

# Expressão de Prolactina de Camundongo no Espaço Periplásmico de *Escherichia coli*

Miriam Fussae Suzuki<sup>1</sup>, Fernanda dos Santos Arthuso<sup>1</sup>, José Maria Souza<sup>1</sup>, João Ezequiel Oliveira<sup>1</sup>, Taís Lima Oliveira<sup>1</sup>, Nélio Alessandro de Jesus Oliveira<sup>1</sup>, Paolo Bartolini<sup>1</sup> e Carlos Roberto Jorge Soares<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP, Centro de Biotecnologia, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Butantã - 05800-000 São Paulo - SP - E-mail: [crsoares@ipen.br](mailto:crsoares@ipen.br)

## RESUMO

A prolactina é um neuro hormônio que faz parte da superfamília das citocinas e está envolvida em mais de 300 processos biológicos. Considerando-se a diferença de 41% encontrada na seqüência de aminoácidos da prolactina de camundongo em relação à humana, os experimentos que utilizam a prolactina humana em modelos animais (ratos ou camundongos), podem sofrer interferência de forma decisiva na interpretação dos resultados em estudos de doenças crônicas como o lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatóide. Nesse trabalho introduzimos o cDNA da prolactina de camundongo (mPRL) junto com o gene do peptídeo sinalizador DsbA em um cassete de expressão bacteriano desenvolvido em nosso laboratório que utiliza o promotor  $\lambda P_L$ . Esse plasmídeo foi utilizado para transformar diferentes cepas de *Escherichia coli* e o clone com expressão periplásmica mais eficiente foi selecionado para estudo de expressão, purificação e caracterização físico-química e biológica da mPRL.

**Palavras-chave:** prolactina de camundongo, *Escherichia coli*, hormônio recombinante, bioensaio.

## INTRODUÇÃO

A prolactina é um hormônio peptídico envolvido em numerosos processos fisiológicos que incluem osmorregulação, reprodução e imunorregulação. Grande interesse nos níveis de prolactina decorre da importância clínica no caso de mulheres com problemas de lactação (hipoprolactinemia) e infertilidade (hiperprolactinemia), assim como níveis elevados de prolactina foram relacionados com um aumento do risco de câncer de mama em mulheres pós-menopausadas (Tworoger *et al.*, 2004). A síntese e secreção deste hormônio se dão na parte anterior da hipófise na sua forma não modificada e modificada pós-traducional (fosforilação e glicosilação). A prolactina de camundongo é uma proteína de cadeia simples com 197 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto. Há várias isoformas da prolactina produzida na hipófise sendo a majoritária de 23 kDa. As estruturas primárias das prolactinas de camundongo, rato e humana foram obtidas pelo seqüenciamento do DNA complementar. Embora a maior fonte de PRL seja a hipófise, a PRL e seu RNA mensageiro têm sido encontrados em uma variedade de tecidos (Ben-Jonathan *et al.*, 1996). A presença da PRL nestes tecidos se deve não apenas à proteína circulante ligada a receptores, mas a sua síntese e ação autócrina e/ou parácrina. A prolactina faz parte da superfamília das citocinas tipo 1 que inclui muitas interleucinas e ciclinas. Possui ação direta no controle do ciclo celular, na promoção da diferenciação e da apoptose (Walker, 2001). Alterações nos níveis de PRL estão

relacionadas com doenças como artrite reumatóide, fibrose cística e câncer de colo retal, entre outros (Ben-Jonathan *et al.*, 1996).

A expressão de proteínas recombinantes no espaço periplásmico apresenta uma série de vantagens: poucos contaminantes, pouca atividade proteolítica e pequena quantidade ou ausência de isoformas indesejáveis como moléculas com alto peso molecular, formas glicosiladas, fosforiladas ou clivadas. A produção no espaço periplásmico também apresenta a vantagem de conter apenas 4% das proteínas totais da bactéria. Este fato reduz o custo de purificação. Além disso, o peptídeo sinalizador é clivado o que proporciona a retirada da metionina da porção N-terminal presente na proteína produzida em corpos de inclusão.

