resultado demonstrou que a proteína foi eluída com sucesso, pois é visível as mesmas formas obtidas na purificação, as formas não processada e processada (Figura 31).

**Figura 31** – *SDS-PAGE* das frações eluídas no cromatograma da dessalinização

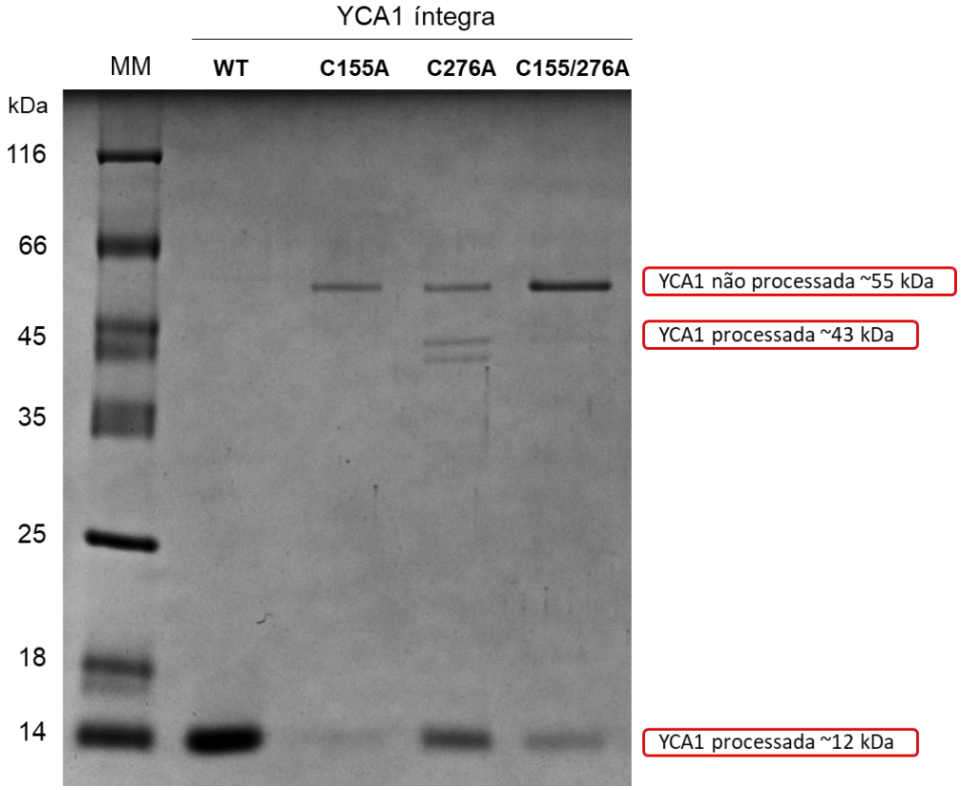



Linhas: (MM) referente ao marcador molecular *Unstained Protein Marker*. Número das linhas referentes aos tubos coletados na eluição da cromatografia de exclusão molecular. Retângulo em vermelho destacando as bandas referentes a isoformas não processadas e após autoprocessamento.

Após realizarmos as purificações para todos os mutantes da YCA1, íntegros e truncados, preparamos um *SDS-PAGE* com as concentrações de proteínas padronizadas em 30 μM, que foi possível encontrar conforme demonstrado no item 3.11, com o intuito de avaliarmos o efeito das mutações sobre o processamento da YCA1. Na Figura 32 é demonstrado a YCA1 em sua forma íntegra sem a mutação

(WT), e com as mutações nos resíduos, respectivamente, cisteína ($Cys^{155}$), cisteína catalítica ($Cys^{276}$) e duplo das cisteínas ($Cys^{155}$ e $Cys^{276}$).

**Figura 32** – *SDS-PAGE* das amostras após purificação da YCA1 íntegra e dos mutantes com concentrações padronizadas




Linhas: (MM) marcador molecular *Unstained Protein Marker*. YCA1 íntegra e mutantes íntegros, respectivamente, YCA1-C155A, YCA1-C276A e YCA1-C155/276A. Retângulo em vermelho destacando as bandas referentes a isoformas não processadas e após autoprocessamento.

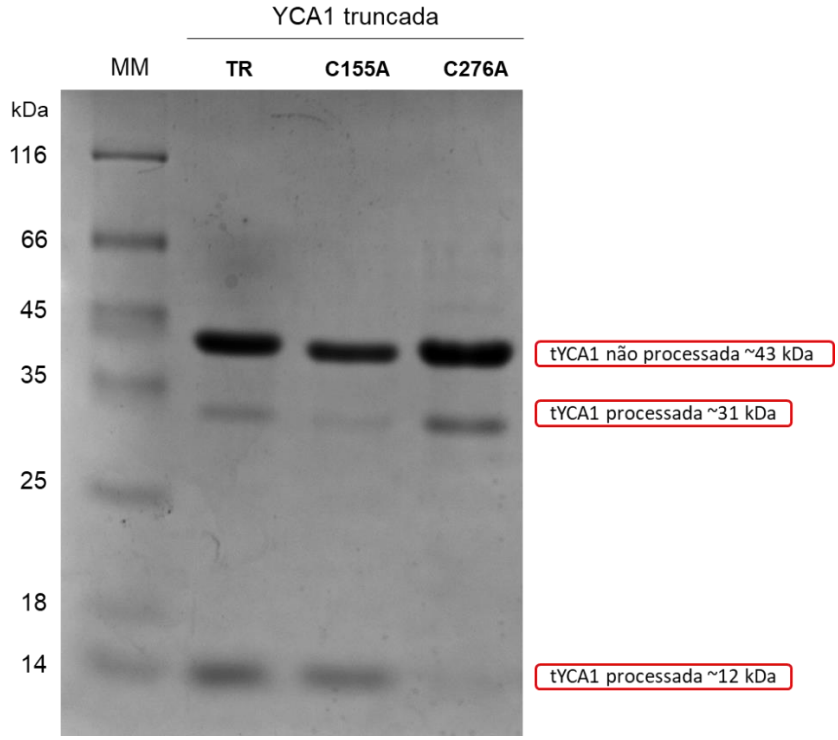
Na análise do *SDS-PAGE* não foi possível visualizar a forma íntegra da YCA1 (YCA1 WT), pois, além do seu baixo rendimento de expressão, após o seu autoprocessamento a forma ativa da enzima se degrada rapidamente, assim como descrito para outras metacaspases, como a TbMCA2 (MCLUSKEY *et al.*, 2012; WONG; YAN; SHI, 2012; KLEMENČIČ; FUNK, 2018). Observamos no mutante da cisteína catalítica (YCA1 C276A) a geração de dois fragmentos com aproximadamente 43 kDa (Figura 32), referente ao seu autoprocessamento. Esse processamento é influenciado pela presença de $Ca^{2+}$, ou seja, sendo que quanto maior a concentração do íon, maior a geração dessa forma processada em dupletos (WONG; YAN; SHI, 2012). Já foi descrito para as metacaspases TbMCA2 e metacaspase 9 de *Arabidopsis thaliana* (AtMC9) a presença de uma segunda cisteína importante para a ativação da enzima, ou seja, seu autoprocessamento, e que esse

resíduo é conservado em todas as sequências dessa classe de cisteíno-proteases e está ausente em caspases e paracaspases. A YCA1 apresenta uma cisteína conservada nessa posição ($Cys^{155}$), equivalente a $Cys^{92}$ da TbMCA2 (MCLUSKEY *et al.*, 2012), dessa forma, o mutante obtido YCA1-C155A obtido foi baseado nessa cisteína e observamos que não ocorreu o autoprocessamento (Figura 31). Além disso, realizamos uma dupla mutação de ambas as cisteína ($Cys^{155}$ e $Cys^{276}$), sendo que também foi observada a ausência do autoprocessamento, comprovando que a $Cys^{155}$ é a cisteína que atua cataliticamente no evento de autoprocessamento. Esse dado corrobora com a literatura, uma vez que estudos realizados com mutantes desta cisteína na TbMCA2 e AtMC9 demonstraram que esse segundo resíduo pode agir como uma cisteína catalítica, responsável pelo autoprocessamento destas enzimas (BELENGHI *et al.*, 2007; MCLUSKEY *et al.*, 2012).

A partir dos nossos resultados, propomos que a $Cys^{155}$ está envolvida no autoprocessamento da YCA1 e, consequentemente, na sua atividade catalítica, visto que é necessário o processamento para a enzima exercer ação sobre substratos proteícos. Diferentemente do que observamos na mutante YCA1-C276A, o processamento manteve-se ativo, corroborando com o que já foi descrito em literatura (WONG; YAN; SHI, 2012), que a $Cys^{276}$ é responsável pela ação de catálise, propondo assim, que depende da ação da $Cys^{155}$ primeiramente para que ocorra o processamento da enzima e a liberação da sua forma ativa, para que então a $Cys^{276}$ exerça sua atividade proteolítica.

A obtenção da forma truncada da YCA1 foi feita a partir da deleção dos 86 resíduos que compõem o N-terminal da proteína, composto em grande parte por resíduos de glutamina e asparagina que geram uma região hidrofóbica, influenciando diretamente na precipitação *in vitro* da YCA1 (ERHARDT; WEGRZYN; DEUERLING, 2010; WONG; YAN; SHI, 2012). Como visto anteriormente, a YCA1 íntegra após sua purificação, apresenta a capacidade de se autodegradar. Em resultados obtidos anteriormente pelo grupo ao produzir a YCA1 truncada observamos maior estabilidade relacionada a precipitação da enzima e um aumento do rendimento da proteína durante sua expressão, o que gera melhores condições para estudos cinéticos e bioquímicos. Na Figura 33 é demonstrado a YCA1 em sua forma truncada e os mutantes truncados após a dessalinização.

**Figura 33** – *SDS-PAGE* das amostras após purificação da YCA1 truncada e dos mutantes com concentrações padronizadas



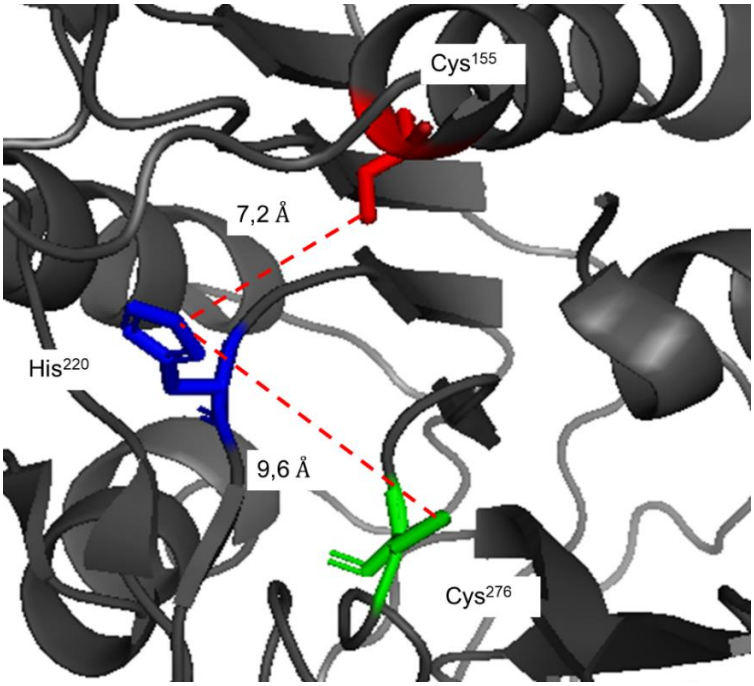

Linhas: (MM) marcador molecular *Unstained Protein Marker*. YCA1 truncada e mutantes truncados, respectivamente, tYCA1-C155A e tYCA1-C276A. Retângulo em vermelho demonstrando as bandas referentes a isoformas não processadas e após autoprocessamento.

Ao realizarmos a deleção do N-terminal retirando os primeiros 86 aminoácidos da enzima para obtermos a YCA1 truncada (tYCA1), evidenciamos que ela apresenta um peso molecular com aproximadamente 43 kDa, peso similar ao observado após o primeiro processamento da YCA1 íntegra. O primeiro processamento foi descrito em literatura como ocorrendo no N-terminal da YCA1, após os resíduos $Arg^{72}$ e $Lys^{86}$ (WONG; YAN; SHI, 2012), entretanto observamos que a tYCA1 e os mutantes tYCA1-C155A e tYCA1-C276A continuaram se processando. Esse processamento é referente a uma clivagem no C-terminal, visto que ocorreu a deleção dos aminoácidos onde aconteceria o processamento no N-terminal. Através de estudos das metacaspases do protozoário *T. brucei*, foi visto que a TbMCA3, classificada como tipo I, é capaz de processar *in vivo* a TbMCA4. Esses dados fornecem evidências de que a cascata proteolítica que acontece entre as caspases pode estar ocorrendo entre metacaspases, a fim de gerar as formas ativas da enzima (PROTO *et al.*, 2011; MININA *et al.*, 2017). Supomos que esse processamento que esteja ocorrendo nas formas truncadas, seja um processamento intermolecular, diferentemente do primeiro processamento no qual a enzima cliva ela mesma classificando como um

autoprocessamento. A hipótese a qual nos referimos se baseia em que a enzima ativa, tYCA1, está processando outras enzimas tYCA1 não processadas, gerando os fragmento do segundo processamento com o peso molecular de aproximadamente 31 kDa. Um evento similar foi observado para a metacaspase de *Candida glabatra* (CONCHOU *et al.*, 2022), nos fornecendo através desse estudo dados que corroboram a nossa hipótese.

