



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO CITOPLASMÁTICA BACTERIANA
DE UMA FORMA DE PROLACTINA HUMANA E DE SUA
SOLUBILIZAÇÃO E RENATURAÇÃO A PARTIR DE
CORPOS DE INCLUSÃO**

REGINA AFFONSO

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear -Aplicações.**

**Orientador:
Dr. Paolo Bartolini**

**São Paulo
2000**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
Autarquia associada à Universidade de São Paulo**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO CITOPLÁSMICA BACTERIANA DE
UMA FORMA DE PROLACTINA HUMANA E DE SUA
SOLUBILIZAÇÃO E RENATURAÇÃO A PARTIR DE CORPOS DE
INCLUSÃO**

REGINA AFFONSO



**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientador:
Dr. PAOLO BARTOLINI**

SÃO PAULO

2000

Eu Sou o Que Sou

P *Por fim, alcancei a minha meta,
E desvendei o segredo da minha alma.
Eu sou aquele a quem sempre rezei
Aquele a quem pedi ajuda
Eu sou aquele a quem tanto procurei
Eu sou o cume da minha própria montanha.*

*E vejo a criação como página do meu próprio livro.
Eu sou um só, feito de muitos,
A substância de tudo,
Pois dois não há.
O todo sou eu.
A criação sou eu.
Pois o que eu me concedo, eu tomo de mim mesmo
E dou a mim mesmo: o absoluto.
Pois o pai e o filho sou eu.
O que eu quero eu faço.
E vejo meus desejos fluindo, realizados.
Pois eu sou o conhecedor e o conhecido.
O súdito, o trono e o rei.*

*A dúvida em mim surgia,
Quando descobri que comigo havia brincado.
E, acordado que estou agora,
meu trono eu recupero,
E governo meu próprio reino,
Que sou eu,
Eu, o mestre, pela eternidade afora.*

Jan Bowman

*A minha Guia Espiritual.
Aos meus pais.
À Maria Helena e ao Júlio por
ensinarem o que é amizade.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paolo Bartolini pela oportunidade de realização deste trabalho.

À amiga Maria Helena Bellini Marumo pelo incentivo, colaboração, discussões e sugestões.

À Rosângela Arkatem, à Mônica Mator e à Yoko Murata pela colaboração na realização de alguns ensaios.

À Dra. Maria Teresa C. P. Ribela pelas discussões e sugestões.

Aos colegas da Supervisão de Radioensaios pelo auxílio e apoio.

Ao Júlio T. Marumo pela colaboração e incentivo na confecção desta tese.

Aos colegas do Departamento de Rejeitos Radioativos e da Supervisão de Radiobiologia pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À CNEN/SP e ao CNPq pela concessão de recursos financeiros.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da USP por ter cedido o equipamento para a quantificação de proteínas.

A todos que direta e indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

ESTUDO DA EXPRESSÃO CITOPLÁSMICA BACTERIANA DE UMA FORMA DE PROLACTINA HUMANA E DE SUA SOLUBILIZAÇÃO E RENATURAÇÃO A PARTIR DE CORPOS DE INCLUSÃO

Regina Affonso

RESUMO

Neste trabalho foi realizado um estudo relativo aos elementos que podem influenciar os elevados níveis de expressão de uma forma de prolactina humana (taghPrl) obtida no citoplasma bacteriano. Primeiramente foram otimizadas as condições de expressão utilizando um vetor de referência (ptac-taghPrl), no qual variaram-se as concentrações do agente ativador (IPTG) e o tipo de cepa bacteriana. As cepas utilizadas foram HB2151, RRI e RB791 e a expressão maior ($113 \pm 16 \mu\text{g/mL.A}_{600}$) foi obtida com IPTG 0,1 mM, na cepa HB2151. Em um segundo estudo foi avaliada a influência, na eficiência de expressão de taghPrl, do terminador de transcrição (*g32* do bacteriófago T4), do ativador de tradução (*g10* do bacteriófago T7), do gene que confere resistência ao antibiótico (*amp^r* ou *kan^r*) e do promotor (λP_L ou *tac*). A análise do terminador de transcrição, da sequência ativadora de tradução e dos promotores, mostrou que esses elementos não influenciam significativamente a expressão de taghPrl, pelo menos em nossos sistemas. O resultado obtido a partir da análise dos genes que conferem resistência ao antibiótico ampicilina e canamicina mostrou, inesperadamente, que a eficiência de expressão é aproximadamente 5 vezes maior para os vetores que possuem este último gene. O último estudo visou a obtenção de taghPrl monomérica por meio de uma metodologia de extração, solubilização,

renaturação e purificação que proporcionasse bons rendimentos, juntamente com uma alta qualidade do produto. Adaptando uma metodologia que emprega uréia e β -mercaptoetanol como agentes solubilizantes, a renaturação sendo realizada por diálise, obteve-se uma recuperação final de $35,4 \pm 4,5$ % de taghPrl monomérica, uma das maiores já descritas na literatura. A atividade biológica da taghPrl, testada em células Nb2, foi da mesma ordem daquela encontrada para o Padrão Internacional de prolactina humana de origem pituitária é da mesma ordem das preparações mais puras de hPrl.

Com base nestes dados podemos concluir que o sistema de expressão citoplásmico aqui descrito, com uma eficiência de expressão 50-100 vezes superior à expressão periplásmica, pode representar uma válida alternativa para a produção deste e de outros hormônios de interesse e qualidade farmacêutica.

A STUDY OF THE CYTOPLASMIC EXPRESSION OF A FORM OF HUMAN PROLACTIN AND OF ITS SOLUBILIZATION AND RENATURATION FROM BACTERIAL INCLUSION BODIES

Regina Affonso

Abstract

Different vector elements, that can determine a high expression level of a form of human prolactin (taghPrl) in bacterial cytoplasm, were studied. Expression conditions were first optimized for a reference vector, which was used to transform different strains of *E. coli*: HB2151, RRI and RB791. The highest expression level ($113 \pm 16 \mu\text{g/mL} \cdot A_{600}$) was obtained in HB2151, after activation with only 0.1 mM IPTG. At this point the influence of the transcription terminator (*g32* from bacteriophage T4), of the translation enhancer (*g10* from bacteriophage T7), of the promoter (λP_L or *tac*) and of the antibiotic resistance gene (*amp^r* or *kan^r*) were studied. The first three elements did not show any significant influence, at least in our systems. On the contrary, the analysis of the influence of *amp^r* and *kan^r* genes showed, unexpectedly, that the presence of the last one provides an approximately 5 - fold higher expression for taghPrl in *E. coli* cytoplasm.

Finally, an appropriate extraction, solubilization, renaturation and purification process, able to provide a monomeric form of taghPrl, was studied. A method utilizing urea and mercaptoethanol as solubilizing agents and a dialysis as a renaturation procedure, provided with some modifications, one of the highest yields ever reported in the literature: $35.4 \pm 4.5\%$ of total recovery. Moreover, the biological activity of the taghPrl obtained, when tested in the Nb2 cell proliferation assay, was of the same order of that shown by the International Standard of human prolactin of pituitary origin.

These data show that the cytoplasmic expression system here described, which can provide an expression efficiency 50-100 – fold higher than the periplasmic expression, can represent a valid alternative for the production of this and of other hormones of pharmaceutical interest and grade.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos do Trabalho	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1. MATERIAIS	
2.1.1. Equipamentos e acessórios principais	15
2.1.2. Nucleotídeo marcado	16
2.1.3. Oligonucleotídeos	17
2.1.4. Marcadores de peso molecular	17
2.1.5. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas	17
2.1.6. Vetores de expressão	18
2.1.7. Elementos constituintes dos vetores	18
2.1.8. Linhagem celular	19
2.1.9. Reagentes	19
2.2. MÉTODOS	23
2.2.1. Amplificação dos plasmídeos	23
2.2.1.1 Transformação de bactérias <i>E. coli</i>	23
2.2.1.2. Condições de crescimento	23
2.2.2. Preparação de plasmídeos	23
2.2.3. Remoção de proteínas e RNAs	24
2.2.4. Separação e purificação dos fragmentos de DNA	24
2.2.5. Reação de clivagem parcial de DNA	25
2.2.6. Reação de ligação de DNA	26

2.2.7. Mutação	26
2.2.7.1. Sítio dirigida	26
A) Produção de DNA de fita simples	26
B) Produção de DNA de fita dupla contendo a mutação	27
2.2.7.2. Mutação mediante reação de PCR	27
2.2.8. Sequenciamento de DNA	28
2.2.9. Expressão de taghPrl	29
2.2.9.1. Ativação com incremento de temperatura	29
2.2.9.2. Ativação com adição de IPTG	29
2.2.10. Caracterização da taghPrl	30
2.2.10.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida	30
2.2.10.2. Western blot	30
2.2.10.3. Cromatografia em coluna de exclusão molecular	31
2.2.10.4. Ensaio biológico	32
2.2.11. Extração, solubilização e renaturação de taghPrl em corpos de inclusão	32
2.2.11.1. Solubilização com N-laurilsarcosina e renaturação ao ar (Método de Luck)	32
2.2.11.2. Solubilização com uréia e renaturação por diálise (Método de Paris)	34
2.2.12. Extração de proteínas bacterianas por choque osmótico	35
3. RESULTADOS	36
3.1. Padronização das condições de ativação do promotor tac na expressão de uma proteína bacteriana (exoglucanase)	36
3.2. Análise da expressão de taghPrl citoplasmática sob as condições de ativação estabelecidas para a exoglucanase bacteriana	39