O objetivo deste trabalho foi obter e avaliar a expressão da prolactina de camundongo no espaço periplásmico de três cepas de *E. coli*, selecionando o clone mais eficiente para uma produção laboratorial de mPRL. Temos por metas futuras desenvolver bioensaios homólogos em camundongos para estudar doenças inflamatórias e do sistema imune como: lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide utilizando a mPRL e seu antagonista S177D-mPRL.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Construção do plasmídeo.** A seqüência do cDNA da mPRL foi obtida através do banco de dados do NCBI. O plasmídeo  $\lambda P_L$ -DsbA-mPRL, foi obtido substituindo o gene do hGH presente no plasmídeo  $\lambda P_L$ -DsbA-hGH (Soares *et al.*, 2003) pelo cDNA da mPRL sintetizado pela GenScript Corporation, conforme esquema apresentado na Figura 1 A.

**Análise de Expressão.** Para a expressão da mPRL foram selecionados clones a partir de placas LB/Agar com ampicilina. O cultivo foi realizado em frascos com meio LB e ampicilina. Foi inoculada uma única colônia de *E. coli* obtida da placa de seleção, a incubação foi realizada a 30° C com agitação rotacional (140 rpm). Após ser atingida uma biomassa superior a 1,5 A<sub>600</sub>, foi realizada a ativação caracterizada pelo aumento da temperatura para 37° C, mantendo essa temperatura por 6 horas. É importante ressaltar que neste caso o promotor  $\lambda P_L$  foi utilizado como promotor constitutivo, não usamos, portanto, o plasmídeo responsável pela síntese do repressor termo-lábil clts, mesma estratégia que teve sucesso na expressão da hPRL (Soares *et al.*, 2008).

**Choque osmótico.** O produto da fermentação foi submetido ao choque osmótico, (incubação em meio hipertônico seguido de incubação em meio hipotônico), utilizado para extrair proteínas periplásmicas a partir da suspensão bacteriana da fermentação, sem que ocorra ruptura da célula (Soares *et al.*, 2003). A quantidade de mPRL presente no extrato periplásmico foi determinada por cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC).

**Purificação e caracterização.** Para os estudos iniciais de purificação da mPRL foi realizada uma fermentação em biorreator (Soares *et al.*, 2008). A mPRL presente no extrato periplásmico foi purificada utilizando cromatografia de afinidade por metais imobilizados (IMAC), seguindo o protocolo descrito por Soares e colaboradores (2008). A mPRL foi eluída com 3 mM de imidazol. As principais frações de mPRL eluídas durante a cromatografia por IMAC foram analisadas por cromatografia líquida de alto desempenho de exclusão molecular (HPSEC) e a fração com maior concentração foi aplicada novamente na mesma coluna, que desta vez funcionou como coluna preparativa. A mPRL purificada foi então caracterizada por processos físico-químicos (HPSEC, RP-HPLC, SDS-PAGE e Western Blotting) e ensaios biológicos de proliferação celular.

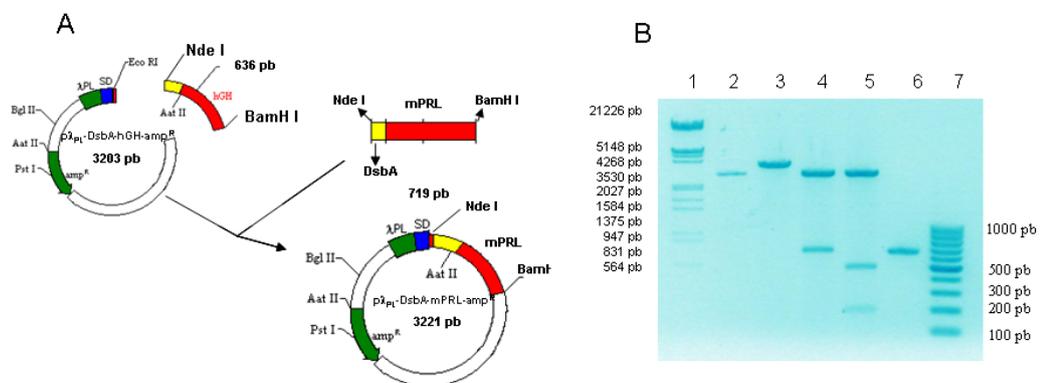
**Ensaio biológicos.** A atividade biológica da mPRL foi avaliada por um ensaio de proliferação realizado com células Nb2, uma linhagem prolactina-dependente derivada de linfoma de rato (Tanaka *et al.*, 1980). Depois de 72 h de incubação a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>, o

número de células viáveis foi avaliado por coloração com MTS em comparação com o padrão da WHO 97/714 ( $57,2 \pm 11$  IU/mg).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 2.1. Construção dos vetores

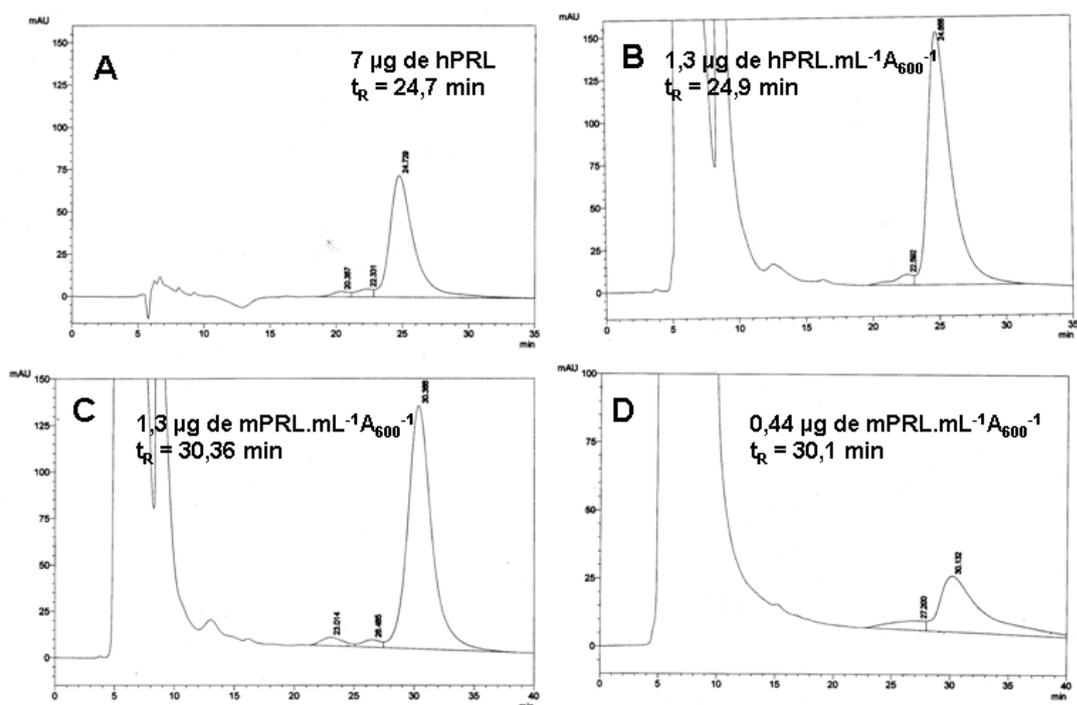
A análise em gel de agarose dos plasmídeos digeridos com as enzimas de restrição NdeI, BamHI e EcoRI mostraram que o inserto estava no sentido correto. Quando digerido somente com a enzima BamHI, observamos a linearização do plasmídeo e apenas uma banda com 3221 pb no gel de agarose (Figura 1 B, amostra 3). Já com as enzimas NdeI e BamHI, observamos duas bandas (Figura 1 B, amostra 4): a do vetor com 2567 pb e a do inserto com 719 pb. A seqüência da mPRL apresenta um sítio EcoRI na posição 108, gerando, desta forma três fragmentos quando digerido com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI: o do vetor com 2567 pb, um fragmento com 545 pb e outro com 174 pb (Figura 1 B, amostra 5).



**Figura 1 - A.** Esquema de construção do plasmídeo bacteriano para expressão de mPRL. **B.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. [1] marcador de massa molecular em nº de par de bases (pb), (500 ng de Lambda DNA completamente digerido com EcoRI e HindIII); [2] cassete de expressão, 110 ng do vetor λP<sub>L</sub> digerido com NdeI e BamHI, purificado e desfosforilado, fragmento com 2567 pb; [3] plasmídeo λP<sub>L</sub>-DsbA-mPRL (240 ng) linearizado com a enzima BamHI, fragmento com 3221 pb; [4] λP<sub>L</sub>-DsbA-mPRL digerido com NdeI e BamHI; [5] λP<sub>L</sub>-DsbA-mPRL digerido com EcoRI e BamHI; [6] 260 ng do inserto purificado do DNA correspondente ao DsbA-mPRL, fragmento com 719 pb; [7] marcador de massa molecular em número de par de bases (pb), "GeneRuler Ladder 100 pb" (500 ng).

