

CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TROCADOR DE SÓDIO E CÁLCIO (NCX1) DE *HOMO SAPIENS*

Nicolas Martins Soares¹, Ivarne Luis dos Santos Tersariol², Wagner Alves De Souza Júdice³

1. Estudante do curso de Ciências Biológicas; e-mail: nicolasmartinsoares@hotmail.com
2. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo; e-mail: ivarne.tersariol@gmail.com
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagneras@umc.br

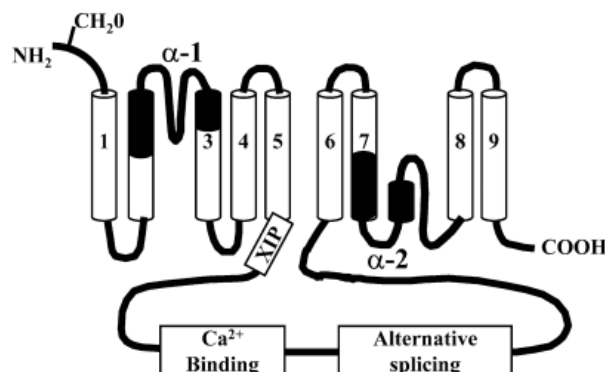
Área de conhecimento: Enzimologia

Palavras-chave: Trocador Na⁺/Ca²⁺, NCX1, Clonagem.

INTRODUÇÃO

Presente na membrana plasmática da maioria das células animais e membro da família do gene SLC8, o trocador de Na⁺/Ca²⁺ (FIGURA 1) é um sistema de transporte de Ca²⁺, que opera em paralelo com os canais seletivos de Ca²⁺ e bombas de Ca²⁺ acionadas por ATP. A família de proteínas trocadoras de Na⁺/Ca²⁺ (NCX) faz parte da superfamília dos trocadores de cátion/Ca²⁺. O trocador Na⁺ / Ca²⁺ pode mover o Ca²⁺ para dentro ou para fora das células, dependendo da força eletromotriz líquida no permutador. Esta força motriz e, portanto, o Ca²⁺ movimentado pelo trocador, pode mudar de direção durante o ciclo de atividade de uma célula, quando o potencial de membrana varia e/ou quando a concentração de Na⁺ ou Ca²⁺ no citosol ou é alterada (CHAPTAL, et al, 2007).

Figura 1: Estrutura proposta do trocador de Na⁺/Ca²⁺.



São mostrados 9 segmentos transmembrana e um amplo loop intercelular. quase todos os aspectos de sua topologia foram confirmados experimentalmente. O primeiro segmento extracelular é glicosilado (CH₂O) Também são mostrados dois loops de reentrada propostos, que têm algum suporte experimental. Duas regiões de repetição α são mostradas em preto. Estas são regiões de homologia intracelular e foram implicadas na translocação de íons. A região XIP está envolvida no processo de inativação. Também é mostrado um sítio de ligação de Ca²⁺ responsável pela regulação da troca intracelular de Ca²⁺. O local onde a extensão do splicing alternativo ocorre é denotado. Fonte: PHIPLIPSON, et al. 2002. O trocador Na⁺/Ca²⁺ é uma da proteína de baixa afinidade com Ca²⁺, mas a taxa de rotatividade é muito superior à de outras bombas Ca²⁺. Uma característica incomum na regulação de Ca²⁺ das células é a abundância aparente dos sistemas de transporte de membrana plasmática de

Ca²⁺, já que o trocador Na⁺/Ca²⁺ opera em paralelo tanto com os canais seletivos para Ca²⁺ quanto com as bombas. No entanto, o trocador tem várias características únicas que podem ajudar a explicar a necessidade de estar em redundância, assim como a utilidade do trocador (ROBERTS, MATSUDA e BOSE, 2012). A expressão alterada de NCX1 e a atividade de NCXs foram associadas ao influxo anormal de Ca²⁺, causando uma significativa participação de disfunções neuroaxonais e reparo de mielina desadaptativo ou falha de remielinização em doenças desmielinizantes inflamatórias crônicas, como esclerose múltipla (BOSCIA, et al. 2020).

OBJETIVOS

Amplificação do gene comercial da proteína NCX1 em bactérias *E. coli* (Dh5 α) competentes.

