



XXV Congresso de Iniciação Científica da Unicamp

18 a 20 Outubro Campinas | Brasil



Clonagem e expressão da proteína torsina A e do domínio NBD de *Caenorhabditis elegans*

Leonardo Monteiro F. dos Santos*, Diego Rocha, Carlos Henrique Inácio Ramos.

Resumo

O enovelamento incorreto das proteínas pode ter como consequência a agregação proteica, associada com centenas de doenças tais como Alzheimer e Parkinson. As chaperonas moleculares atuam em conjunto para garantir a manutenção da homeostase proteica celular, utilizando-se de funções específicas de seus domínios. A proteína torsina A de *Caenorhabditis elegans* possui um domínio NBD (nucleotide binding domain) que permite associá-la a funções muito importantes na manutenção da homeostase celular, além de apresentar identidade de sequência com o ortólogo humano (38%). A partir da obtenção da proteína recombinante em laboratório, é possível avaliar sua expressão com a finalidade de purificá-la e caracterizá-la biofísicamente. Possibilitando estudos de caracterização funcional que permitirá o entendimento do mecanismo de ação dessa proteína na homeostase proteica celular.

Palavras-chave:

Torsina, domínio NBD, chaperonas.

Introdução

Este projeto tem como objetivo a clonagem e expressão da torsina A de *C. elegans* gene OOC-5 (TorA5) e do seu domínio NBD, visando uma melhor compreensão desta proteína. Existe uma motivação medicinal nesse projeto devido a uma mutação que a torsina A pode sofrer pela deleção de três pares de base, acarretando a perda de um ácido glutâmico na região C-terminal, sinalizando para a doença *Early-onset torsion dystonia* (EOTD) em humanos¹. A torsinaA de *C. elegans* apresenta vários resíduos hidrofóbicos em sua região N-terminal por isso, decidiu-se clonar seu maior e principal domínio: o NBD. Essa porção é a que também fornece as funções essenciais para o funcionamento da proteína.

Resultados e Discussão

O plasmídeo pET28a com o gene da TorsinaA de *C. elegans* foi transformado em linhagens BL21(DE3) com ou sem o plasmídeo pRare e LEMO(DE3). Foram testadas diferentes condições, como variação de temperatura e IPTG, porém toda a proteína expressa foi obtida na fração insolúvel. Outros pesquisadores do grupo tentaram obter a proteína por refolding sem resultados satisfatórios.

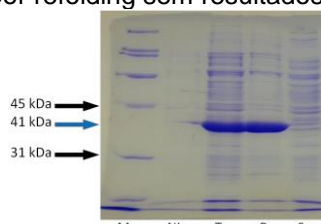


Figura 1. Expressão em pLEMO. Gel SDS-PAGE. Massa teórica da torsinaA: 41kDa. M-marcador; NI-não induzido; T-total; P-precipitado; Sn-solúvel.

Acreditava-se que a presença de vários resíduos hidrofóbicos na região N-terminal poderia contribuir para a difícil solubilidade da proteína. Foi decidido partir para uma clonagem do domínio NBD da torsina A. Desenhou-se primers para amplificação dessa região, onde foram inseridos os sítios de restrição (*NdeI* e *XhoI*) e feita uma reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de adenilação, e ligação em pGemTeasy. Foram enviados para o sequenciamento, com finalidade de analisar quais deles possuíam o gene sem mutação. Depois foi realizada a subclonagem para vetor de expressão pET28a.

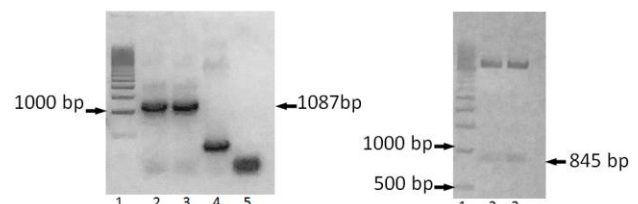


Figura 2. Confirmação da clonagem. À esquerda: PCR dos candidatos NBD_Ce (primers T7 promoter e T7 terminator). 1-marcador; 2-candidato 1; 3-candidato 4; 4-controle positivo (345bp); 5-controle negativo. À direita: digestão *NdeI* e *XhoI*. M-marcador; NBD-domínio NBD digerido para duas amostras de mesmo resultado.

Após a obtenção dos clones em pET28a, foram realizados testes de expressão nas linhagens BL21(DE3) e pLysS, porém os resultados de expressão da proteína referente ao NBD não foram satisfatórios e portanto, não foi possível observar a banda referente à sua superexpressão (massa teórica domínio NBD 34kDa).

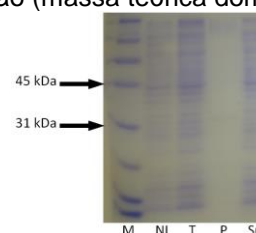


Figura 3. Expressão do domínio NBD em BL21(DE3). Gel SDS-PAGE. Massa teórica da torsinaA: 41kDa. M-marcador; NI-não induzido; T-total; P-precipitado; Sn-solúvel.

Conclusões

Após a realização dos experimentos, pode-se concluir que é recomendável que se repita o processo de clonagem, pois nos testes de expressão há baixa concentração da proteína. Para continuação do tema do projeto, deve-se buscar uma clonagem efetiva para que os testes de expressão sejam satisfatórios.

Agradecimentos

Agradeço à minha família, ao Professor pela oportunidade, à equipe de pesquisa do laboratório pela assistência, ao PIBIC-CNPq pela bolsa e à FAPESP e CAPES que financiam os gastos do laboratório.

¹ Burdette, A. J. et al. *Cell Stress and Chaperones*, 2010, v. 15, n. 5, 605–617.