### Análise de expressão por HPLC de fase reversa

Confirmada a correta construção dos vetores, os mesmos foram utilizados para transformar três cepas de *E. coli*: a W3110, a RRI e a RB 791. A Figura 2 apresenta exemplos de análises, incluindo a análise de extrato periplásmico de uma cepa produtora de hPRL, assim como a análise do padrão de referência de hPRL derivado de *E. coli* produzido em nosso laboratório, cuja área do pico principal do cromatograma serviu para calcular os valores de expressão dos clones. A Tabela 1 apresenta os valores de expressão obtidos pelas diferentes cepas. A cepa RB791 por apresentar maiores níveis de expressão e maior reprodutibilidade foi escolhida para seguir nos estudos de fermentação e purificação.



**Figura 2.** Exemplos de cromatogramas das análises por RP-HPLC. **A.** Padrão de referência de hPRL purificada derivada de *E. coli*. **B, C e D** extratos periplásmico das cepas W3110, RB791 e cepa RRI transformadas com o plasmídeo  $\lambda P_L$ -DsbA-mPRL, respectivamente.

**Tabela 1.** Expressão de mPRL por três cepas de *E. coli* avaliadas por RP-HPLC.

Cepa	mPRL ( $\mu\text{g}/\text{mL}/A_{600\text{nm}}$ )	n (número de análises)
RB791	$0,613 \pm 28,3 \%$	11
W3110	$0,506 \pm 57,5 \%$	6
RRI*	$0,235 \pm 68,5 \%$	3

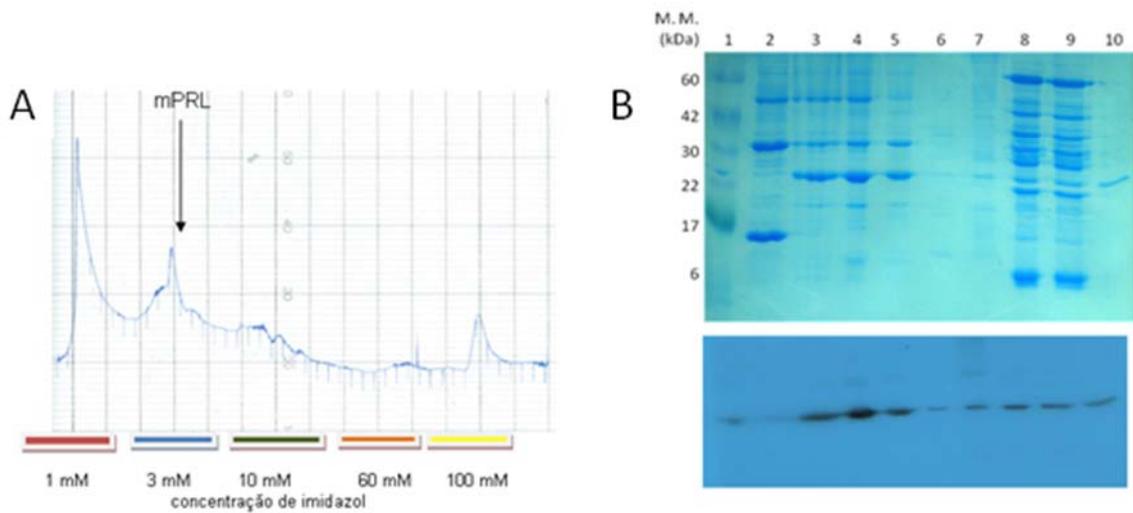
\* não foram consideradas 5 análises com expressão inferior a  $0,05 \mu\text{g}/\text{mL}/A_{600\text{nm}}$ .