3.3. Determinação da eficiência de expressão do vetor de referência (ptac-taghPrl) em três diferentes cepas bacterianas	44
3.4. Construção de diferentes vetores de expressão citoplasmática para met-ala-thr-ser(his)6-ile-glu-gly-arg-hPrl (taghPrl)	46
3.4.1. Construção do vetor p λ P _L I	46
3.4.1.1. Criação de sítio Eco RI por mutação sítio dirigida	48
3.4.1.2. Inserção do cDNA da taghPrl no vetor contendo o promotor λ P _L	49
3.4.2. Construção do vetor p λ P _L II	52
3.4.3. Construção do vetor p λ P _L III	56
3.4.4. Construção do vetor p λ P _L IV	59
3.4.5. Construção do vetor ptacI	64
3.5. Estudo da eficiência de expressão de taghPrl nos 5 vetores obtidos	67
3.6. Obtenção de taghPrl monomérica a partir de corpos de inclusão	70
3.6.1. Metodologia de solubilização com detergente	70
3.6.2. Metodologia de solubilização com detergente, modificada	73
3.6.2.1. Análise qualitativa do produto obtido mediante solubilização com detergente	76
3.6.3. Método de Paris: solubilização com uréia e renaturação mediante diálise prolongada	78
3.6.4. Metodologia de solubilização com uréia, modificada	82
3.7. Determinação da bioatividade de taghPrl em cultura de células Nb2	90
4. DISCUSSÃO	91
5. CONCLUSÕES	97
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

1. Introdução

O desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante abriu uma nova era na produção de proteínas com potencial terapêutico e diagnóstico, como é o caso dos hormônios hipofisários. A expressão de proteínas recombinantes em microorganismos garante um ilimitado suprimento de proteínas que são de difícil obtenção por estarem presentes em baixas quantidades em tecidos humanos ou por necessitarem de onerosos e lentos processos de extração e purificação. As proteínas recombinantes podem ser obtidas em diferentes hospedeiros como bactérias, leveduras, células de insetos ou de mamíferos. A utilização de um hospedeiro como a *Escherichia coli* possui a vantagem de produzir proteína recombinante em altos níveis, em um organismo bem conhecido geneticamente e que não requer altos custos para seu crescimento.

Entre os hormônios que mais podem se beneficiar destas técnicas há a prolactina humana que pode ser produzida, em bactérias, em larga escala, visando sua utilização em campo diagnóstico como padrão em ensaios de dosagem deste hormônio, como reagente de marcação e para a produção de anticorpos, juntamente com inúmeras aplicações “in vitro” relacionadas com diferentes campos de pesquisa. Ressaltamos que a prolactina é um dos hormônios mais determinados na rotina dos ensaios clínicos [42]. Com relação às aplicações terapêuticas, recentes estudos indicaram uma possível utilização no tratamento de mulheres com baixa lactação associada a isquemia pituitária temporária [59, 62] e na reconstituição das características normais espermáticas em homens inférteis e hipoprolactinêmicos [58]. A administração de prolactina se apresenta também potencialmente útil no tratamento de infecções e da imunossupressão. Como foi recentemente

demonstrado em camundongos, este hormônio possui uma ação protetora contra as infecções induzidas por agentes patógenos [39], na recuperação das funções do baço após grave hemorragia [64] e também pode ser clinicamente útil para reverter o efeito mielossupressor induzido por AZT ou em outras terapias mieloablativas [60]. Além disso, recentes estudos 'in vitro' mostraram que a prolactina pode reverter os efeitos antiproliferativos do fator transformador de crescimento β , indicando o seu uso potencial como agente imunoterápico na infecção por HIV [49]. Especialmente em vista destas duas últimas aplicações, a prolactina recombinante se encontra atualmente na Fase II de testes clínicos nos EUA.

A prolactina é um hormônio hipofisário pertencente a uma família que inclui o de crescimento (GH) e lactogênio placentário (PL) [9]. Este hormônio está presente em todos os vertebrados e é sintetizado e secretado pelas células lactotróficas da pituitária anterior. Em mamíferos, sua ação mais conhecida é a lactogênica, no crescimento e desenvolvimento das glândulas mamárias, mas também tem ação em diferentes tecidos, incluindo o fígado, ovários, testículos e próstata [43]. O cDNA da prolactina humana (hPr1) possui 914 pares de bases (pb), incluindo a seqüência do peptídeo sinalizador de secreção, bem como as regiões 5' e 3' não traduzidas do RNA mensageiro [9]. A proteína madura possui 199 aminoácidos (aa), um peso molecular de 23 kDa e contém seis cisteínas que, ligadas por pontes dissulfeto, formam três alças: uma na região N-terminal (cisteínas 4-11), outra na região mediana (cisteínas 58-174) e uma terceira na região C-terminal (cisteínas 191-199) [43].

A primeira síntese de prolactina humana em bactéria levou à obtenção de corpos de inclusão citoplásmicos e ao isolamento e purificação de uma prolactina contendo o aminoácido metionina na extremidade N-

terminal [10, 47]. Esta produção proporcionou níveis relativamente altos de expressão de proteína recombinante, porém com as conhecidas dificuldades e baixos rendimentos próprios do processo de solubilização e renaturação. MORGANTI e col. [40] obtiveram a expressão de hPrl autêntica no espaço periplásmico, porém somente em quantidade da ordem de $3 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL.A}_{600}$, utilizando um vetor de expressão baseado no promotor λP_L . Os mesmos autores, utilizando outro vetor de expressão contendo o promotor *tac*, obtiveram uma significativa melhora na eficiência de expressão periplásmica, obtendo quantidades da ordem de $0,7 \mu\text{g/mL.A}_{600}$ para uma forma de hPrl contendo 12 aminoácidos a mais na extremidade N-terminal (tag-hPrl) [41] e de $0,07 \mu\text{g/mL.A}_{600}$ para a prolactina autêntica [42].

Dados da literatura relativos à eficiência de expressão de diferentes construções mostraram que a síntese em bactérias e estocagem na forma de corpos de inclusão leva a uma produção muito variável. A Tabela 1.1 reporta dados relativos à expressão citoplásmica em bactérias de prolactina de várias espécies, mediante diferentes vetores de expressão.

Tabela 1.1: Expressão citoplásmica em *E. coli* de prolactina de várias espécies, utilizando diferentes vetores.

Espécie (proteína de fusão)	Promotor	Terminador de transcrição	Gene que confere resistência ao antibiótico	Nível de Expressão ①	Referência
bovina	<i>lac</i>	–	<i>amp^r</i>	4-5%	[32])
salmão	λP_L	<i>RrnBT</i>	<i>amp^r</i>	10-15%	[53])
bovina	<i>lac</i>	–	<i>amp^r</i>	5% 20-25 mg/L	[33]
galinha	<i>lac</i>	+	<i>amp^r</i>	1,5%	[24]
humana	<i>trp</i>		carbenicilina	2-5%	[10]
Tilapia I e II	$\phi 10$	<i>Tϕ</i>	<i>amp^r</i>	70 e 45mg/L	[56]
humana	$\phi 10$	<i>T7</i>	<i>amp^r</i>	50%	[47]
humana (β -galactosidase)	<i>lac</i>		<i>amp^r</i>	48mg/L	[19]
humana (proteína A)	λP_R	+	<i>amp^r</i>	0,06-0,2% 3-6mg/L	[25]
rato	<i>tac</i>	<i>rrnb</i>	<i>amp^r</i>	15%	[61]
galinha	<i>tac</i>	<i>rrnBT</i>	<i>amp^r</i>	10%	[44]
peru (S-transferase)	<i>tac</i>		<i>amp^r</i>	40%	[26]

① Nível de expressão: atividade específica (%) ou concentração no meio de cultura (mg/mL).

+ tem o terminador de transcrição, mas não o identifica;

- não tem o terminador de transcrição;

não faz referência deste elemento.

Na Tabela 1.1, podemos observar alguns dos elementos constitutivos dos vetores de expressão e os relativos níveis de expressão obtidos na produção de prolactina. Os trabalhos de SONG e col. [53], YAMAMOTO e col. [61] e OHKUBO e col. [44] obtiveram uma atividade específica da mesma ordem utilizando vetores comerciais que diferiam apenas nos promotores (λP_L e *tac*). KARATZAS e col. [26], utilizando um vetor com o promotor *tac* e um diferente terminal de transcrição, obtiveram uma atividade específica 4 vezes maior que a dos autores citados anteriormente. Utilizando o mesmo promotor ($\phi 10$) e os terminadores de transcrição $T\phi$ e $T7$, PARIS e col. [47] e SWENNEN e col. [56] obtiveram níveis de expressão entre os mais altos apresentados na literatura.

É interessante também observar que em todas estas construções nunca foi considerada a utilização de um ativador de tradução, como por exemplo a seqüência *g10* do fago T4, que será utilizada em alguns dos nossos vetores.

Em conseqüência dos resultados apresentados por MORGANTI e col. [42], de acordo com os quais a expressão de taghPrl foi aproximadamente 8 vezes maior que a da hPrl autêntica, optou-se pelo estudo de uma forma de taghPrl que contém 14 aminoácidos ligados à extremidade N-terminal. A Figura 1.1 apresenta uma estrutura simplificada da taghPrl.

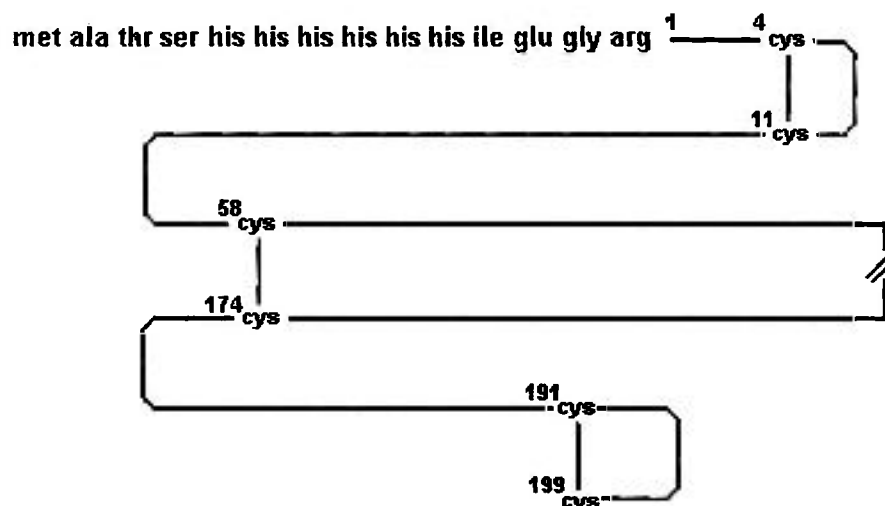


Figura 1.1: Estrutura simplificada da taghPrl evidenciando os aminoácidos da seqüência tag e as pontes dissulfeto.

Para avaliar a ação dos componentes principais de um plasmídeo de expressão, estudou-se portanto, neste trabalho, a expressão de taghPrl no citoplasma bacteriano. Desta forma, sendo a proteína de interesse estocada em corpos de inclusão, foi eliminada a influência da seqüência sinalizadora e dos mecanismos celulares relacionados com o processamento do precursor e com o transporte e a secreção da forma madura do hormônio [22]. Este modelo possibilita também a obtenção de níveis relativamente altos de proteína heteróloga, facilitando a análise do produto com as metodologias convencionais. Os elementos estudados foram o promotor, a seqüência ativadora de tradução, o terminador de transcrição e o gene que confere resistência ao antibiótico.

Os promotores utilizados foram o λP_L e *tac*, que são considerados fortes por induzirem eficientemente a expressão de genes

situados sob o seu controle [35]. É interessante observar que DEUSHLE e col. [12] estudaram a eficiência de 14 promotores diferentes e obtiveram uma expressão 2 vezes maior para o promotor λP_L em relação ao *tac*.

Estes dois promotores são bloqueados pela ação de uma proteína repressora. O promotor λP_L é reprimido pelo produto do gene $\lambda cIAt2$, que expressa uma proteína termosensível, contido no plasmídeo pRK248cIts que pode estar presente, como será o nosso caso, na cepa utilizada para a expressão. Com a elevação da temperatura para 42°C, a proteína repressora muda a conformação não se ligando mais ao operador e liberando, portanto, o promotor para a transcrição. O plasmídeo pRK248cIts tem baixo número de cópias e aparentemente impossibilita uma perfeita repressão do promotor [8]. Quanto ao promotor *tac*, que é um híbrido, derivado dos promotores *trp* e *lac* [5], é bloqueado pelo produto do gene *lacI^q*. Açúcares, como lactose, presentes no meio de cultura, são convertidos em alolactose que se liga ao repressor, causando uma mudança conformacional. Desta forma é reduzida a afinidade do repressor pelo operador, liberando o promotor para a transcrição. O composto isopropil β -thiogalactosídeo (IPTG) age da mesma forma que a alolactose, na inativação do repressor produzido pelo gene *lacI^q*. O gene *lacI^q* pode estar contido no cromossomo da bactéria e/ou no vetor de expressão. Quando está presente só no cromossomo bacteriano, a repressão é ineficiente porque sua produção é baixíssima: 0,001% sobre o total de proteína bacteriana [63, 55].

Outros autores estudaram também a influência de uma seqüência ativadora da tradução, descrita por OLINS e col. [45] relativamente à expressão de genes de mamíferos, plantas e bactérias. Esta seqüência de DNA faz parte do gene *g10* do bacteriófago T7 e é composta por 9 bases próximas à região do sítio de ligação do ribossomo (SLR). O modelo proposto por Olins

foi o do emparelhamento desta região do mRNA com a região do RNA ribossômico 16S (rRNA), ao redor dos nucleotídeos 458 e 466 (Figura 1.2). A interpretação do autor quanto ao incremento na expressão das proteínas analisadas, foi que esta região, rica em bases adenina e uracila, diminuiria a formação de uma estrutura secundária do mRNA e, portanto, permitiria um acesso fácil do ribossomo ao SLR e ao códon inicial AUG. Ele denominou esta região de “Epsilon” (“Enhancer of Protein Synthesis Initiation”) e sua influência no incremento da expressão protéica foi observada em vetores contendo os promotores *recA*, *lac*, *trpP* e λP_L .

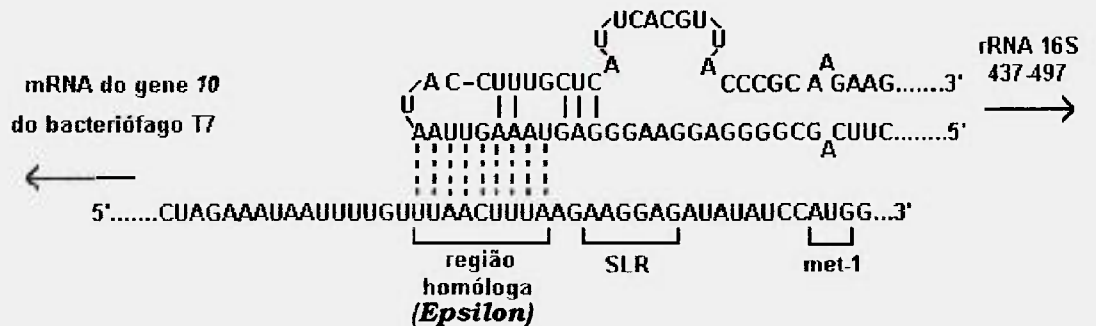


Figura 1.2: Modelo proposto para o emparelhamento de bases entre o mRNA da seqüência *g10* e a região do RNA ribossômico 16S. As linhas pontilhadas indicam uma potencial interação entre as 9 bases do mRNA do *g10* e a região do rRNA 16S.

(SLR: sítio de ligação do ribossomo; met-1: metionina inicial)

LEHMEIER e AMANN [31] estudaram a influência desta mesma seqüência na expressão de genes eucarióticos em plasmídeos da “série *ptrc*” que contém o promotor *trp/lac*. Os plasmídeos que receberam a seqüência *g10* passaram a ser denominados “série *ptac*”. O estudo comparou a expressão em *E. coli* de quatro proteínas, duas com baixa e duas com alta

expressão. Um aumento significativo no nível de expressão (3 e 20 vezes) só foi observado nas proteínas que apresentavam uma baixa produção.

Outro elemento considerado crítico, relacionado com a própria estabilidade do mRNA, é o terminador de transcrição [35]. O terminador de transcrição utilizado e cuja influência foi estudada neste trabalho foi o do gene 32 do bacteriófago T4 [3], também usado por MORGANTI e col. [41,42] para a expressão de taghPrl e hPrl no periplasma bacteriano. Esta seqüência possibilita a formação de uma alça na região 3' do mRNA (grampo de terminação), localizada imediatamente antes do último nucleotídeo a ser transcrito, ocasionando uma longa pausa no alongamento da cadeia. Essa pausa, associada a uma região de ligação das bases adenina-uracila, onde há uma ligação de hibridização relativamente fraca, desestabiliza o híbrido RNA/DNA (Figura 1.3). Este tipo de interação é denominada *Rho*-independente, pois não necessita que a proteína *rho* se ligue ao mRNA para o desligamento e é comum em 90 % dos mRNAs de *E. coli* [63].

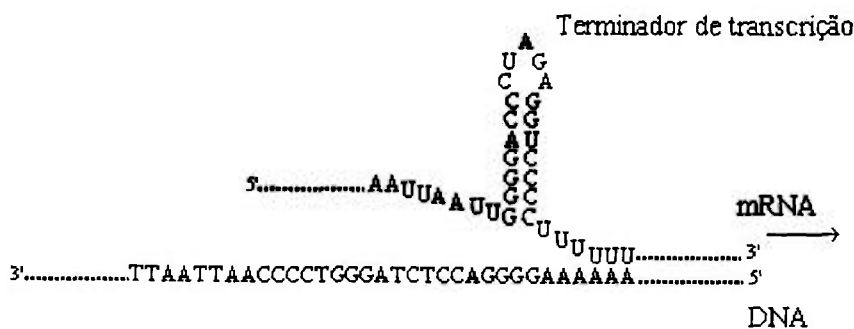


Figura 1.3: Seqüência de nucleotídeos do terminador de transcrição do gene 32 e formação da alça desestabilizadora do emparelhamento mRNA/DNA, segundo BELIN [3].

Além destes três elementos (promotor, ativador de tradução e terminador de transcrição) foi estudada a influência dos genes que codificam a aminoglicosídeo fosfotransferase, responsável pela resistência à canamicina (kan^R) e a β -lactamase, responsável pela resistência à ampicilina (amp^R).

Outro elemento fundamental de um vetor de expressão é a origem de replicação (*ori*) que determina o número de cópias de plasmídeo a serem replicadas e que, em última análise, influencia a quantidade de proteína expressa pela bactéria. Dentre as *ori* mais utilizadas encontra-se a *pMB1*, própria dos vetores da série pUC, que possibilita a obtenção de um grande número de cópias [36]. A *ori pMB1* possui uma deleção da seqüência de DNA que é responsável pela síntese da proteína Rop. Esta proteína Rop está associada ao controle negativo, que impede o início da replicação do plasmídeo [36]. Salienta-se que as *ori* utilizadas neste trabalho, embora sejam do pUC 18/19, foram retiradas de diferentes plasmídeos.

Para a obtenção de um produto a partir dos corpos de inclusão foi importante estudar os processos de solubilização e renaturação, sem os quais não seria possível obter a taghPrl biologicamente ativa. Um esquema das principais etapas utilizadas por vários autores para a obtenção de proteínas renaturadas a partir de corpos de inclusão, pode ser observado na Tabela 1.2 [7, 14, 34, 37, 47].

Tabela 1.2: Métodos comumente empregados na obtenção de proteínas renaturadas a partir de corpos de inclusão citoplásmicos.

Etapa	Método
Ruptura da parede bacteriana	“French press” Homogeneizador Ultra-som Lisozima e Ultra-som
Lavagem dos corpos de inclusão obtidos por centrifugação	Solução de EDTA (1 mM) Água destilada Água destilada e deoxicolato (1%) Uréia (2-4 M)
Redução	Dithiothreitol (10 mM) β -mercaptoetanol (1%) Glutationa reduzida
Solubilização	Hidrocolato de guanidina (5-8 M) Uréia (6-8 M) Solução de tris em pH alcalino ou ácido Solventes orgânicos (Acetonitrila) Detergentes (0,2% de N-laurilsarcosina)
Renaturação e Oxidação	Oxidação ao ar Oxidação com Glutationa oxidada Diálise prolongada contra solução tamponante Diluição e Oxidação ao ar Oxidação com Thioredoxina

Embora a conformação precisa das proteínas nos corpos de inclusão não seja bem conhecida, sabe-se que estes são compostos por formas monoméricas e multiméricas derivadas de interações não-covalentes intra e intermoleculares entre as proteínas de interesse. Esta interação pode ocorrer, também, entre as proteínas de interesse e as da própria bactéria. FUTAMI e col. [17] propuseram que, além da interação hidrofóbica, haveria uma interação eletrostática entre as proteínas recombinantes expressas no citoplasma e o RNA bacteriano. Os corpos de inclusão deveriam conter assim também ácidos nucleicos.

Quando o polipeptídeo possui cisteínas em sua composição, ocorre a formação desordenada de pontes dissulfeto. Para a obtenção de proteínas monoméricas com sua conformação nativa e biologicamente ativas, é necessária a ruptura destas ligações intermoleculares para que se formem as ligações corretas, compatíveis com a estrutura terciária natural [37, 57].

A utilização de detergentes na solubilização é um dos métodos mais econômicos empregados para esta finalidade. Detergentes são moléculas anfipáticas que contêm grupos polares e hidrofóbicos e que, por esta característica, são muito utilizados na solubilização de proteínas de membrana [4] e das proteínas de corpos de inclusão. A desvantagem do uso de detergentes é que estes também solubilizam algumas proteases de membrana, que são ativadas em sua presença. Esta atividade proteásica leva a baixos rendimentos da proteína recombinante de interesse, durante as fases de solubilização e renaturação [57].

Outros agentes solubilizantes utilizados são o cloridrato de guanidina e a uréia. O cloridrato de guanidina é um reagente caro e por isso inviável para uma produção em larga escala. A uréia apresenta um custo

menor, porém pode conter isocianeto que pode reagir com grupos amino, sulfidril, carboxil e fosfato das proteínas [54]. A concentração de isocianeto pode aumentar principalmente em altas temperaturas, em pH alcalino [50] e por períodos longos de incubação, da ordem de 10 dias [18], aumentando assim o seu efeito negativo.

A escolha da estratégia utilizada para a renaturação é influenciada, ou até determinada, pelo método de solubilização utilizado. A renaturação pode ser feita por meio de diálise, em que a proteína é exposta ao denaturante em concentrações decrescentes, por um determinado período de tempo. Para certas proteínas, esta forma de retirada do denaturante possibilita a obtenção da conformação correta da molécula (*foldi*ng), mas para outras pode causar precipitação das moléculas que se encontram em estados de *foldi*ng intermediários e que são susceptíveis à agregação. Neste último caso, a renaturação deve ser processada rapidamente por meio de diluição utilizando uma solução de renaturação (Tabela 1.2), sendo o procedimento específico para cada caso [50].

A formação das pontes dissulfeto do polipeptídeo pode realizar-se pela ação do oxigênio do ar, que reage em pH alcalino com as cisteínas reduzidas. O oxigênio, como um receptor de elétrons, oxida as cisteínas possibilitando o *foldi*ng correto, de forma espontânea [15].

Pelo que se refere à redução, solubilização e renaturação, o nosso trabalho baseou-se especialmente nas metodologias descritas por LUCK e col. [33] para prolactina bovina e por PARIS e col. [47] para a prolactina humana.

1.1 Objetivos do Trabalho

O presente trabalho se propõe, portanto, a:

- 1 Analisar a influência, no nível de expressão de taghPrl citoplásmica, dos componentes intrínsecos dos vetores como:
 - ▶ promotor (*tac* e λP_L),
 - ▶ terminador de transcrição (*g32*),
 - ▶ seqüência ativadora de tradução (*g10*).
 - ▶ gene que confere a resistência ao antibiótico (*amp^r* e *kan^r*),

- 2 Estudar uma metodologia para a solubilização e renaturação de taghPrl, a partir de corpos de inclusão, que de forma eficiente leve à uma rápida obtenção de grandes quantidades de hormônio biologicamente ativo, qualitativamente comparável ao produto natural.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

2.1.1 Equipamentos e acessórios principais

- agitador rotatório de tubos (“rotator”), fornecido pelo laboratório NETRIA, North East Thames Region ImmunoAssay unit, Londres, Inglaterra;
- autoclave de mesa, série 2100, KAVOKLAVE, São Paulo, SP, Brasil;
- banho-maria, modelo 100, FANEM LTDA, São Paulo, SP, Brasil;
- centrífuga refrigerada automática, modelo *Super Speed RC-2B*, SORVALL, Newtown, Connecticut, EUA;
- centrífuga para secagem de DNA, DNA speed vacDNA 110 Savant, EUA;
- coluna de exclusão molecular XK16 (16 cm x 70 mm), PHARMACIA, Uppsala, Suécia;
- contador gama tipo “poço”, modelo *Cobra auto-gamma*, com troca automática de amostra, cuja eficiência aproximada para ^{125}I é de 80%, PACKARD INSTRUMENT COMPANY, Illinois, EUA;
- densitômetro, modelo *CS-9301PC Dual Wavelength*, SHIMADZU, Kioto, Japão;
- eletroporador, modelo II, INVITROGEN, San Diego, CA, EUA;
- espectrofotômetro, modelo PMQ II, CARL ZEISS, Oberkochen, Alemanha;
- estufa para cultura bacteriológica, modelo 002 CB, FANEM LTDA, São Paulo, SP, Brasil;
- estufa de cultura de células, modelo 3159, FORMA SCIENTIFIC, Marietta, Ohio, EUA;