Com a intenção de analisarmos a posição dos resíduos que foram mutados, utilizamos o programa PyMOL (Schrödinger©) para visualizar a estrutura tridimensional da proteína YCA1. Para tanto, nos baseamos na estrutura definida por Wong, Yan e Shi (2012), obtida no banco de dados *Protein Data Bank* (https://www.rcsb.org/) pela identificação PDB 4F6O (*Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1*). Para realizarem a cristalização, os autores utilizaram a estrutura da YCA1 truncada, então a forma apresentada não contém os primeiros 86 aminoácidos do N-terminal. A Figura 34 mostra os resíduos de $Cys^{155}$ (vermelho), $Cys^{276}$ (verde) e $His^{220}$ (azul), e a distância entre as cisteínas e a histidina foi mensurada em angstrom (Å).

**Figura 34** – Estrutura tridimensional da YCA1 evidenciando o sítio catalítico

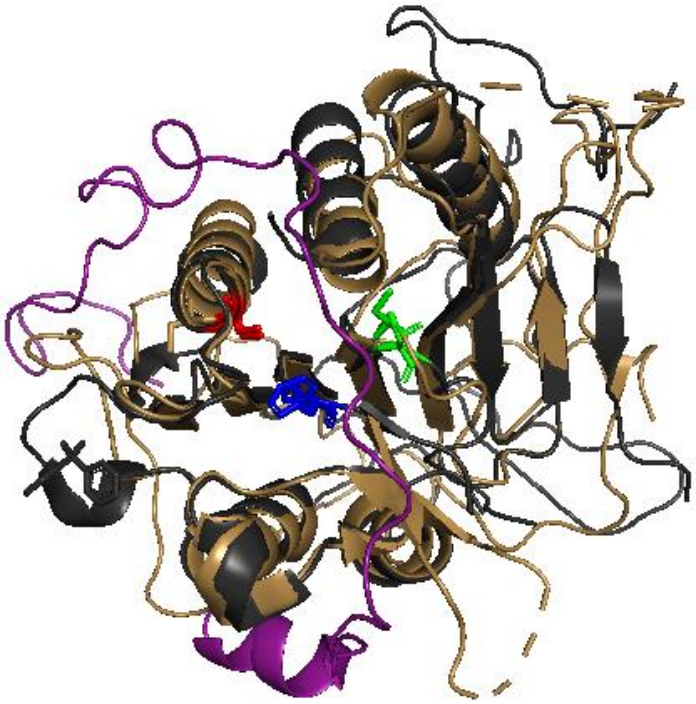



Estrutura tridimensional da YCA1 (PDB 4F6O) aproximando o sítio catalítico, evidenciando os aminoácidos que o compõem e a distância em angstrom (Å) entre eles. Em vermelho a cisteína 155; em azul a histidina 220; e em verde a cisteína 276. A distância entre a $Cys^{155}$ e a $His^{220}$ é estabelecida por 7,2 Å, e, a distância entre a $Cys^{276}$ e a $His^{220}$ é estabelecida por 9,6 Å.

Ao trabalharmos com enzimas sabemos que uma das suas maiores características é sua especificidade em relação ao substrato. Como já descrito anteriormente, a TbMCA2 apresenta uma segunda cisteína catalítica, assim como a YCA1, que está localizada muito próximo ao sítio-catalítico e que junto com os resíduos, ácido aspártico e serina, desempenham um papel no reconhecimento e direcionamento do substrato (MCLUSKEY *et al.*, 2012). Wong, Yan e Shi (2012) ao estudarem o sítio catalítico da YCA1, observaram a presença de uma histidina ($His^{277}$) localizada mais próxima a $Cys^{276}$ quando comparada a $His^{220}$. A preferência pela $His^{220}$ como resíduo da díade catalítica é explicada por uma mudança conformacional que ocorre após a ligação do substrato, caracterizada pela aproximação dos resíduos $Cys^{276}$ e $His^{220}$ para que haja interação e clivagem do peptídeo. A distância entre a $His^{220}$ que forma a díade catalítica com $Cys^{276}$ é maior quando comparamos a distância entre a $His^{220}$ com a $Cys^{155}$, e portanto, teoricamente, o acesso do substrato ao sítio ativo seria coerente entre os resíduos de menor distância, no caso $His^{220}$ e $Cys^{155}$. Entretanto sabemos que são necessários aminoácidos em torno do sítio ativo para ordenar corretamente o encaixe do substrato ao sub-sítios (SCHECHTER; BERGER, 1967), sendo assim, é provável que a região em torno da $Cys^{276}$ seja mais específica para a ligação, classificando-a como uma cisteína catalítica. Contudo, é imprescindível o papel da $Cys^{155}$ no autoprocessamento e liberação da forma ativa da enzima.

Com a informação de que a estrutura da YCA1 definida no cristal não contém os 86 aminoácidos do N-terminal, decidimos avaliar como poderia ocorrer a interação desses aminoácidos com o sítio catalítico da enzima. Para tanto, realizamos a sobreposição da estrutura da YCA1 com a TbMCA2 (PDB 4AFR), que foi definida por cristalográfia usando um mutante inativo, sendo assim, possível visualizar o N-terminal, que contém 70 aminoácidos. Na Figura 35, é apresentado a estrutura da YCA1 em cinza e a estrutura da TbMCA2 em marrom, o N-terminal dela é destacado em roxo. Através da imagem gerada podemos observar que o N-terminal da TbMCA2 possui uma característica interessante, esse circunda toda a proteína e passa entre o sítio ativo da enzima, bloqueando a interação para catálise entre a cisteína e a histidina da díade catalítica

**Figura 35** – Estrutura tridimensional da YCA1 e TbMCA2, sobrepostas, evidenciando os sítios catalíticos



Estruturas tridimensionais da YCA1 (PDB 4F6O), em cinza, e da TbMCA2 (PDB 4AFR), em marrom, sobrepostas. Na TbMCA2 é destacado o N-terminal, em roxo, composto por 70 aminoácidos. Para ambas, destaca-se os aminoácidos que compõem o sítio catalítico. Na YCA1, em vermelho a $Cys^{155}$, em azul a $His^{220}$, e em verde a $Cys^{276}$. Para TbMCA2, em vermelho a $Cys^{92}$, em azul a $His^{158}$, e em verde a $Cys^{213}$.

Esse dado foi observado e descrito por McLuskey *et al.* (2012), ao determinaram a estrutura da TbMCA2. O N-terminal circunda a proteína e bloqueia o sítio ativo, com a finalidade de regular o acesso do substrato ao mesmo, e que posteriormente na presença de cálcio ocorre uma mudança conformacional, resultando em um rearranjo do N-terminal, por fim deixando o sítio ativo livre para a ligação de substratos. Entretanto, a estrutura da YCA1 foi determinada com a deleção dos aminoácidos do N-terminal, como já explicado anteriormente, não temos informações para saber como esse se localiza em torno da enzima. Com esses dados, ao analisarmos a sobreposição das enzimas, podemos ver que o N-terminal da TbMCA2 também cruza entre a díade catalítica da YCA1, destacado em verde para a $Cys^{276}$ e em azul para a $His^{220}$, gerando a hipótese de que o N-terminal da YCA1 possui a mesma característica que o da TbMCA2.

