

Síntese e Caracterização de Prolactina de Camundongo em Células CHO

Aline Barros da Silva e Carlos Roberto Jorge Soares
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

INTRODUÇÃO

A prolactina é um neurohormônio que faz parte da superfamília das citocinas e está envolvida em mais de 300 processos biológicos [1]. Considerando-se a diferença de 41% encontrada na seqüência de aminoácidos da prolactina de camundongo em relação à humana e levando-se em conta que os modelos animais utilizados em ensaios *in vivo* com prolactina humana são geralmente heterólogos (ratos ou camundongos), fica evidente que esses fatores podem interferir de forma decisiva na interpretação correta dos resultados e que experimentos em sistema homólogo seriam desejáveis [2]. A obtenção da mPRL e sua caracterização físico-química e biológica serão úteis para desenvolver estudos que envolvem modelos animais tanto com células tumorais como com doenças crônicas como o lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatoide.

OBJETIVO

O objetivo deste projeto é a síntese de prolactina de camundongo (mPRL) em células CHO.

METODOLOGIA

Construção do vetor pEDdc-mPRL para células CHO

O plasmídeo pEDdc foi gentilmente doado pelo Dr. Wood (Genetics Institute, Cambridge, MA, EUA). O gene correspondente à mPRL foi obtido por PCR

a partir do vetor do pUC57 –mPRL, previamente obtido em nosso laboratório. O vetor pEDdc-mPRL foi obtido pela inserção do gene da mPRL no único sítio XbaI presente no vetor pEDdc linearizado pela ação da enzima XbaI e desfosforilado com a enzima CIAP. Para confirmação da construção foram realizadas análises de restrição com as enzimas Bam HI, XbaI, XhoI e EcoRI, assim como sequenciamento do cDNA. As etapas seguintes consistiram em transfecção do vetor e seleção dos clones, produção em placas, caracterização físico-química da mPRL por Western Blotting (Dotblot).

RESULTADOS

A construção do vetor pEDdc-mPRL foi realizada conforme esquema apresentado na Fig. 1A. O peptídeo sinalizador e os sítios de restrição para a enzima XbaI foram adicionados ao cDNA da mPRL por PCR (Fig. 1B). Após a purificação dos fragmentos de DNA por gel de agarose com o kit de extração de DNA (QIAGEN, EUA), foi realizada a reação de ligase e transformação por choque térmico de bactérias *E.coli* competentes. As análises de restrição com as enzimas XbaI, EcoRI, BamHI, XhoI foram feitas após extração dos plasmídios dos clones obtidos. O gene da mPRL de dois clones positivos foram sequenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano (IB – USP) e confirmaram a correta construção do vetor pEDdc-mPRL. Após a transfecção das células CHO dhfr- foram selecionados 24 clones para a etapa de amplificação gênica utilizando o metotrexato (MTX).

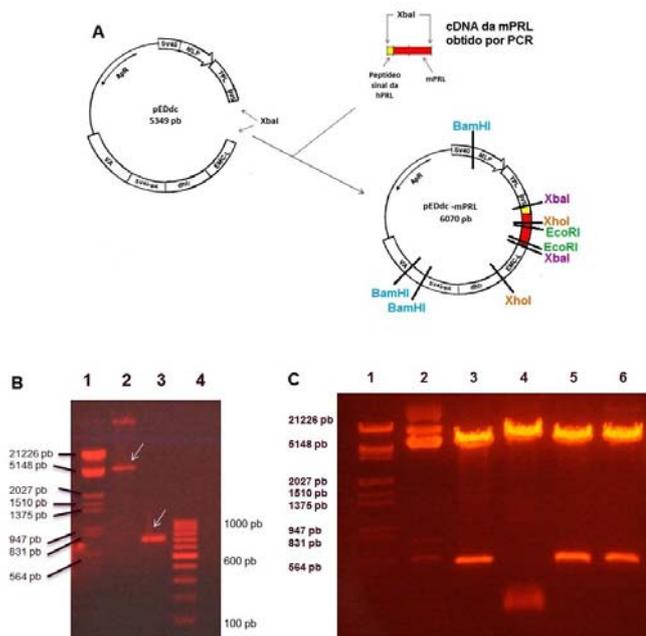


Figura 1. **A**, esquema de construção do vetor pEDdc-mPRL. **B**, análise por gel de agarose dos fragmentos de DNA utilizados na reação de ligase: vetor (2) e do produto da síntese por PCR do cDNA da mPRL contendo o peptídeo sinalizador da hPRL (3). **C**, exemplo de análise de restrição com a enzima EcoRI, confirmando a correta construção dos clones 2, 4 e 5.

Para verificar se houve expressão e secreção da mPRL no meio de cultura, foi realizado o imunoenensaio Dotblot. Foram escolhidos quatro clones: # 2, 6, 8 e 11, o meio foi concentrado 5x em colunas Amicon, aplicadas na membrana de nitrocelulose e reveladas com luminol (Fig. 2).

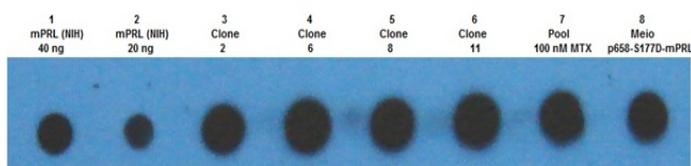


Figura 2. Dotblot analisando amostras dos clones # 2, 6, 8, 11: foram aplicados 100 µL por poço do meio condicionado CHO-SFMII, concentrado 5 vezes.

CONCLUSÕES

A construção do vetor pEDdc-mPRL foi realizada com sucesso e confirmada por análise de restrição e sequenciamento do cDNA. O Dotblot confirmou a presença da

mPRL no meio condicionado, antes das etapas de amplificação gênica com MTX. Esse reconhecimento pelo anticorpo anti-mPRL é um importante teste de identidade, porém não discrimina a presença de agregados, dímeros ou fragmentos. Estudos mais precisos sobre a expressão específica e a caracterização da mPRL serão realizados após as etapas de amplificação gênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BEN-JONATHAN N, MERSHON JL, ALLEN DL, STEINMETZ RW. Extrapituitary prolactina: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr. Rev.* 1996, 17(6):639-669.

[2] SUZUKI MF, ARTHUSO FS, OLIVEIRA NAJ, GOULART HR, CAPONE MVN, RIBELA MTCP, BARTOLINI P, SOARES CRJ. Expression, purification, and characterization of authentic mouse prolactin obtained in Escherichia coli periplasmic space. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2012, 59(3):178-185.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

Auxílio FAPESP processo 07/59540-3 e projeto Universal CNPq 479455/2011-2.