- filmes de raios-X para auto-radiografias, *Kodak X-OMAT*, (KODAK, St. Louis, MO, EUA);
- fluxo laminar horizontal, classe I, VECO, Campinas, SP, Brasil;
- fluxo laminar classe II A/B3, modelo 1140, Forma Scientific, Marietta, Ohio, EUA;
- material plástico estéril para cultura celular, CORNING COSTAR CORP., Cambridge, M.^a, EUA e NALGENE COMPANY, Rochester, N.Y., EUA;
- membranas de filtração de 0,22 μm , MILLIPORE, Bedford, MA, EUA.
- membrana de troca iônica, DEAE-celulose, NA-45, Schleicher & Schuell, N. Y., EUA;
- microscópio invertido, modelo ID 03, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha;
- sistema de estocagem de criotubos em nitrogênio líquido, Locator Jr., Thermolyne, Dubuque, I.A, EUA;
- termociclador para a técnica de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia), Thermal Reactor-Hybaid, Londres, Inglaterra;
- ultra som, Virsonic cell disrupter, model 150, Gardiner, N. Y., EUA.

2.1.2 Nucleotídeo marcado

- o nucleotídeo $\alpha^{35}\text{S}$ dATP utilizado na reação de seqüenciamento foi adquirido da AMERSHAM INTERNATIONAL, Aylesbury, Buckinghamshire, Inglaterra.

2.1.3 Oligonucleotídeos

- os oligonucleotídeos utilizados nas técnicas de mutação sítio dirigida, seqüenciamento e PCR foram sintetizados pela GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA.

2.1.4 Marcadores de peso molecular

- os marcadores de peso molecular de DNA foram adquiridos da GIBCO-BRL Gaithersburg, MD, EUA:

(*L*) bacteriófago λ clivado com as enzimas EcoR I e Hind III apresentando as bandas de:

21,0 – 5,0 – 4,9 – 4,3 – 3,5 – 2,0 – 1,9 – 1,6 – 1,4 – 0,9 – 0,8 – 0,6 – 0,1 kb

(quilobases);

(*P*) plasmídeo pUC19 clivado com a enzima Hae III apresentando as bandas de:

0,59 – 0,56 – 0,43 – 0,30 – 0,27 – 0,26 – 0,17 – 0,10 kb;

- marcadores de peso molecular de proteínas: soroalbumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (43 kDa), prolactina humana ou ovina (23 kDa), hormônio de crescimento humano recombinante (22 kDa) e mioglobina (17 kDa).

2.1.5 Cepas de *E.coli* utilizadas

HB2151 : K12-*ara* Δ *lac-pro thi* (F' *proAB lacI^f* Δ M15) [33];

RB791 : W3110 *lacI^f* L₈ [16];

RRI : *supE44 hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1*
[36];

RZ1023 : [*HFrKL 16 Po*]45, *Zbd-279::Tn 10, lys A, thi-1, rel A1, spo T1, sup E44, dut⁻ 1, ung⁻ 1* [34].

2.1.6 Vetores de expressão

Os vetores de expressão utilizados foram: *pλ_{P_L} hGH-amp^r* [2] e *ptactaghPrl* [41], ambos existentes no laboratório de Bioengenharia, IPEN/CNEN – São Paulo. O vetor *ptactagExo* foi cedido pelo Dr. R. W. Graham, do Departamento de Microbiologia, Universidade de British Columbia, Vancouver, B.C., Canadá.

2.1.7 Elementos constituintes dos vetores:

λ_{P_L} - seqüência de DNA correspondente ao promotor *λ_{P_L}*;

tac - seqüência de DNA correspondente ao promotor *tac*;

SLR - seqüência de DNA correspondente ao sítio de ligação ao ribossomo;

g10 - seqüência ativadora de tradução, do gene *10* do fago T₇ (TTAACTTTA);

tag - seqüência de DNA que codifica os aminoácidos metionina, alanina, treonina, serina, seis histidinas e para o sítio de clivagem do fator Xa;

amp^r - gene que confere resistência à ampicilina (β-lactamase);

kan^r - gene que confere resistência à canamicina (aminoglicosida fosfotransferase);

- g32* - seqüência de DNA que determina o término da síntese do mRNA (terminador de transcrição) do gene 32 do bacteriófago T₄;
- ori* - seqüência de DNA, que determina a origem de replicação dos plasmídeos pUC 18 e pUC 19;
- F₁* - seqüência de DNA que inicia a transcrição de DNA fita simples;
- lacI^q* - gene que codifica a proteína repressora do operon *lac*;
- Exo* - seqüência de DNA que codifica uma exoglucanase;
- hPrl* - seqüência de DNA que codifica o hormônio prolactina, sem a seqüência sinalizadora.

2.1.8 Linhagem celular

As células utilizadas no ensaio biológico foram as células de linfoma de rato, Nb2, cedidas pelo Dr. P. Gout (British Columbia Cancer Agency, Vancouver, Canadá).

2.1.9 Reagentes

- acetato de amônio p.a., MERCK, São Paulo;
- acetona p.a., MERCK, São Paulo;
- ácido acético p.a., MERCK, São Paulo;
- ácido bórico p.a., QM, São Paulo;
- ácido clorídrico p.a., CAAL, São Paulo;
- ácido etilenodiaminotetraacético (sal dissódico) (EDTA), CARLO ERBA, São Paulo;

- acrilamida p.a., SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- agarose, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA;
- ágar-ágar purificado para bacteriologia, MERCK, São Paulo;
- ampicilina, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- anticorpo policlonal, anti-human Prolactin-rabbit, NIDDK, EUA;
- azida sódica, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- azul de bromofenol, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- azul dextran 2000, PHARMACIA, Uppsala, Suécia;
- bacto-triptona, DIFCO, Interlab, São Paulo;
- β -mercaptoetanol, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- bicarbonato de amônio p.a., LABSYNTH, São Paulo, São Paulo;
- bisacrilamida p. a., SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- canamicina, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- cloreto de cálcio dihidratado p.a., MERCK, São Paulo;
- cloreto de sódio p.a., MERCK, São Paulo;
- clorofórmio p.a., MERCK, São Paulo;
- deoxidocolato de sódio, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- ditioneitol (DTT), SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- dodecil sulfato sodium, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- enzimas de restrição e de modificação da GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA), da PHARMACIA (Uppsala, Suécia) ou da NEW ENGLAND BIOLABS (Beverly, MA, EUA);
- etanol p.a., REAGEN, São Paulo;
- extrato de levedura para microbiologia, DIFCO, Interlab, São Paulo;
- fenol p.a., SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF), SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- fosfato de sódio bibásico p.a., MERCK, São Paulo;

- fosfato de sódio monobásico p.a., MERCK, São Paulo;
- glicose p.a., CAAL, São Paulo;
- glicerol, MERCK, São Paulo;
- hidróxido de sódio p.a., MERCK, São Paulo;
- hormônio de crescimento humano recombinante, preparação interna de referência do Departamento de Bioengenharia, IPEN/CNEN, SP;
- isopropil-thiogalactosídeo (IPTG), SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- leite desnatado, MOLICO, São Paulo;
- meio de Fisher, Gibco-BR, Gaithersburg, MD, EUA
- metanol p.a., MERCK, São Paulo;
- mioglobina, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- Na¹²⁵I comercial, livre de carreadores e oxidantes, fornecido pela NORDION EUROPE S.A. (Fleurus, Bélgica), com atividade específica de 11100-22200 MBq/mL (300-600 mCi/mL);
- N-laurilsarcosina, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- n-propanol p.a., REAGEN, São Paulo;
- ovoalbumina, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- polietileno glicol 8000, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- prolactina humana padrão (WHO 84/500; 53 mI.U./2,5 µg), Inglaterra;
- prolactina ovina, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- proteína A, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- resina cromatográfica Sephacril-S100, PHARMACIA, Uppsala, Suécia;
- sistema de seqüenciamento *SequenaseTM Version 2.0 DNA Sequencing Kit*, AMERSHAM LIFE SCIENCE INC, Arlington Heights, IL, EUA;
- soroalbumina bovina (BSA), *RIA grade* (fração V), SIGMA, St. Louis, MO, EUA;

- soro de cavalo castrado, cedido pelo Dr. P. Gout (British Columbia Cancer Agency, Vancouver, Canadá).
- soro fetal bovino (SFB), Gibco-BR, Gaithersburg, MD, EUA;
- tris (hidroximetil) aminometano p.a., MERCK, São Paulo;
- Tween-20, SIGMA, St. Louis, MO, EUA;
- uréia, SIGMA, St. Louis, MO, EUA.

2.2 Métodos

2.2.1 Amplificação dos plasmídeos

2.2.1.1 Transformação de bactérias *E. coli*

As cepas de *E.coli* foram transformadas com os plasmídeos de interesse pelo método de cloreto de cálcio [36] ou por eletroporação utilizando 1,5 kV; 25mA e 25 W [13].

2.2.1.2 Condições de crescimento

Cepas bacterianas transformadas com o plasmídeo de interesse foram cultivadas em LB (Extrato de levedura 0,5%, Triptona 15% e NaCl 0,17 M) com ampicilina (100 µg/mL) ou canamicina (50 µg/mL), à temperatura de 37°C, exceto as cepas RRI contendo vetores baseados no promotor λP_L , que foram cultivadas a 30°C. Todas as cepas foram cultivadas com agitação de 200 rotações por minuto (rpm) por 16 h.

2.2.2 Preparação de plasmídeos

A preparação dos plasmídeos, em pequena e em larga escala, foi realizada utilizando os métodos:

1) lise alcalina [36] e no método em larga escala, a lise alcalina foi seguida por uma etapa de precipitação de proteínas com acetato de amônio 2,5 M e a purificação do DNA foi feita com polietileno glicol 20%.

2) Kit QIAGEN (Quiagen, Hilden, Alemanha), que utiliza mini colunas de afinidade após lise alcalina.

2.2.3 Remoção de proteínas e RNA

Nas soluções de DNA, em que era necessário a retirada de proteínas e RNA, foi empregada a seguinte metodologia: adicionou-se um volume, igual ao volume da amostra, de uma mistura composta por 50% de fenol e 50% de clorofórmio. Após agitação e centrifugação a 12000g por 2 min a 4°C, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionado um volume igual ao anterior de clorofórmio. Esta mistura foi homogeneizada e centrifugada nas mesmas condições anteriores. Ao sobrenadante foi adicionado acetato de sódio (concentração final de 0,3 M) e dois volumes iguais ao da amostra de etanol. Após uma incubação de 15 min a 0°C a amostra foi centrifugada a 12000g por 10 min a 4 °C. O DNA precipitado foi lavado com o mesmo volume de etanol 70%, centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente e secado em centrífuga *savant*.

2.2.4 Separação e purificação dos fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo e visualizados com luz ultravioleta. A purificação dos fragmentos de interesse foi realizada por meio de três métodos :

1) A transferência do fragmento de interesse do gel de agarose para uma membrana de troca iônica (DEAE celulose) foi feita aplicando-se uma corrente elétrica. Após a transferência, a membrana foi lavada com uma solução de baixa concentração salina (NaCl 0,15 M; EDTA 0,1 mM e Tris-HCl 20 mM pH 8,0), sendo a eluição do DNA, realizada com uma solução de alta concentração salina (NaCl 1,0 M; EDTA 0,1 mM e Tris-HCl 20 mM pH 8,0). Esta solução de DNA foi tratada de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.3.

2) A região do gel de agarose que continha o fragmento de interesse foi removida e homogeneizada com um volume de fenol correspondente ao peso do gel cortado. Esse homogeneizado foi congelado a -70°C por 10 min, centrifugado a 16000g por 5 min a 4°C após o descongelamento e guardado o sobrenadante. Ao precipitado foi adicionado um volume correspondente a 30 % do volume de fenol utilizado inicialmente, de fenol e o mesmo volume de TE (Tris HCl 10m M e EDTA 1mM, ambos em pH 8,0). A suspensão foi congelada novamente e centrifugada nas mesmas condições. O novo sobrenadante foi adicionado ao anterior sendo tratado de acordo com o mesmo procedimento descrito no item 2.2.3 (Dra. Rebouças, ICB/USP).

3) Extração e purificação com o uso do “Kit QIA quick” (Quiagen, Hilden, Alemanha).

2.2.5 Reação de clivagem parcial de DNA

Nas reações de clivagens parciais com as enzimas EcoR I e Xba I foi utilizada 1 unidade de enzima (u) para cada 800 ng de DNA, incubando a 37°C , com monitoramento em gel de agarose de 5 em 5 min por 30 min.

2.2.6 Reação de ligação de DNA

Nas reações de recircularização ou ligação de inserto com vetor foi utilizada 1 u de *T₄ DNA Ligase* para 100 ng de DNA, incubando de 1 a 3 h a 20°C ou 16 h a 16°C. As proporções do vetor em relação ao inserto foram de 1:1, 1:2 ou 1:3. Para a ligação tríplice a quantidade de cada fragmento foi proporcional ao seu peso molecular.

2.2.7 Mutação

2.2.7.1 Sítio dirigida

A- Produção de DNA fita simples

A cepa bacteriana RZ1023 foi semeada em placa de Petri com meio mínimo ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 M, KH_2PO_4 0,02 M, NaCl 0,009 M, NH_4Cl 0,02 M e glicose 0,4%), incubando por 28 h a 37°C. A partir destas colônias foram preparadas células competentes que foram transformadas com o plasmídeo bluescript KS⁻ contendo o inserto a ser mutado. Uma colônia contendo o plasmídeo foi cultivada em 2 mL de meio YT (triptona 16%, extrato de levedura 10% e NaCl 0,086M), com agitação, a 37°C por 16 h. Desta cultura foram utilizados 15 µL diluídos em 1,5 mL de YT, cultivando nas mesmas condições até o meio ficar turvo. Foram adicionadas 10^8 a 10^{10} pfu/mL (pfu: unidades formadoras de placa) do fago R408, incubando a 37°C, sob agitação, por 5 a 6 h. Após esse período a cultura foi centrifugada e ao sobrenadante, que contém o DNA de fita simples (ssDNA), foram adicionados 200 µL de uma solução de PEG 20 % e NaCl 2,5 M,

incubando por 15 min em temperatura ambiente. O ssDNA foi isolado por centrifugação a 16000 g por 15 min e o precipitado sendo dissolvido em 100 μ L de TE [29]. Nesta solução foi empregada a metodologia descrita no item 2.2.3.

B- Produção de DNA de fita dupla contendo a mutação

Em tubo *ependorf* foram colocados: 1 μ g de ssDNA, 5 pmol de oligonucleotídeo fosforilado, 1 μ L de tampão "M" e água até 10 μ L. A composição do tampão M é a seguinte: NaCl 500 mM, Tris HCl 100 mM pH 8, MgCl₂ 100 mM, DTT 10 mM. O tampão pode ser estocado a -20°C.

Após uma incubação a 55°C por 5 min foram adicionados os nucleotídeos, todos em concentração de 0,5 mM, desoxiadenosina, desoxiguanidina, desoxicitosina, desoxitimidina e adenosina tri-fosfato, 1 μ L de tampão para a enzima Ligase T₄, 1 u de DNA-polimerase fragment *Klenow*, 1 u de Ligase T₄, água deionizada até 20 μ L. Esta reação foi incubada por 2 h em temperatura ambiente e utilizada na transformação de bactérias.

2.2.7.2 Mutação mediante reação de PCR

Para 100 a 300 ng de DNA a ser mutado, utilizaram-se 100 ng de cada oligonucleotídeo (*sense* e *anti-sense*), 1/10 do volume de reação de tampão BIP V2, 2,5 u da enzima TAQ polimerase e água deionizada até 50 μ L. Após rápida agitação, centrifugou-se a reação e submeteu-se a 15 ciclos de polimerização nas seguintes condições: 1 min de denaturação a 94°C, 1 min de

hibridização a X °C e 1 min de polimerização a 72 °C. A temperatura X °C corresponde à temperatura de hibridização (T_m) menos 5°C.

A T_m é calculada para cada oligonucleotídeo pela seguinte fórmula:

$$T_m = [(n^\circ \text{ guaninas} + n^\circ \text{ citosinas}) \times 4] + [(n^\circ \text{ adeninas} + n^\circ \text{ timinas}) \times 2]$$

Neste cálculo são consideradas somente as bases que hibridizam.

A composição do tampão BIP V2 é a seguinte: Tris HCl 0,38 M pH 8,8; β -mercaptoetanol 0,0004%; tritonX-100 0,008%; EDTA 0,4 mM; MgCl₂ 11 mM; desoxiadenosina 1,1 mM; desoxiguanidina 1,1 mM; desoxicitidtosina 1,1 mM; desoxitimidina 1,1 mM; sulfato de amônio 0,093 M; gelatina 1,1% e água deionizada até completar um volume de 8,93 mL.

2.2.8 Seqüenciamento de DNA

O DNA a ser seqüenciado (4 μ g em 18 μ L) foi primeiramente desnaturado com 2 μ L de uma solução contendo NaOH 2M - EDTA 2mM, sendo precipitado com 75 μ L de etanol na presença de 2 μ L de acetato de amônio 2M. A seguir adotou-se o protocolo *UBS Sequenase* versão 2.0, que realiza a marcação com [α -³⁵S]dATP e terminação de cadeia com dideoxynucleotídeos [51]. As amostras obtidas foram analisadas em gel de poliacrilamida 8% na presença de uréia 48%. Os géis secados por 2 horas a 80°C e auto-radiografados em filmes de raios-X.

2.2.9 Expressão de taghPrl

2.2.9.1 Ativação com incremento de temperatura

Foi feito um inóculo da cepa RRI, transformada com plasmídeo baseado no promotor λP_L , cultivando por 16 h a 30°C. Este inóculo foi diluído em meio LB até uma densidade ótica (A_{600}) de 0,2 u.o. e novamente cultivado até A_{600} de 0,5 a 1,0 u.o.. Atingida esta absorvância a temperatura foi elevada a 42°C, para a ativação do promotor λP_L , por até 9 h, com coletas de amostras em 6, 7, 8 e 9 h de ativação. Como controle negativo foi utilizado o mesmo clone mantido a 30°C.

2.2.9.2 Ativação com adição de IPTG

A cepa HB2151, transformada com plasmídeo baseado no promotor *tac*, foi inoculada em meio LB e cultivada por 16 h a 37°C. A partir deste inóculo foram realizados dois procedimentos de ativação com IPTG:

a) ativação com adição de IPTG em fase log: o inóculo foi diluído em LB até uma absorvância de 0,2 u.o. e cultivado até atingir uma A_{600} de 0,4 - 0,5 u.o. A cultura com esta densidade ótica foi ativada com IPTG nas concentrações de 0,1 mM e 2 mM por 5 a 9 h [21].

b) ativação com adição inicial de IPTG: o inóculo foi diluído em LB até uma absorvância de 0,02 - 0,04 u.o., ativado simultaneamente com IPTG, nas concentrações de 0,1 mM e 2 mM e cultivado por 16 h [34].

Como controle negativo foi utilizado o mesmo clone, sem ativação.

2.2.10 Caracterização da taghPri

2.2.10.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Esta eletroforese foi realizada como descrito por Laemmli (1970), com gel de separação a 12% de poliacrilamida e o de empilhamento a 3%. Às amostras de suspensão bacteriana ou amostras renaturadas (correspondentes a uma A_{600} de 0,06 u.o. ou equivalentes a $4,8 \times 10^7$ céls/mL), foi adicionado o tampão de amostra para uma concentração final de Tris-HCl 50 mM pH 6,8, DTT 25 mM, glicerol 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,08 mg/mL e β -mercaptoetanol 1%. As amostras foram fervidas por 10 min e centrifugadas. Para as amostras não reduzidas utilizou-se o mesmo tampão sem β -mercaptoetanol e sem fervê-las. Cada amostra foi aplicada no gel e a corrida foi realizada em 30 mA até a saída do corante azul de bromofenol do gel.

A coloração das proteínas, separadas por esta metodologia, foi realizada tratando o gel de poliacrilamida com uma solução de Azul de Coomassie 0,25%, metanol 45 %, ácido acético 10 % e água 45 %; em seguida descorou-se com uma solução de metanol 40 %, ácido acético 10 % e água 50 %.

2.2.10.2 Western blot

Após separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida, as mesmas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose pelo método semi-seco como descrito por BURNETTE (1981). Após lavar a membrana com solução de NaCl 0,15 M e Na_3PO_4 0,01 M pH 7,4 (PBS) e leite

desnatado 5% (M), esta foi incubada com anticorpo policlonal contra a proteína de interesse, em PBS+M durante 16 h. Em seguida a membrana foi lavada 5 vezes com PBS+M e incubada com proteína A marcada com ^{125}I (4×10^5 cpm/mL) em PBS+M por 1 h. Após a incubação esta foi lavada 4 vezes com PBS+M e 2 vezes com PBS. Com a membrana seca foi feita a auto-radiografia.

2.2.10.3 Cromatografia em coluna de exclusão molecular

Para a cromatografia de exclusão molecular utilizou-se uma coluna de Sephacryl S-100, equilibrada e eluída com tampão bicarbonato de amônio 50 mM e com fluxo de 60 mL/h.

Esta coluna foi calibrada definindo os seguintes parâmetros: volume de exclusão molecular identificado pelo volume de eluição do azul dextran (V_0) e o volume total da coluna identificado pelo volume de eluição da acetona (V_t). Foi utilizada a notação V_e para o volume de eluição de proteínas utilizadas como padrão ou desconhecidas.

Para o cálculo do K_d de cada amostra aplicada na coluna foi utilizada a fórmula:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

2.2.10.4 Ensaio biológico

A determinação da atividade biológica da taghPrl foi feita por meio da estimulação do crescimento de células de linfoma de rato (Nb2) [20]. Em uma cultura destas células, foram adicionadas amostras em duplicata de diferentes diluições de taghPrl, incubando em estufa de CO₂ a 37⁰C por 48 h. Em seguida as células foram contadas e o resultado comparado com uma curva feita estimulando as mesmas células com prolactina pituitária humana padrão, em concentrações de 0,01 a 0,25 ng /mL [41].

2.2.11 Extração, solubilização e renaturação de taghPrl em corpos de inclusão

2.2.11.1 Solubilização com N-laurilsarcosina e renaturação ao ar (Método de Luck)

Uma cultura de bactérias de 100 mL ($A_{600} \sim 4$ u.o.) foi centrifugada a 4.000g por 5 min a 4⁰C e em seguida foi processada seguindo a metodologia:

1) Lise bacteriana por ultrassom

O precipitado foi ressuspensão em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4, ditioneitol (DTT) 10 mM e fluoreto de metilfenilsulfonila (PMSF) 1 mM. A esta suspensão foi aplicado ultrassom com uma frequência de 60 khz por 30 s, por 5 vezes a intervalos de 30s, em gelo.

O lisado foi centrifugado a 20.000g por 30 min a 4⁰C.

2) Isolamento dos corpos de inclusão

O precipitado contendo os corpos de inclusão foi ressuspensão em 8 mL de tampão fosfato de sódio 1 mM pH 7,4, DTT 1 mM e PMSF 0,1 mM, a 4^oC.

2.1) Lavagem com solução com deoxicolato

Em alguns experimentos foi adicionado aos corpos de inclusão em suspensão deoxicolato de sódio 1% incubando por 1 h a 37^oC.

A suspensão foi centrifugada a 4.000g por 5 min, a 4^oC descartando o sobrenadante.

2.2) Lavagem com água

Em todos os experimentos, os corpos de inclusão foram ressuspensos em 8 mL de água a 4^oC, centrifugando a 4.000g por 5 min a 4^oC e descartando o sobrenadante.

3) Solubilização com N-laurilsarcosina

Os corpos de inclusão foram solubilizados em 3 mL de fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 contendo N-laurilsarcosina 0,2%, por 16 h a 4^oC.

4) Renaturação

A renaturação foi feita em pH alcalino com adição de 6 mL de borato de sódio 0,1 M pH 10 contendo N-laurilsarcosina 0,2% e incubando 1 h a 20^oC ao ar atmosférico saturado de umidade para impedir a evaporação. No final da incubação a solução foi neutralizada com HCl, centrifugada e estocada a -20^oC [34].

2.2.11.2 Solubilização com uréia e renaturação por diálise (Método de Paris)

100 mL de cultura bacteriana ativada ($A_{600} \sim 4$ u.o.) foram centrifugados a 4000g por 5 min a 4°C e processado utilizando o seguinte protocolo:

1) Lise bacteriana por ultra-som

O precipitado foi ressuspensão em solução de Tris HCl 50 mM e EDTA 0,5 mM pH 8,0. A esta suspensão foi aplicado ultrasom com uma frequência de 60 khz por 30 s, por 5 vezes a intervalos de 30s, em gelo.

O lisado foi centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4°C.

2) Isolamento dos corpos de inclusão

O precipitado foi lavado 3 vezes com 40 mL de solução Tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0 e PMSF 0,1 mM, centrifugando a 12000 g, por 15 min., 4°C.

3) Solubilização com uréia

Na solubilização foi utilizado fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0, uréia 8 M e β -mercaptoetanol 1%, nas concentrações de 0,16; 0,60 e 0,80 mg de prolactina /mL. Esta solução contendo os corpos de inclusão foi aquecida a 55 °C por 5 min e deixada em temperatura ambiente por 2 h.

4) Renaturação

A renaturação foi realizada por diálise contra 20 volumes de solução contendo bicarbonato de amônio 50mM e PMSF 0,5 mM, por 60 h, com 8 trocas da solução.

A solução contendo a proteína renaturada foi centrifugada a 12.000g, por 15 min, a 4°C.

A solução contendo a proteína solubilizada foi liofilizada e ressuspensa em bicarbonato de amônio 50mM [47].