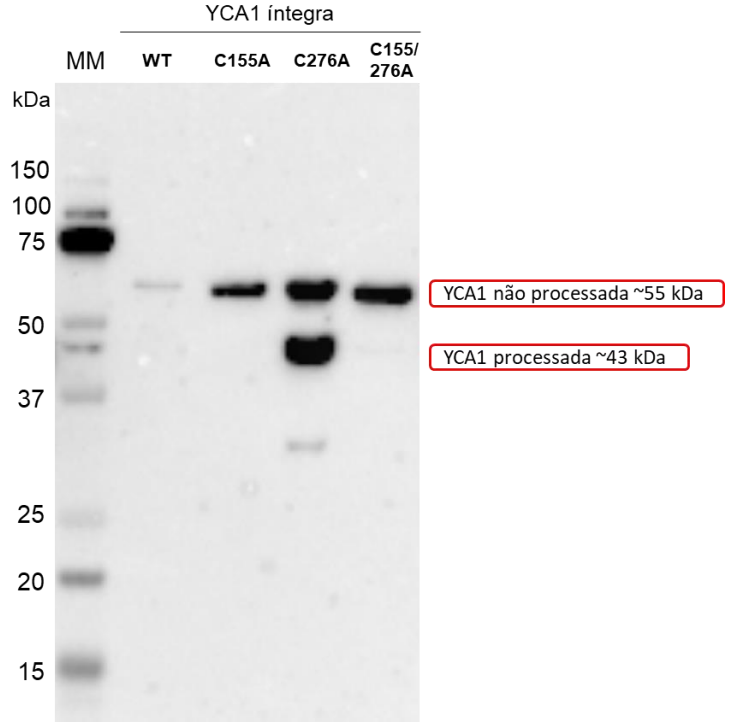
A possibilidade do N-terminal da YCA1 ser semelhante ao da TbMCA2, explica também a relação e importância, primeiramente da $Cys^{155}$ para o autoprocessamento. Uma vez que o N-terminal bloqueia a interação da $Cys^{276}$ com a $His^{220}$, ao passar

entre esses aminoácidos, faz com que a $Cys^{155}$ destacada em vermelho (Figura 35), tenha interação com a $His^{220}$. Esses dois aminoácidos ao interagirem primeiramente, levam ao autoprocessamento e a mudança conformacional do N-terminal, assim deixando livre o acesso de substratos ao sítio ativo, já que após a mudança é propício a interação da $Cys^{276}$ com a $His^{220}$.

## 4.4 *WESTERN BLOTTING* DE CONFIRMAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A identificação das proteína pela técnica de *western blotting* foi uma das metodologias utilizadas para confirmação de que o produto obtido após expressão e purificação tratava-se da YCA1 e das demais formas expressas e purificadas. Para tanto, utilizamos o anticorpo monoclonal anti-6xHis-Tag (ThermoFisher) que se liga a cauda de histidina do N-terminal da proteína. A técnica foi realizada como descrito no item 3.10 para todas as formas da YCA1 obtidas. A YCA1 íntegra foi reconhecida em sua forma não processada (~55 kDa) assim como os mutantes íntegros que apresentaram também a forma processada (~43 kDa), como demonstra a Figura 36.

**Figura 36** – *Western Blotting* das formas íntegras através de reconhecimento por anticorpo primário anti-6XHis-Tag




Linhas: (MM) marcador molecular *Precision Plus Protein*. YCA1 íntegra (WT), mutantes íntegros, respectivamente, YCA1-C155A, YCA1-C276A e YCA1-C155/276A. Retângulo em vermelho destacando as bandas referentes a isoformas não processadas e após autoprocessamento.

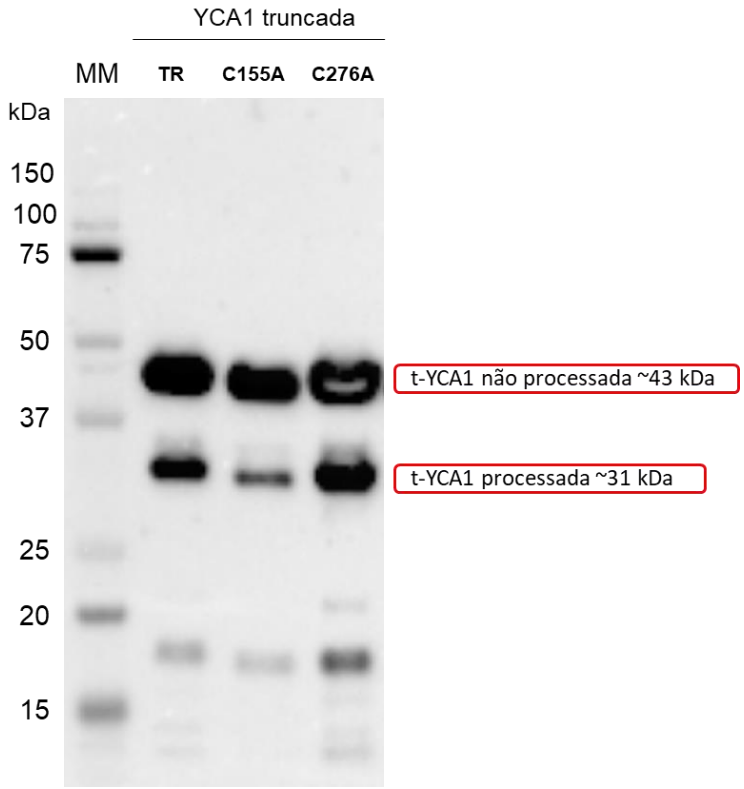
O *western blotting* é uma técnica mais sensível para reconhecimento de proteínas, logo é possível identificar a presença das mesmas quando estão em menores concentrações. Nesse experimento conseguimos evidenciar a forma íntegra da YCA1 antes não visualizada em *SDS-PAGE*, empregando a mesma concentração de proteína usada anteriormente. A banda visualizada é fraca, mas conseguimos observar que se trata da forma não processada da YCA1, como explicado anteriormente, não é possível visualizar a forma após o autoprocessamento, pois a forma íntegra da YCA1 se autodegrada rapidamente após esse evento. O resultado do *western blotting* corrobora com o gel de *SDS-PAGE* (Figura 32), o mutante YCA1-C155A apresentou apenas a forma não processada, como visto anteriormente, o que também foi observada com o duplo mutante YCA1-C155/276A. Entretanto, para o mutante YCA1-C276A, foi possível observar além do primeiro autoprocessamento, visto anteriormente, um segundo processamento evidenciado por uma banda em torno de 31 kDa.

Como nosso anticorpo trata-se de um anti-6XHis-Tag, e nossas enzimas possuem uma cauda de histidina no N-terminal, chegamos à conclusão que, diferentemente do que foi descrito por Wong, Yan e Shi (2012), a YCA1 se autoprocessa no seu C-terminal, uma vez que foi possível observar a proteína com peso molecular em torno 43 kDa, se o processamento ocorresse no N-terminal não seria possível visualizar a banda resultante da clivagem (Figura 36). Curiosamente, para o mutante YCA1-C276A observamos o segundo processamento na forma autoprocessada, que também ocorre no C-terminal, e pode ser evidenciado por uma terceira banda mais fraca com peso molecular de aproximadamente 31 kDa. Essa visualização não foi realizada no gel de *SDS-PAGE* (Figura 32), pois a concentração da forma totalmente processada é muito baixa quando comparada as outras.

Ao analisarmos o *western blotting* da tYCA1 e mutantes tYCA1-C155A e tYCA1-C276A, observamos o que foi demonstrado anteriormente em *SDS-PAGE* (Figura 33) para todas as formas truncadas obtidas, ou seja, uma concentração alta das formas após processamento. Interessantemente, o *western blotting* permitiu observar que ambos os processamentos da YCA1 ocorreram realmente na porção C-terminal das duas isoformas (não processada e processada) (Figura 36), uma vez que a enzima produzida não apresenta os resíduos $Arg^{72}$ e $Lys^{86}$, descritos como os locais do primeiro processamento por Wong, Yan e Shi (2012). Notamos que, devido a

produção da enzima sem a porção hidrofóbica do N-terminal, há um aumento do rendimento do nível de expressão.

**Figura 37** – *Western Blotting* das formas truncadas através de reconhecimento por anticorpo primário anti-6XHis-Tag



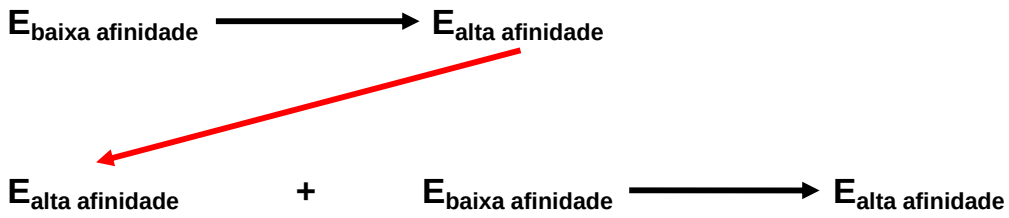

Linhas: (MM) marcador molecular *Precision Plus Protein.* YCA1 truncada (TR), mutantes truncados, respectivamente, tYCA1-C155A e tYCA1-C276A. Retângulo em vermelho demonstrando as bandas referentes a isoformas não processadas e após autoprocessamento.

Como dito anteriormente, a metacaspase é expressa como zimogênio, e sua forma madura é liberada quando ela sofre os dois processamentos. De acordo com nossos dados, verificamos que ambos ocorrem na porção C-terminal diferentemente do que foi demonstrado anteriormente por Wong, Yan e Shi (2012). Nossa hipótese é de que o primeiro processamento seja na verdade, como já observado para outras metacaspases, um autoprocessamento que converte a YCA1 em sua forma ativa.

Uma vez autoprocessada, a YCA1 é capaz de realizar um processamento intermolecular de outras YCA1 que também já foram processadas, com a finalidade de gerar a sua forma totalmente madura e ativa. Foi descrito recentemente que a metacaspase de *Candida glabrata* (CgMCA-I) apresenta o mesmo comportamento, sendo que a enzima nativa se autoprocessa em seu C-terminal, a qual é chamada de enzima de baixa afinidade, originando o que foi denominado de enzima de alta

atividade, e que essa enzima de alta afinidade processa outras enzimas formando novas enzimas de alta afinidade (Figura 38) (CONCHOU *et al*., 2022).

**Figura 38** – Modelo da reação de conversão de enzima de baixa afinidade para enzima de alta afinidade




Fonte: Conchou *et al.* (2022, p. 1158 – com adaptação)
Modelo de duas etapas demonstrando a transição de enzima de baixa afinidade para enzima de alta afinidade. Enzima de alta afinidade pode maturar enzima de baixa afinidade para produzir enzimas de alta afinidade.

Para confirmar essa teoria, Conchou *et al.* (2022) realizou experimentos utilizando duas formas da CgMCA-I, uma totalmente processada, a qual eles denominaram enzima maturada (CgMCA-I WT), e uma enzima mutante no sítio catalítico (CgMCA-I C238A/H182A), a qual é incapaz de processar ela mesma. Para isso prepararam uma mistura do mutante do sítio catalítico na presença de baixas concentrações da enzima maturada, e usaram como controle uma alíquota contendo apenas a enzima mutante. Após dias de incubação, analisaram através de *SDS-PAGE* e observaram que a enzima mutante apresentou-se totalmente processada na mistura preparada, enquanto que no controle o mutante não foi capaz de se processar, ou seja, de gerar a forma maturada. Através dessas informações, concluíram que o mutante foi maturado pela forma ativa da enzima presente em baixas concentrações. Outra questão abordada pelos autores foi de que, a enzima de baixa afinidade da CgMCA-I apresenta atividade basal, confirmando que a metacaspase exerce atividade sob pequenas sequências peptídicas, como os oligopeptídeos, até o momento em que sofre o processamento e libera sua forma ativa, denominada enzima de alta afinidade, para exercer a função catalítica sob substratos peptídicos (CONCHOU *et al.*, 2022).

Esses resultados fornecem perspectivas para ensaios futuros utilizando como modelo as enzimas selvagens da YCA1 e os mutantes C155A e C276A, afim de averiguar esse modelo de conversão de enzima de baixa afinidade para enzimas de alta afinidade realizado através de processamentos intermoleculares, no qual baseamos a nossa hipótese.

# 5 CONCLUSÃO

Nesse estudo conseguimos clonar, expressar e purificar as proteínas mutantes da metacaspase de *Saccharomyces cerevisiae* (YCA1), em sua forma íntegra e truncada para os resíduos $Cys^{155}$ e $Cys^{276}$, através de uma técnica de clonagem moderna. Como também, confirmamos a obtenção das proteínas mutantes utilizando um anticorpo específico pela técnica de *western blotting*.

A obtenção dos mutantes foi importante para elucidarmos e aprofundarmos o conhecimento em torno da ativação da YCA1, que é expressa inativa, e passar por etapas de processamentos para liberar sua forma ativa, capaz de clivar substratos proteícos. A mutação no resíduo $Cys^{155}$ demonstrou a presença de uma segunda cisteína catalítica na estrutura da YCA1, que é crucial no autoprocessamento da enzima. Isso propõe que inicialmente a ação da $Cys^{155}$ impacta diretamente a ação da cisteína catalítica ($Cys^{276}$), uma vez que é necessário ocorrer o primeiro autoprocessamento para gerar a forma ativa da YCA1, onde o sítio ativo composto pela díade catalítica ($Cys^{276}$ e $His^{220}$) fica livre para interação com o substrato.

A análise comparativa da estrutura da YCA1 mostrou que em teoria, o N-terminal dessa enzima é semelhante ao da TbMCA2, localizando-se em torno da enzima e influenciando diretamente no acesso do substrato ao sítio ativo. Com isso, confirmando a nossa hipótese de que a $Cys^{155}$ interage primeiramente com a $His^{220}$, realizando um autoprocessamento para que ocorra a mudança conformacional no N-terminal e a liberação do sítio ativo da enzima, ou seja, da sua forma ativa.

Nossos estudos proporcionaram uma perspectiva diferente sobre o autoprocessamento das metacaspases do tipo I, como a YCA1, apontando que um primeiro processamento ocorre gerando a forma ativa da YCA1, que posteriormente irá sofrer um segundo processamento, entretanto não tratando-se de um autoprocessamento, mas sim de um processamento intermolecular entre as metacaspases. Além disso, o *western blotting* mostrou que ambos os processamentos que ocorrem na YCA1, são gerados por clivagens no C-terminal da enzima, diferentemente do que foi descrito em literatura, onde o primeiro processamento ocorreria no N-terminal.

Com o intuito de confirmamos as hipóteses apresentadas, temos como perspectivas futuras realizar ensaios bioquímicos com as formas mutantes e sem

mutação da YCA1. Primeiramente utilizando as enzimas inativas como substrato para as enzimas ativas, e assim verificar se ocorre o processamento intermolecular entre elas. Posteriormente realizar ensaios utilizando o cálcio para verificar a influência no autoprocessamento das diferentes formas, e com isso, prosseguir para ensaios cinéticos, a fim de caracterizarmos as enzimas obtidas, identificar substratos e compostos para ativação ou inativação da enzima, reconhecendo possíveis moléculas promissoras para desenvolvimento de fármacos.

# REFERÊNCIAS

ABID, R. *et al.* Probiotic Yeast *Saccharomyces*: Back to Nature to Improve Human Health. **J Fungi (Basel)**, Suíça, v. 8, n. 5, p. 444, abr/2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9147304/>.

AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 9, p. 1053-1061, set/1999. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X1999000900001>.

AREF, R. **Comparative analysis of repressor interaction with pleiotropic corepressors Sin3 and Cyc8 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Faculdade de Matemática e Ciências Naturais da Universidade Ernst-Moritz-Arndt de Greifswald, Greifswald, 2014. Disponível em: <https://epub.ub.uni-greifswald.de/frontdoor/deliver/index/docId/1373/file/PhD_Thesis_Rasha_Aref.pdf>.

ATKINSON, H.J.; BABBITT, P.C.; SAJID, M. The global cysteine peptidase landscape in parasites. **Trends Parasitol**, Reino Unido, v. 25, n. 12, p. 573-581, dez/2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19854678/>.

BARRETT, A.J. Classification of Peptidases. *In:* ABELSON, J.; SIMON, M. **Methods in Enzymology:** Proteolytic Enzymes – Serine and Cysteine Peptidases, v. 244. 1. ed. Estados Unidos: Academic Press, 1994. cap. 1, p. 1-15. *E-book.* Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687994440034>.

BELENGHI, B. *et al.* Metacaspase activity of Arabidopsis thaliana is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. **J Biol Chem**, Estados Unidos, v. 282, n. 2, p. 1352-1358, jan/2007. Disponível em: <https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)73564-7/fulltext>.

CARMONA-GUTIERREZ, D. *et al.* Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature. **Microbial Cell**, Áustria, v. 5, n. 1, p. 4-31, jan/2018. Disponível em: <https://microbialcell.com/researcharticles/guidelines-and-recommendations-on-yeast-cell-death-nomenclature/>.

CARMONA-GUTIERREZ, D. *et al*. Metacaspases are caspases. Doubt no more. **Cell Death Differ**, Reino Unido, v. 17, n. 3, p. 377-378, mar/2010. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/cdd2009198>.

CASTRO, H.C. *et al*. Looking at the proteases from a simple perspective. **J Mol Recognit**, Reino Unido, v. 24, n. 2, p. 165-181, fev/2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmr.1091>.

CEULEERS, H. *et al.* Visceral hypersensitivity in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome: The role of proteases. **World J Gastroenterol**, China, v. 22, n. 47, p. 10275-10286, dez/2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/311750351_Visceral_hypersensitivity_in_inflammatory_bowel_diseases_and_irritable_bowel_syndrome_The_role_of_proteases>.

CHAO, R.; YUAN, Y.; ZHAO, H. Recent advances in DNA assembly technologies. **FEMS Yeast Res**, Reino Unido, v. 15, n. 1, p. 1-9, fev/2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4257898/>.

CHAKRABARTY, S. *et al*. Recent Advances in Activity-Based Protein Profiling of Proteases. *In:* CRAVATT, B.; HSU, K.L.; WEERAPANA, E. (eds). **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 420. Suíça: Springer, 2019. cap. 137, p. 253-281. *E-book.* Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30244324/>.

CHERRY, J.M. *et al. Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. **Nucleic Acids Res**, Reino Unido, v. 40, n. D1, p. D700-705, jan/2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/40/D1/D700/2902744>.

COHEN, S.N. *et al*. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*. **Proc Natl Acada Sci USA**, Estados Unidos, v. 70, n. 11, p. 3240-3244, nov/1973. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC427208/>.

CONCHOU, L. *et al.* Structural and molecular determinants of *Candida glabrata* metacaspase maturation and activation by calcium. **Commun Biol**, Estados Unidos, v. 5, n. 1, p. 1158, out/2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9622860/>.

D'ARCY, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biol Int**, Estados Unidos, v. 43, n. 6, p. 582-592, abr/2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30958602/>.

DRENTH, J. *et al*. Structure of Papain. **Nature**, Reino Unido, v. 218, p. 929-932, jun/1968. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/218929a0>.

DUARTE, M. *et al.* Current postbiotics in the cosmetic market—an update and development opportunities. **Appl Microbiol Biotechnol**, Alemanha, v. 106, n. 18, p. 5879-5891, ago/2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-022-12116-5>.

EDELHEIT, O.; HANUKOGLU, A.; HANUKOGLU, I. Simple and Efficient Site-Directed Mutagenesis Using Two Single-Primer Reactions in Parallel to Generate Mutants for Protein Structure-Function Studies. **BMC Biotechnol**, Reino Unido, v. 9, n. 61, p. 1-8, jun/2009. Disponível em: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1472-6750-9-61>.