## Purificação

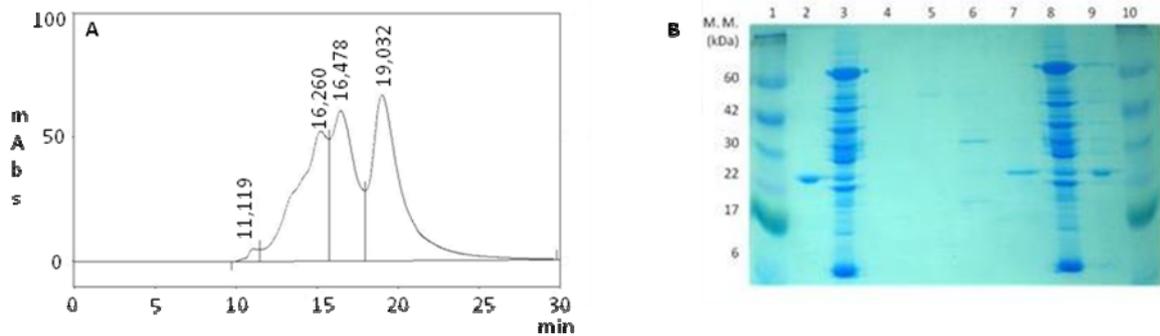
A purificação da mPRL presente em 500 mL de extrato periplásmico obtidos da fermentação em biorreator da cepa RB791 foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa o extrato periplásmico dialisado para eliminar resíduos de EDTA foi submetido à IMAC. O perfil cromatográfico obtido dessa purificação é apresentado na Figura 3. Na segunda etapa a mPRL presente na fração eluída com 3 mM de imidazol foi purificada por exclusão molecular utilizando a HPSEC como coluna preparativa apresentando quatro picos principais (Figura 4 A). Observamos que a mPRL estava presente no pico 4 após a coleta e a análise por SDS-PAGE (Figura 4 B).

## Caracterização da mPRL purificada

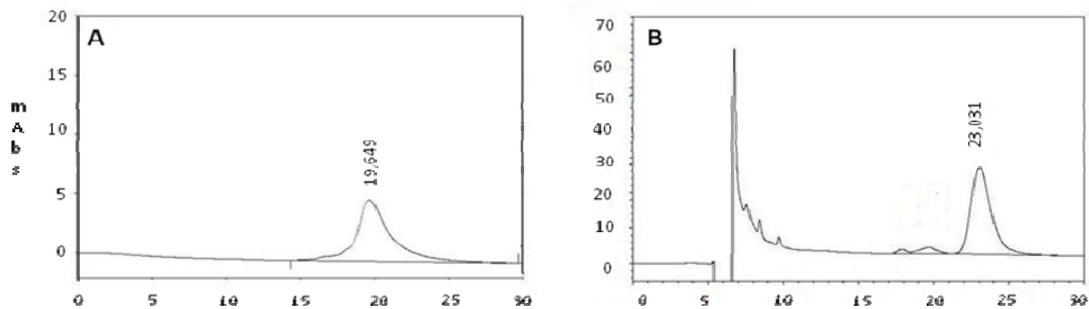
A mPRL purificada (pico 4 da HPSEC) foi analisada por HPSEC e por RP-HPLC, apresentando tempos de retenção de 19,6 e 23,0 minutos respectivamente, como mostra a Figura 5. A atividade biológica foi avaliada pelo ensaio de proliferação celular com células Nb2 (Figura 6). Na comparação entre as duas curvas de proliferação, (amostra versus padrão de hPRL WHO 97/714), a potência biológica para a mPRL recombinante produzida no IPEN foi de  $75,3 \pm 2,6 \text{ UI}/\text{mg}$ .



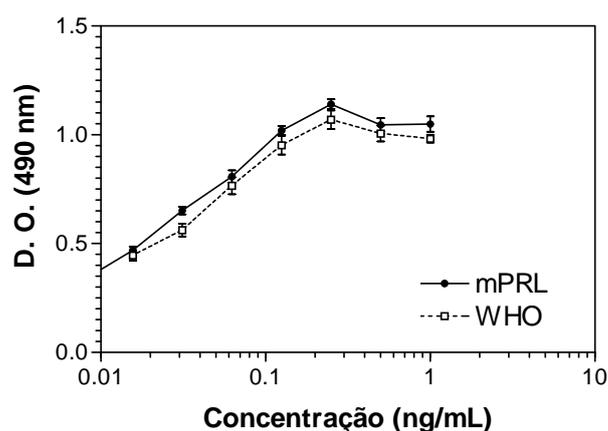
**Figura 3.** **A.** Perfil cromatográfico obtido na primeira etapa de purificação mediante IMAC. A seta indica a fração principal de mPRL obtida durante a eluição com 3mM de imidazol. **B.** SDS-PAGE e Western Blotting da mPRL das frações obtidas durante a purificação: [1] marcador de massa molecular e hPRL, [2] coleta IMAC 1 mM, [3] coleta IMAC 3 mM tubo 12, [4] coleta IMAC 3 mM tubo 13, [5] coleta IMAC 10 mM, [6] coleta IMAC 60 mM, [7] coleta IMAC 100 mM, [8] fluido osmótico, [9] fluido osmótico dialisado e [10] mPRL purificada.



**Figura 4.** **A.** Cromatograma por HPSEC preparativa da fração eluída com 3 mM de imidazol da IMAC. **B.** SDS-PAGE analisando as frações coletas. [1] marcador de massa molecular, [2] hPRL, [3] fluido osmótico, [4] coleta HPSEC pico 1, [5] coleta HPSEC pico 2, [6] coleta HPSEC pico 3, [7] coleta HPSEC pico 4 (fração principal de mPRL), [8] fluido osmótico, [9] hPRL e [10] marcador de massa molecular.



**Figura 5.** Análise da prolactina de camundongo expresso no periplasma da cepa RB791 de *E. coli* obtida após as duas etapas de purificação. **A.** Análise por HPSEC e **B.** Análise por RP-HPLC.



**Figura 6.** Curva dose-resposta com células Nb2. A potência da amostra de mPRL (●) foi determinada ( $75,3 \pm 2,6$  IU/mg) utilizando o primeiro padrão de hPRL recombinante da WHO 97/714 ( $57,2$  IU/mg) (□). Cada ponto da curva foi obtido com amostras em quadruplicatas.

## CONCLUSÕES

Os resultados de expressão e caracterização da prolactina de camundongo foram positivos. A construção do vetor foi realizada com sucesso e os níveis de expressão de mPRL foram comparáveis aos obtidos em nosso laboratório com a cepa produtora de hPRL (Soares *et al*, 2008). A fermentação em biorreator e purificação seguindo protocolos padronizados para hPRL também foram reprodutivos e permitiram obter mPRL com aproximadamente 95% de pureza, conforme demonstrado nas análises por HPSEC e SDS-PAGE. A mPRL apresentou atividade imunológica, comprovada por análises por WB, em resposta cruzada com anticorpos anti-hPRL, e confirmou também ser biologicamente ativa, apresentando uma forte atividade proliferativa sobre as células Nb2 que são prolactino-dependentes. Portanto, foi obtida pela primeira vez, a mPRL autêntica produzida no espaço periplásmico bacteriano.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ben-Jonathan, N.; Mershon, J. L.; Allen, D. L. e Steinmetz, R. W. (1996), Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Reviews*, v. 17, n. 6, p. 639-669.
- Soares, C. R. J.; Ueda, E. K.; Oliveira, T. L.; Gomide, F. I. C.; Heller, S. R. e Bartolini, P. (2008), Distinct human prolactin (hPRL) and growth hormone (hGH) behavior under bacteriophage lambda P<sub>L</sub> promoter control: temperature plays a major role in protein yields, *Journal of Biotechnology*, v. 133, n. 1, p. 27-35.
- Soares, C. R. J.; Gomide, F. I. C.; Ueda, E. K. M. e Bartolini, P. (2003), Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the lambda PL promoter: use of HPLC for product quantification, *Protein Engineering*, v. 16, n. 12, p. 1131-1138.
- Tanaka, T.; Shiu, R. P. C.; Gout, P. W.; Beer, C. T.; Noble, R. L. e Friesen, H. G. (1980), A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 51, n. 5, p. 1058-63.
- TwoRoger, S. S.; Eliassen, A. H.; Rosner, B.; Sluss, P. e Hankinson, S. E. (2004), Plasma prolactin concentrations and risk of postmenopausal breast cancer. *Cancer Research*, v. 64, p. 6814-6819.
- Walker, A.M. (2001), Unmodified and phosphorylated prolactin and gamma delta T cell development and function. *Lupus*, v. 10, n. 10, p. 735-741.