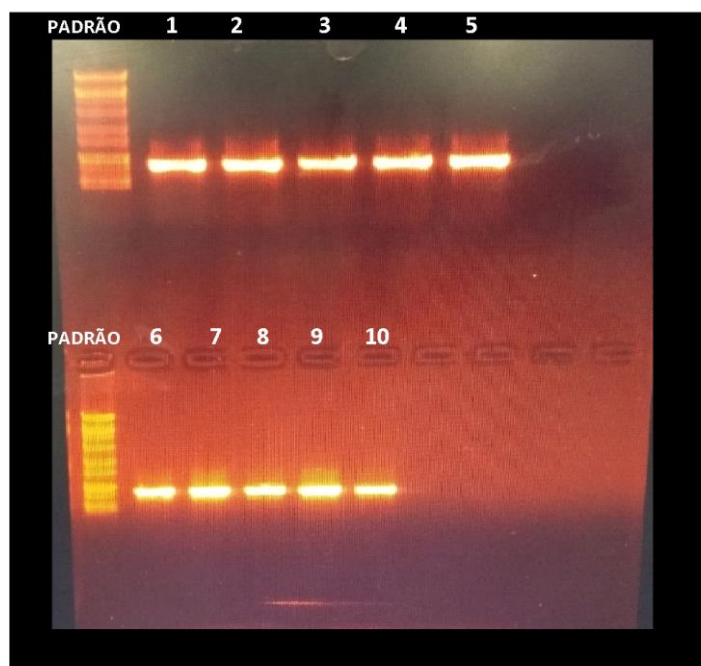
METODOLOGIA

Transformação Bacteriana: Inserção do plasmídeo comercial em um organismo competente (*E. coli*) através do choque térmico, aumentando a permeabilidade da membrana celular. PCR (Reação em cadeia da polimerase): Seleção de colônias transformadas que tiveram seu DNA extraído, e em seguida tiveram uma região específica do DNA amplificada por oligonucleotídeos desenhados especificamente para o anelamento naquela região e variação de temperatura proporcionada pelo termociclador. Utilizando os primers forwar 5'-CGCAGAGGTGGTGGTATT-3' e reverse 5'-AATGAGTTTGTCCACAGTAC-3'. Eletroforese: Utilização de um gel de agarose para a separação de fragmentos da molécula de DNA de acordo com seu tamanho por uma corrente elétrica contínua. Sendo que a amostra colocada migra do polo negativo para o positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizou-se a transformação das bactérias *E. coli* com o vetor comercial contendo o cDNA da proteína NCX1 de 2952 pb e resistente a ampicilina. Esse procedimento inicial visava amplificar o material para posteriores ensaios de clonagem e expressão em vetor pET-28. A placa de Agar seletivo contendo ampicilina permitiu o crescimento somente de colônias bacterianas que incorporaram o plasmídeo. Foram selecionadas 10 colônias para verificar se a transformação foi realizada corretamente por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a aplicação foram utilizados os primers descritos em metodologia que corresponderam exatamente a uma sequência alvo específica presente no gene da NCX1. A especificidade do primer foi modulada pelo seu comprimento e percentual das bases nitrogenadas, guanina e citosina. O comprimento do produto da PCR tem impacto na eficiência da replicação, sendo necessária modular o tamanho a ser replicado. O comprimento do produto da PCR teve sua aplicação específica para a verificação da etapa de transformação bacteriana. Com o intuito de detectar a sequência de DNA presente no gene, visando replicar uma região específica com o tamanho de até 1000pb do produto (DIEFFENBACH, LOWE, DVEKSLER. 1993). A eletroforese torna possível separar fragmentos de DNA na faixa de 10 pb até 50 Kpb. No entanto, a matriz a ser utilizada varia de acordo com o grau de separação e a faixa de tamanho que se deseja analisar, neste caso sendo de agarose (CHART, et al. 2000). A Figura 2 demonstra o resultado do procedimento da PCR evidenciando que todas as 10 colônias selecionadas incorporaram o plasmídeo comercial contendo o gene da NCX1.

Figura 2: Eletroforese do produto da PCR de colônia de bactérias transformadas com o gene comercial da NCX1.



Padrão representa os fragmentos com tamanhos conhecidos, utilizados para comparação. A última banda de cima para baixo corresponde a 500pb. Cada banda corresponde um acréscimo de 500pb, As amostras são representadas pelas colunas seguintes de 1 a 10. A região amplificada corresponde ao redor de 1000pb.

CONCLUSÕES

Conseguimos efetuar a amplificação do gene da NCX1 contida em vetor comercial utilizando os primers especificamente desenhados para ampliar uma região do gene da NCX1 ao redor de 1000pb de um total de 2952 pb. A NCX1 possui grande importância para estudos da fisiologia celular e a cada ano são publicados novos estudos explicando mais sobre suas interações. O projeto seguiu com seu cronograma até o mês de março. Mas devido ao estado de pandemia as atividades foram interrompidas. Não sendo possível concluir a etapa de clonagem. Com a retomadas das atividades do laboratório pretendemos para as próximas etapas isolar o cDNA da NCX1 do vetor comercial e transferi-lo ao vetor de expressão pET-28, expressar e purificar a proteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOSCIA F, DE ROSA V, CAMMAROTA M, SECONDO A, PANNACCIONE A, ANNUNZIATO L. The Na⁺/Ca²⁺ exchangers in demyelinating diseases. **Cell Calcium**. 2020; 85, 1-7.

CHAPTAL V, BESSERER GM, OTTOLIA M, NICOLL DA, CASCIO D, PHILIPSON KD, ABRAMSON J. How does regulatory Ca²⁺ regulate the Na⁺-Ca²⁺ exchanger? **Channels (Austin)**. 2007; 1(3), 397–399.

CHART H, SMITH HR, LA RAGIONE RM, WOODWARD MJ. An investigation into the pathogenic properties of Escherichia coli strains BLR, BL21, DH5alpha and EQ1. **Journal of Applied Microbiology**, 2000; 89(6), 1048–1058.

DIEFFENBACH CW, LOWE TM, DVEKSLER GS. General concepts for PCR primer design. **Genome Res.** 1993; 3, 30-37.

PHIPLIPSON KD, NICOLL DA, OTTOLIA M, QUEDNAU BD, REUTER H, JOHN S, QIU Z. The Na⁺/Ca²⁺ exchange molecule: an overview. **Ann N Y Acad Sci.** 2002; 976, 1-10.

ROBERTS, D. E; MATSUDA, T; BOSE, R. Molecular and Functional Characterization of the Human Platelet Na⁺ /Ca²⁺ Exchangers. **Br J Pharmacol**, 2012; 165, 922-936.