EISENBERG, T. *et al*. Necrosis in yeast. **Apoptosis**, Holanda, v. 15, n. 3, p. 257-268, mar/2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20238475>.

ERHARDT, M.; WEGRZYN, R.D.; DEUERLING, L. Extra N-Terminal Residues Have a Profound Effect on the Aggregation Properties of the Potential Yeast Prion Protein Mca1. **PLoS One**, Estados Unidos, v. 5, n. 3, p. e 9929, mar/2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2847904/>.

FLEISHER, T.A. Apoptosis. **Ann Allergy Ashthma Immunol**, Estados Unidos, v. 78, n. 3, p. 245-250, mar/1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9087147/>.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ**, Reino Unido, v. 25, n. 3, p. 486-541, mar/2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29362479/>.

GAO, X. *et al*. Crystal structure of SARS-CoV-2 papain-like protease. **Acta Pharm Sin B**, Holanda, v. 11, n. 1, p. 237-245, jan/2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383520306985>.

GIAMPIETRI, C.; PAONE, A.; D'ALESSIO, A. Cell Death. **Int J Cell Biol**, Estados Unidos, v. 2014, n. 864062, p. 1-2, mai/2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4037620/>.

GIBBS, C.S.; ZOLLER, M.J. Identification of functional residues in proteins by charged-to-alanine scanning mutagenesis. **Methods**, Estados Unidos, v. 3, n. 3, p. 165-173, dez/1991. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046202305801690>.

GILIO, J.M. *et al*. Processing of metacaspase 2 from *Trypanosoma brucei* (TbMCA2) broadens its substrate specificity. **Biochim Biophys Acta Proteins Proteom**, Holanda, v. 1865, n. 4, p. 388-394, abr/2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28089596/>.

GODDARD, M.R.; GREIG, D. *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche?. **FEMS Yeast Res**, Reino Unido, v. 15, n. 3, p. 1-6, mai/2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25725024/>.

GOFFEAU, A. *et al.* Life with 6000 Genes. **Science**, Estados Unidos, v. 274, n. 5287, p. 546-567, out/1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8849441/>.

GOPAL, G.J.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. **Protein J**, Estados Unidos, v. 32, n. 6, p. 419-425, ago/2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23897421/>.

GREEN, D.R.; KROEMER, G. The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. **Science**, Estados Unidos, v. 305, n. 5684, p. 626-629, jul/2004. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/305/5684/626/tab-figures-data>.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Rev Bra Cancerol**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 335-343, jan/2007. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/site/arquivos/n_53/v03/pdf/revisao4.pdf>.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J Mol Biol**, Estados Unidos, v. 166, n. 4, p. 557-580, jun/1983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6345791/>.

HILL, S.M.; NYSTRÖM, T. The dual role of a yeast metacaspase: What doesn't kill you makes you stronger. **BioEssays**, Estados Unidos, v. 37, n. 5, p. 525-531, fev/2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.201400208>.

HO, S.N. *et al.* Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene**, Holanda, v. 77, n. 1, p. 51-59, abr/1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2744487/>.

HOOPER, N.M. Proteases: a primer. **Essays Biochem**, Reino Unido, v. 38, n. 1, p. 1-8, out/2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12463157/>.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, Holanda, v. 96, n. 1, p. 23-28, nov/1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2265755/>.

JIA, B.; JEON, C.O. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives. **Open Biol**, Reino Unido, v. 6, n. 8, p. 160196, ago/2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5008019/>.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, Reino Unido, v. 26, n. 4, p. 239-257, ago/1972. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.278.8804&rep=rep1&type=pdf>.

KLEMENČIČ, M.; FUNK, C. Evolution and Structural Diversity of Metacaspases. **J Exp Bot**, Reino Unido, v. 70, n. 7, p. 2039-2047, abr/2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30921456/>.

KLEMENČIČ, M.; FUNK, C. Type III metacaspases: calcium-dependent activity proposes new function for the p10 domain. **New Phytol**, Reino Unido, v. 218, n. 3, p. 1179-1191, mai/2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28643870/>.

KOSTYLEV, M. *et al*. Cloning Should Be Simple: *Escherichia coli* DH5α-Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. **PLoS One**, Estados Unidos, v. 10, n. 9, p.e0137466, set/2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4562628/>.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. Lesão Celular, Morte Celular e Adaptações. *In:* **Robbins Patologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: GEN; Editora Guanabara Koogan, 2018. cap. 2, p. 29-54. *E-book.* Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788595151895/epubcfi/6/32[%3Bvnd.vst.idref%3DB9788535288353000021]!/4/2/8/8[s0025]/12[s0050]/10[s0060]/6[l0060]/8[u0245]/9:535[o%20s%2Ceu%20]>.

LEE, R.E.C. *et al*. A Non-Death Role of the Yeast Metacaspase: Yca1p Alters Cell Cycle Dynamics. **PLoS One**, Estados Unidos, v. 3, n. 8, p. e2956, ago/2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2493032/>.

LI, X. *et al*. Synergistic Effects and Mechanisms of Combined Treatment With Harmine Hydrochloride and Azoles for Resistant *Candida albicans*. **Front Microbiol**, Suíça, v. 10, n. 2295, p. 1-12, out/2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6843067/>.

LU, L.; PATEL, H.; BISSLER, J.J. Optimizing DpnI digestion conditions to detect replicated DNA. **BioTechniques**, Estados unidos, v. 33, n. 2, p. 316-318, ago/2002. Disponível em: <https://www.future-science.com/doi/pdf/10.2144/02332st03>.

MACHADO, M.F.M. *et al*. Substrate specificity and the effect of calcium on *Trypanosoma brucei* metacaspase 2. **FEBS J**, Reino Unido, v. 280, n. 11, p. 2608-2621, set/2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3779824/>.

MADEO, F. *et al.* A Caspase-Related Protease Regulates Apoptosis in Yeast. **Mol Cell**, Estados Unidos, v. 9, n. 4, p. 911-917, abr/2002b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11983181/>.

MADEO, F. *et al*. Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. **Curr Genet**, Alemanha, v. 41, n. 4, p. 208-216, jul/2002a. Disponivel em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12172961/>.

MADEO, F. *et al*. Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast. **J Cell Biol**, Estados Unidos, v. 145, n. 4, p. 757-767, mai/1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2133192/>.

MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; FRÖHLICH, K.U. A Yeast Mutant Showing Diagnostic Markers of Early and Late Apoptosis. **J Cell Biol**, Estados Unidos, v. 139, n. 3, p. 729-734, nov/1997. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2141703/>.

MAHAJAN, R.T.; BADGUJAR, S.B. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. **Journal of Pharmacy Research**, Índia, v. 3, n. 9, p. 2048-2068, set/2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/282212064_Biological_aspects_of_proteolytic_enzymes_A_Review>.

MCLUSKEY, K. *et al.* Crystal structure of a *Trypanosoma brucei* metacaspase. **Proc Natl Acad Sci USA**, Estados Unidos, v. 109, n. 19, p. 7469-7474, mai/2012. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1200885109>.

MIERZEJEWSKA, K. *et al.* Structural basis of the methylation specificity of R.DpnI. **Nucleic Acids Res,** Reino Unido, v. 42, n. 13, p. 8745-8754, set/2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4117772/>. Acesso em: 14 nov. 2020.

MININA, E.A. *et al*. Metacaspases versus caspases in development and cell fate regulation. **Cell Death Differ**, Reino Unido, v. 24, n. 8, p. 1314-1325, ago/2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28234356/>.

MISHRA, V. Affinity Tags for Protein Purification. **Curr Protein Pept Sci**, Emirados Árabes Unidos, v. 21, n. 8, p. 821-830, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32504500/>.

MOSS, C.X. e*t al*. Metacaspase 2 of *Trypanosoma brucei* is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing. **FEBS Lett**, Estados Unidos, v. 581, n. 29, p. 5635-5639, dez/2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18005666/>.

MOTTRAM, J.C. *et al*. Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. **Trends Parasitol**, Reino Unido, v. 19, n. 4, p. 182-187, abr/2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12689649/>.

MÓTYÁN, J.; TÓTH, F.; TÖZSÉR, J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. **Biomolecules**, Suíça, v. 3, n. 4, p. 923-942, dez/2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4030975/>.

NAGATA, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. **Annu Rev Immunol**, Estados Unidos, v. 36, n. 1, p. 489-517, abr/2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29400998/>.

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals – A review. **Braz J Biol**, Brasil, v. 81, n. 4, p. 1133-1143, out/2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/KrGnBZTqg9cbPCMZ9ZHWfzx/?format=pdf&lang=en>.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**, Estados Unidos, v. 64, n. 1, p. 34-50, mar/2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98985/>.

OTTO, H.H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. **Chem Rev**, Estados Unidos, v. 97, n. 1, p. 133-171, fev/1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11848867/>.

PROTO, W.R. *et al.* Trypanosoma brucei metacaspase 4 is a pseudopeptidase and a virulence fator. **J Biol Chem**, Estados Unidos, v. 286, n. 46, p. 39914-39925, nov/2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820504900>.

RANI, K.; RANA, R.; DATT, S. Review on latest overview of proteases. **International Journal of Current Life Sciences**, India, v. 2, n. 1, p.12-18, jan/2012. Disponível em: <https://www.academia.edu/34419420/Review_on_latest_overview_of_proteases>.

RAWLINGS, N.D. A large and accurate collection of peptidase cleavages in the MEROPS database. **Database (Oxford)**, v. 2009, n. bap015, p. 1-14, nov/2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2790309/>.

RAWLINGS, N.D. *et al*. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Res**, Reino Unido, v. 46, n. D1, p. D624-632, jan/2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29145643/>.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidases. **Biochem J**, Reino Unido, v. 290, n. 1, p. 205-218, 1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1132403/>.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J.; FINN, R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res,** Reino Unido, v. 44, n. D1, p. D343-D350, jan/2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4702814/>.

SALARI, R.; SALARI, R. Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. **Electron Physician**, Irã, v. 9, n. 1, p. 3592-3597, jan/2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5308499/>.

SALVESEN, G.S.; HEMPEL, A.; COLL, N.S. Protease signaling in animal and plant-regulated cell death. **FEBS J**, Reino Unido, v. 283, n. 14, p. 2577-2598, jul/2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5606204/>.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochem Biophys Res Commun**, Estados Unidos, v. 27, n. 2, p. 157-162, abr/1967. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X6780055X>.

SHILLING, P.J. *et al*. Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. **Commun Biol**, Estados Unidos, v. 3, n. 1, p. 214, mai/2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s42003-020-0939-8>.

SHRESTHA, A. *et al*. The metacaspase Yca1 maintains proteostasis through multiple interactions with the ubiquitin system. **Cell Discov**, Reino Unido, v. 5, n. 6, p. 1-13, jan/2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41421-018-0071-9>.

SILVA, R.D. *et al*. Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol**, Reino Unido, v. 58, n. 3, p. 824-834, nov/2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2958.2005.04868.x>.

STUDIER, F.W.; MOFFATT, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J Mol Biol**, Estados Unidos, v. 189, n. 1, p. 113-130, mai/1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3537305/>.

SUN, J. *et al.* Accumulation and Enrichment of Trace Elements by Yeast Cells and Their Applications: A Critical Review. **Microorganisms**, Suíça, v. 10, n. 9, p. 1746, ago/2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9504137/>.

TSIATSIANI, L. *et al*. Metacaspases. **Cell Death Differ**, Reino Unido, v. 18, n. 8, p. 1279-1288, ago/2011. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/cdd201166.pdf?origin=ppub>.

TULLIO, V. Yeast Genomics and Its Applications in Biotechnological Processes: What Is Our Present and Near Future?. **J Fungi (Basel)**, Suíça, v. 8, n. 7, p. 752, jul/2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9315801/>.

ULIYANCHENKO, E. Size-exclusion chromatography-from high-performance to ultra-performance. **Anal Bioanal Chem**, Alemanha, v. 406, n. 25, p. 6087-6094, ago/2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25116601/>.

UNIPROT, The Universal Protein Resource. **UniProtKB - Q08601 (MCA1_YEAST)Basket**. out/2022. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q08601>.

UREN, A.G. *et al*. Identification of Paracaspases and Metacaspases: Two Ancient Families of Caspase-Like Proteins, One of Which Plays a Key Role in MALT Lymphoma. **Mol Cell**, Estados Unidos, v. 6, n. 4, p. 961-967, out/2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11090634/>.

VERCAMMEN, D. *et al.* Type II Metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis Thaliana* Cleave Substrates After Arginine and Lysine. **J Biol Chem**, Estados Unidos, v. 279, n. 44, p. 45329-45336, out/2004. Disponível em: <https://www.jbc.org/content/279/44/45329.full>.

VERMA, S.; DIXIT, R.; PANDEY, K.C. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. **Front Pharmacol**, Suíça, v. 7, n. 107, p. 1-12, abr/2016. Disponível em: <ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4842899/>.

WONG, A. H.; YAN, C.; SHI, Y. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. **J Biol Chem**, Estados Unidos, v. 287, n. 35, p. 29251-29259, ago/2012. Disponível em: <https://www.jbc.org/content/287/35/29251.full>.

XIA, Y. *et al.* T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. **Nucleic Acids Research**, Reino Unido, v. 47, n. 3, p. e15 (1-11), fev/2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/47/3/e15/5193337>.

YAN, G.; ELBADAWI, M.; EFFERTH, T. Multiple cell death modalities and their key features (Review). **World Academy of Sciences Journal**, Grécia, v. 1, n.1, p. 39-48, mar/2020. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/wasj.2020.40>.