

Obtenção da Proteína TRAP-1 Humana.

Camila C. Retucci¹, Júlio C. Borges², Lisandra M. Gava³.

1. Estudante de IC do Departamento de Genética e Evolução - DGE, UFSCar, São Carlos/SP; *camilaretucci@gmail.com

2. Pesquisador do Instituto de Química de São Carlos - IQSC, São Carlos/SP;

3. Pesquisadora do Departamento de Genética e Evolução - DGE, UFSCar, São Carlos/SP.

Palavras Chave: *Chaperonas, Hsp90 mitocondrial.*

Introdução

A Hsp90 (*Heatshock protein 90 kDa*) mitocondrial, denominada TRAP-1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Protein-1*), é uma chaperona molecular que está na vanguarda das vias cruciais da integridade mitocondrial, morte celular oxidativa, enovelamento de proteínas mitocondriais e respostas transcricionais ao estresse proteotóxico. Além disso, a desregulamentação aberrante da função da TRAP-1 foi observada em doenças cancerígenas e neurodegenerativas, com potenciais consequências de longo alcance para a progressão da doença e intervenção terapêutica.

Assim, evidencia-se a importância de pesquisas científicas que englobem seus mecanismos de ação, efeitos moduladores, ativadores e/ou inibidores de proteínas interatoras e ligantes. Nesse sentido, foram objetivos desse projeto a clonagem, expressão e purificação da TRAP-1 humana recombinante para posteriores estudos de interação com co-chaperonas, substratos e/ou ligantes.

Resultados e Discussão

A clonagem foi realizada a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (CFH), que foi amplificada antes da realização do procedimento de clonagem. Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* para o gene da TRAP-1, que tiveram suas sequências analisadas em relação a T_m , conteúdo GC, inserção de sítio de restrição. No *primer* senso foi inserido sítio para a enzima de restrição NdeI, enquanto no *primer* antisenso foi inserido o sítio para a enzima EcoRI, a seleção das enzimas foi feita para a posterior sub-clonagem no vetor de expressão pET28a. O DNA codante da TRAP-1 foi

amplificado por PCR, clonado em vetor ponte e sub-clonado no vetor pET28a. As etapas da clonagem foram realizadas utilizando a cepa de *Escherichia coli* DH5 α . Em seguida foram feitos testes para a expressão heteróloga da TRAP-1 recombinante humana, utilizando as cepas de *E. coli* BL21(DE3). Após a extração da proteína a partir do lisado celular, foram realizadas etapas de purificação da proteína recombinante a partir de técnicas cromatográficas, como cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular. Cada etapa de purificação foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), a fim de avaliar a pureza e estimar o rendimento e/ou diluição da amostra de proteína.

Conclusões

O cDNA codante de TRAP-1 foi amplificado a partir da biblioteca de cDNA de CFH e foi clonado no vetor de expressão pET28a. A proteína foi produzida com pureza e bom rendimento. Dessa forma, será possível dar continuidade ao trabalho, seguindo agora para etapa de caracterização da proteína e suas interações.

Agradecimentos

Instituição de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimentos: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), Departamento de Genética e Evolução (DGE, UFSCar), Instituto de Química de São Carlos (IQSC).

Felts S.J., B.A. Owen, P. Nguyen, J. Trepel, D.B. Donner, D.O. Toft, The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 3305–3312.