

Análise da Proteína Recombinante RPL10 Nativa Expressa em Sistema Bacteriano

Katherine Weippert Saraiva e Regina Affonso
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

O estudo de proteínas de eucariotos teve um grande impulso a partir do seqüenciamento do genoma humano e de outros vertebrados superiores. Esta aquisição de conhecimento pela ciência abriu caminho para o desenvolvimento de novas técnicas para analisar o produto final de alguns genes na célula, as proteínas.

Algumas proteínas com funções já bem definidas, como as proteínas ribossomais, surpreenderam e estão surpreendendo pesquisadores por serem multifuncionais. Uma destas proteínas ribossomais que vem sendo estudada e propiciando informações bastante interessantes é a proteína ribossomal L10 (RPL10) (NCBI: NM_006013). Esta proteína é de grande importância para a síntese proteica, pois é a última de três proteínas que propiciam a ligação da subunidade 60S com a subunidade 40S, participa do acoplamento do mRNA (ácido ribonucléico mensageiro) no complexo ribossômico para o início da tradução deste último [1].

Outra função celular desta proteína é sua ação da supressão do desenvolvimento de células tumorais. Esta ação foi observada em linhagens celulares de tumor de Wilms (WT-1), um nefro blastoma pediátrico, que possui baixa quantidade de mRNA para esta proteína, quando comparada com a concentração deste mRNA em culturas revertidas ao fenótipo norma. Resultados semelhantes foram observados em tecido de alguns tumores de estômago, próstata e ovário [2].

Este trabalho está vinculado a um projeto no qual o objetivo é estudar a proteína RPL10, uma mutante desta e a ação destas

duas como inibidores do crescimento celular.

OBJETIVO

Geral: Caracterizar a proteína RPL10 recombinante. *Específico:* 1) Isolar a proteína RPL10 nativa após expressão em sistema bacteriano; 2) caracterizá-la físico-quimicamente e estruturalmente por ensaios de Fluorescência.

METODOLOGIA

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): Esta técnica é utilizada para avaliar a composição e grau de pureza de proteínas. **Western blotting:** Esta análise de proteína é feita pelo método imunológico, [3]. **Dosagem das proteínas: Método por Guanidina-** Este método quantifica a concentração de proteína total utilizando um agente caotrópico, a guanidina. **Caracterização por ensaios de Fluorescência:** os ensaios de Fluorescência permitem estudar a conformação terciária da proteína, por emissão de fluorescência dos triptofanos presentes na mesma. O comprimento de onda de excitação foi de 280 nm e os espectros de fluorescência foram coletados entre os comprimentos de onda de 300 nm a 430 nm.

RESULTADOS

A proteína RPL10 nativa já esta sendo expressa em sistema bacteriano com o vetor p1813_RPL10. A estrutura secundária já foi confirmada por análises por Dicroísmo Circular [2], porém as avaliações da

estrutura terciária por Fluorescência são necessárias para a conclusão desta parte inicial de caracterização da proteína RPL10. Após a expressão em sistema bacteriano e isolamento da proteína RPL10 esta foi avaliada em SDS-PAGE. Na Fig. 1 estão as amostras da expressão total de RPL10 (linha 1) e na linha 3 encontra-se a amostra da proteína isolada.

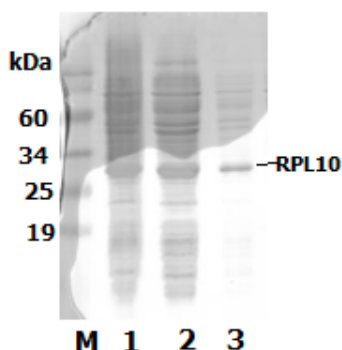


Figura. 1: Gel de poliacrilamida contendo amostras de cultura bacteriana expressando RPL10. Linhas: M, marcador de peso molecular; 1, extrato de cultura bacteriana induzida; 2, sobrenadante da cultura induzida (sp1); 3, amostra com a proteína RPL10 (sp2).

Após a obtenção da proteína com 95% de pureza, foi feita a quantificação pelo método de Guanidina e a média das quantificações foram $1,4 \pm 0,11$ mg de proteína RPL10 por mL de cultura bacteriana. Em seguida, foram feitas as análises da estrutura com a técnica de Fluorescência. Na Fig. 2 está o perfil obtido com a proteína RPL10.

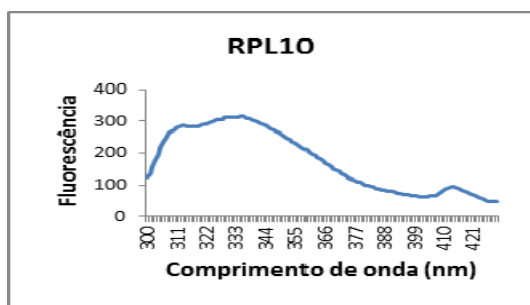


Figura 2: Perfil obtido com a proteína RPL10 com a técnica de Fluorescência.

Neste gráfico o pico de fluorescência foi em 335nm, próximo da fluorescência do Triptofano que é em 340nm. Estes dados mostram o enovelamento da proteína, pois a emissão do Triptofano não é máxima e o perfil obtido é similar ao descrito na literatura para a RPL10 de ostra [2]. As próximas etapas serão as análises da proteína interagindo com íons Zinco e a avaliação de sua conformação quando são retirados os íons Zinco.

CONCLUSÕES

A proteína RPL10 após expressa em sistema bacteriano foi isolada e a caracterização por SDS-PAGE confirmou seu isolamento e as análises da sua estrutura terciária foram confirmadas por Fluorescência. De posse destes resultados concluímos que a proteína RPL10 está em sua forma íntegra e na sua conformação correta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Sengupta J, Bussiere C, Pallesen J, West M, Johnson AW, Frank J. J Cell Biol., 189 (7):1079-86, 2010.
- [2] Pereira, L. M. "Clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural da proteína ribossomal L10 humana recombinante" Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2009.
- [3] Carvalho C V, Ricci G, Affonso R. Guia de práticas em Biologia Molecular, Yendis, 2010.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq