

# Expressão do antagonista de receptor do hormônio do crescimento humano G120R-hGH no espaço periplásmico de *Escherichia coli* e sua caracterização físico-química e biológica

Ana Carolina da Silva Cordeiro de Menezes e Carlos Roberto Jorge Soares  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN - CNEN/SP

## INTRODUÇÃO

O hormônio do crescimento humano (hGH) é uma proteína sintetizada pela hipófise e apresenta 191 aminoácidos e 22 kDa. Pertence à família das citocinas e se liga a receptores de hGH e de prolactina humana (hPRL). A simples troca, nessa proteína, do aminoácido glicina na posição 120 pela lisina, levou à descoberta de um antagonista de receptor de hGH e de hPRL [1]. Outras modificações adicionais resultaram em um antagonista específico para receptores de hGH, originando a droga Pegvisomant, aprovada para uso em pacientes com acromegalia [2]. Considerando que em nossas pesquisas utilizamos antagonistas de hPRL para comprovar o envolvimento da prolactina com o aumento da diabetes e a proliferação do câncer, optamos por sintetizar esse antagonista de G120R-hGH, de difícil disponibilidade, e que por ser também antagonista de hPRL será utilizado em nossos estudos.

## OBJETIVO

Síntese em bactérias *E. coli*, purificação e caracterização do antagonista de receptor do hormônio de crescimento humano G120R-hGH. O antagonista será caracterizado por técnicas físico-químicas como HPLC, SDS-PAGE, Western Blotting e por ensaios biológicos de proliferação *in vitro* com células Nb2.

## METODOLOGIA

A sequência do cDNA do antagonista do hGH contendo o gene correspondente ao peptídeo sinalizador bacteriano DsbA e os sítios para as enzimas de restrição NdeI e BamHI foi introduzido no cassete de expressão, desenvolvido em nosso

laboratório [3], que contém o promotor  $\lambda$ PL e o gene para resistência a ampicilina. Após confirmação da correta construção o plasmídeo foi amplificado e introduzido por choque térmico das cepas W3110 e RRI.

O crescimento dos clones bacterianos foi inicialmente realizado a 30°C até uma densidade óptica máxima, seguida da elevação da temperatura para expressão da proteína, por um período de 6 horas. Foram comparadas diferentes temperaturas: 32°C, 35°C, 37°C e 42°C. Nesse estudo o promotor atuou de forma constitutiva, portanto sem a presença do repressor.

A caracterização físico-química foi feita por SDS-PAGE, Western Blotting (WB) e HPLC de fase reversa (RP-HPLC) e de exclusão molecular (HPSEC) [3].

Os ensaios de proliferação celular foram realizados com a linhagem Nb2, derivada de linfoma de rato. Foram avaliados os efeitos de inibição do antagonista no crescimento celular na presença do hGH. A leitura foi feita na absorbância de 490 nm, após adição de MTS/PMS.

## RESULTADOS

O sucesso na obtenção do plasmídeo foi comprovado por análise de restrição e sequenciamento do DNA. O estudo com as cepas W3110 e RRI comparando diferentes temperaturas de expressão mostrou que a melhor condição ocorreu na temperatura de 37°C com a cepa W3110, com expressão de  $1,60 \pm 0,26 \mu\text{g/mL/A}_{600}$  (Fig. 1).

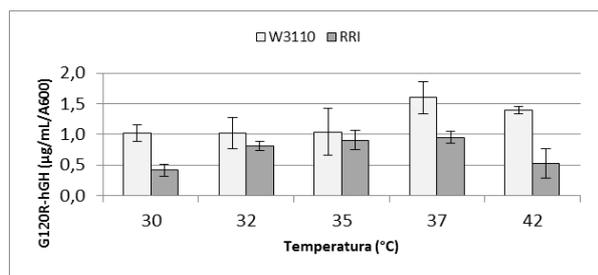


Figura 1. Comparação da produção de G120R-hGH pelas cepas W3110 e RRI em diferentes temperaturas. Quantificação por RP-HPLC (n = 4).

Após a extração do G120R-hGH do periplasma das bactérias, por choque osmótico, seguiu-se a purificação realizada em três etapas, com rendimento final de 32%. Nas figuras 2A e 2B observamos que as amostras de cada etapa da purificação analisada por SDS-PAGE apresentaram diminuição nas formas de alta massa molecular e o Western Blotting confirmou o reconhecimento da proteína pelo anticorpo. O produto final analisado por RP-HPLC apresentou 3% de formas oxidadas e desamidadas (Fig. 2C) e na análise por HPSEC confirmou um grau de pureza superior a 99% (Fig. 2D).

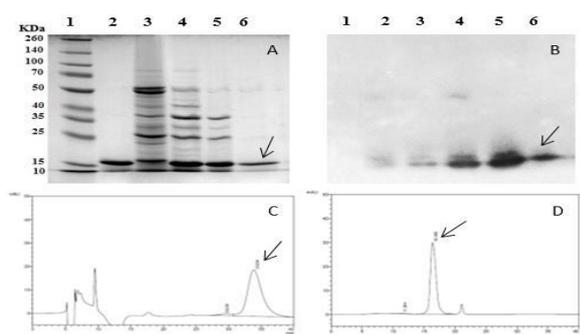


Figura 2. Caracterização físico-química do G120R-hGH: SDS-PAGE (A) e WB (B) de amostras da purificação: 1, marcador de massa molecular; 2, rec-hGH (OMS); 3, fluido periplásmico; 4 a 6 coletas da Q Sepharose Fast Flow, Sephacryl S100 e HPSEC, respectivamente; cromatograma em RP-HPLC (C) e HPSEC (D) do produto final.

No ensaio de proliferação celular com células de linfoma de rato Nb2 na presença de hGH (1 ng/mL) e do antagonista G120R-hGH (100 ng/mL) mostrou cerca de 30% de inibição na proliferação celular.

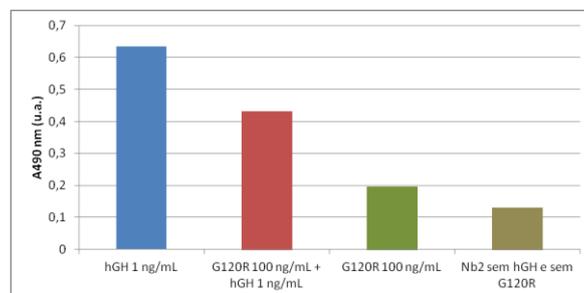


Figura 3. Ensaio biológico de proliferação com células Nb2 adicionando hGH e G120R-hGH (n = 3, média de 3 ensaios).

## CONCLUSÕES

Pela primeira vez, foi obtida a expressão do antagonista de hGH no espaço periplásmico. A produção em escala laboratorial a partir de 3L de meio de cultura LB resultou em 5 mg de G120R-hGH com pureza superior a 99%. Esse trabalho abre perspectivas para estudar novas aplicações terapêuticas, incluindo futuros ensaios biológicos *in vivo* para esse antagonista, que a princípio estava esquecido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [105]Fuh, G., Cunningham, B. C., Fukunaga, R., Nagata, S., Goeddel, D. V. & Wells, J. A., Science, v. 256, p. 1677-80, 1992.
- [106]Kopchick, J. J., List, E. O., Kelder, B., Gosney, E. S. & Berryman, D. E., Mol Cell Endocrinol, v. 386, p. 34-45, 2014.
- [107]Soares, C. R., Ueda, E. K., Oliveira, T. L., Gomide, F. I., Heller, S. R., Bartolini, P., J Biotechnol, v. 133, p. 27-35, 2008.

## APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

FAPESP e CNPq.