

Expressão e purificação do Fator de Crescimento Tumoral Beta (TGF- β)

Claudio C. Werneck (PQ), Bruna B. Soldera (IC).

Resumo

O fator de Crescimento Tumoral Beta- TGF- β é encontrado na matriz extracelular na sua forma inativa e latente, sendo ativado em momentos de agressão ao tecido. A Síndrome de Marfan, causada por mutações na proteína fibrilina-1, está diretamente relacionada ao desequilíbrio na ativação do TGF- β – bem como mutações na proteína MAGP1. Conseguimos expressar e purificar uma forma mutante de MAGP1, além de clonar bactérias com vetor contendo TGF- β .

Palavras Chave: síndrome de Marfan, MAGP-1, TGF-beta.

Introdução

As microfibrilas são constituídas principalmente por duas glicoproteínas: fibrilinas e MAGPs (Microfibril-Associated GlycoProtein)³. Fenótipos associados às mutações dessas proteínas são atribuídos a uma dificuldade da proteína mutada se ligar e sequestrar fatores de crescimento, como o TGF- β . O desbalanceamento do TGF- β está relacionado a muitas patologias, como por exemplo a Síndrome de Marfan, patologia relacionada a mutações no gene da fibrilina-1. A maioria dos sintomas dessa síndrome está relacionada a uma maior ativação do fator TGF- β , devido a uma redução, provavelmente, na quantidade de fibrilina-1 na matriz extracelular². Os objetivos são expressar e purificar uma variação da MAGP1 e sub-clonar, expressar e purificar o TGF- β , para tratar células da derme e verificar se o aumento da disponibilidade deste fator, é a causa das anomalias observados em camundongos com deficiência de fibrilina-1.

Resultados e Discussão

As bactérias transformadas e clonadas foram cultivadas e a expressão das proteínas foram induzidas, seguindo à purificação do extrato proteico, visando a obtenção de MAGP-1 e MAGP-1VG com alto grau de pureza. Os resultados da etapa da purificação, em banho de resina Ni-NTA, estão apresentados na figura 1.

Realizamos a transformação de bactérias DH5 α competentes com o plasmídeo cDNA Clone TGFB1 (Sino Biological Inc.), mas não obtivemos sucesso para prosseguir com o projeto para células eucarióticas. Estamos trabalhando para a resolução dos problemas para que seja possível a amplificação por PCR.

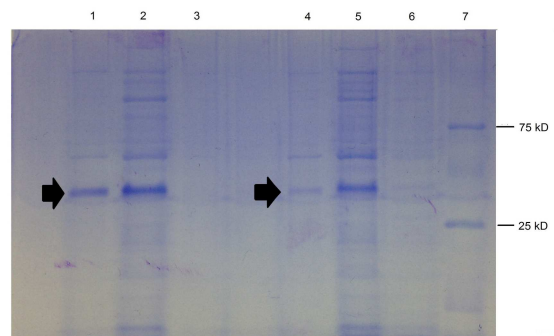


Figura 1: SDS-PAGE. 3 e 6. Extrato proteico antes da indução da expressão dos genes MAGP-1VG e MAGP-1, respectivamente, 2 e 5. Extrato proteico das bactérias induzidas para a expressão. 1 e 4. Proteína após o processo de purificação. 7. Padrão de peso molecular. A seta destaca as bandas correspondentes a MAGP-1VG e MAGP-1.

Conclusões

Apesar da banda de contaminantes presente em ambas as proteínas, se obteve como banda destaque a proteína de interesse e com um determinado grau de pureza, uma vez que as bandas correspondentes a essas proteínas se mostram presentes após a purificação.

Agradecimentos

Agradecimentos: CNPq

1. Kielty CM, Sherratt MJ, and Shuttleworth CA. 2002. Elastic fibres. *J Cell Sci* 49:223-228.
2. Weinbaum JS, Broekelmann TJ, Pierce RA, Werneck CC, Segade F, Craft CS, Knutsen RH, and Mecham RP. 2008. Deficiency in microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) leads to complex phenotypes in multiple organ systems. *J Biol Chem*.
3. Fahrenbach WH, Sandberg LB, Cleary EG. 1996. Ultrastructural studies on early elastogenesis. *Anat. Rec*. 155:563-576