2.2.12 Extração das proteínas bacterianas por choque osmótico

Uma cultura bacteriana foi centrifugada a 4.000g por 15 min a 4°C. O pellet de bactérias foi ressuspensa em solução de Tris HCL 10mM pH 7,5 contendo sacarose 20 % e solução de EDTA 0,5 M pH 8,0, e mantido nesta solução por 10 min em gelo. A suspensão obtida foi centrifugada a 4.000 g por 15 min a 4°C. O pellet foi ressuspensa em solução de TrisHCl 1 mM pH 7,0 e mantido em gelo por mais 10 min. Após nova centrifugação, sempre nas mesmas condições, o sobrenadante contendo as proteínas periplásmicas foi coletado, sendo chamado "extrato periplásmico" [27].

3. Resultados

3.1 Padronização das condições de ativação do promotor *tac* na expressão de uma proteína bacteriana (exoglucanase)

A análise da influência dos componentes intrínsecos dos vetores de expressão utilizados neste trabalho, sobre a expressão de prolactina humana ligada a uma seqüência tag (taghPrl) em corpos de inclusão, iniciou-se com a determinação da eficiência de expressão de um vetor citoplásmico que fosse utilizado como referência. Os valores de MORGANTI e col.(1993), referentes à eficiência de expressão de hPrl periplásmica, foram da ordem de 10^{-5} $\mu\text{g/mL.A}_{600}$ quando foi utilizado um vetor de expressão com o promotor λP_L [40] e da ordem de $0,7\mu\text{g/mL.A}_{600}$ para a taghPrl quando utilizando um vetor de expressão com o promotor *tac* [41]. Diante destes dados optou-se por padronizar as condições de expressão da taghPrl citoplásmica com um vetor contendo o promotor *tac*, aparentemente mais eficiente, e utilizá-lo como vetor de referência.

A princípio utilizou-se como proteína de referência uma exoglucanase [46] ligada a uma seqüência tag (tagExo) que, sendo uma proteína natural de *E. coli*, teria uma menor possibilidade de sofrer degradação e, de alguma forma, poderia ter sua expressão favorecida [35]. Para a expressão desta proteína, que possui um peso molecular de ~ 23 kDa, foi utilizado o vetor *ptac-tagExo*, na cepa HB2151. Na Figura 3.1 está apresentado um estudo de expressão citoplásmica desta proteína em SDS-

PAGE. Observa-se que houve expressão significativa somente quando o IPTG foi adicionado ao meio de cultura em fase de crescimento exponencial. Nestas condições de ativação foram estudadas diferentes concentrações de IPTG (2; 1 e 0,1 mM) e não foram observadas diferenças significativas na expressão de tagExo. Com a adição de IPTG 0,1 mM foi obtida uma expressão de aproximadamente 11 $\mu\text{g/mL.A}_{600}$ em 6 h e de 33 $\mu\text{g/mL.A}_{600}$ em 9 h de cultivo (dado obtido posteriormente e apresentado na Figura 3.3, canaletas 5 e 6). Portanto, por estes resultados, concluiu-se que as condições de ativação que propiciaram a maior expressão de tagExo foram: ativação por um período de 9 horas com IPTG 0,1 mM adicionado à cultura com a A_{600} entre 0,4 e 0,5 u.o.

Nesta mesma Figura 3.1, canaletas 8 e 9, ainda podemos observar que a expressão periplásmica da exoglucanase, utilizando uma seqüência sinalizadora de *Celulomonas fimi* (SC), só é observada no lisado total bacteriano, não sendo detectada no periplasma [21].

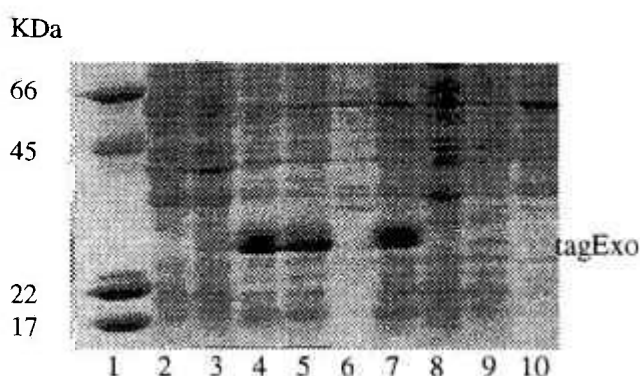


Figura 3.1: Análise realizada mediante eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da expressão de exoglucanase pelo plasmídeo *ptac-tagExo* na cepa HB2151. Todas as amostras são derivadas de lise total de bactérias, com exceção daquelas derivadas de choque osmótico. 1) marcadores de peso molecular (10 μ g): soroalbumina bovina, 66 kDa; ovoalbumina, 45 kDa; hormônio de crescimento humano recombinante, 22 kDa e mioglobina, 17 kDa; 2) cultura sem ativação; 3) cultura ativada por 16 h com adição inicial de IPTG 2mM ao meio; 4) cultura ativada após ter atingido uma $A_{600} \approx 0,4-0,5$ com IPTG 2mM por 6h; 5) cultura nas mesmas condições da n.º. 4, ativando com IPTG 1mM; 6) proteínas periplásmicas (choque osmótico): cultura nas mesmas condições da amostra n.º. 5; 7) cultura nas mesmas condições da n.º. 4, ativando com 0,1 mM IPTG; 8) *ptac-SC-tagExo* (SC, seqüência sinalizadora da celulase), sem ativação; 9) *ptac-SS-tagExo*, mesmas condições da n.º. 4, ativando com IPTG 1mM: lise total; 10) proteínas periplásmicas: cultura nas mesmas condições da amostra n.º. 9 (choque osmótico).

3.2 Análise da expressão de taghPrl citoplásmica sob as condições de ativação estabelecidas para a exoglucanase bacteriana

Após ter estabelecido as condições ideais de expressão da exoglucanase bacteriana, estas foram aplicadas à expressão de taghPrl. A expressão de taghPrl foi estudada com o vetor *ptac-taghPrl*, derivado do mesmo vetor capaz de expressar a exoglucanase, utilizando-o como vetor de referência para a expressão de taghPrl. Na Figura 3.2 observa-se que não houve diferenças significativas de expressão entre as ativações com IPTG 0,1 e 2 mM. Quanto à duração da ativação com IPTG, confirmaram-se os resultados encontrados para a expressão de tagExo.

Após este experimento ficou evidente a possibilidade de obter-se uma alta expressão de taghPrl no citoplasma bacteriano, provavelmente maior do que a obtida para a exoglucanase.

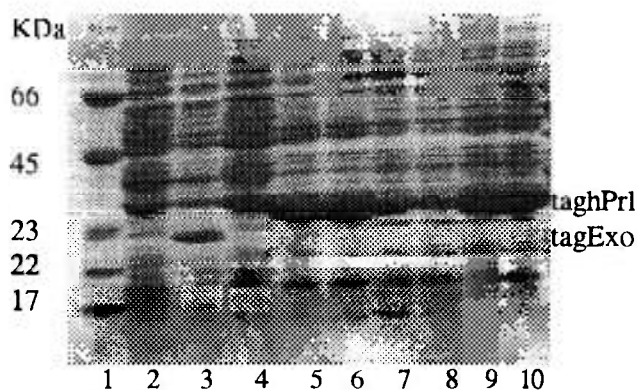


Figura 3.2: Gel de poliacrilamida em que se observa a expressão da exoglucanase e taghPrl na cepa HB2151. As amostras se referem ao lisado bacteriano total. Quando não especificado a ativação sempre foi realizada por adição de IPTG na fase de crescimento exponencial. 1) marcadores de peso molecular (5 μ g); 2) *ptac-tagExo* sem ativação; 3) *ptac-tagExo*, ativação por 6 h, adicionando 0,1 mM de IPTG; 4) vetor de referência (*ptac-taghPrl*) sem ativação; 5) vetor de referência, ativação por 16 h com 0,1 mM de IPTG (adição inicial); 6) vetor de referência, ativação por 16 h com 2 mM de IPTG (adição inicial); 7) vetor de referência, ativação por 6 h, adicionando 0,1 mM de IPTG; 8) vetor de referência, ativação por 6 h, adicionando 2 mM de IPTG; 9) vetor de referência, ativação por 9 h, adicionando 0,1 mM de IPTG; 10) vetor de referência, ativação por 9 h, adicionando 2 mM de IPTG.

Em outro experimento foram analisados também dois clones transformados com o vetor de referência (*ptac-taghPrl*), a distância de 1 ano entre um do outro (Figura 3.3), os quais apresentaram aproximadamente a mesma eficiência de expressão. A utilização de marcadores de peso molecular em três níveis diferentes (10, 5, e 2,5 μg) facilitou a quantificação densitométrica da proteína de interesse: 59 $\mu\text{g/mL}$ (canaleta 8). A_{600} para o clone recém transformado e 53 $\mu\text{g/mL}$. A_{600} para o clone com 1 ano de estocagem (canaleta 10). Este nível de expressão foi claramente superior à expressão da tagExo (canaleta 6).

Novamente foi realizada uma comparação entre a expressão citoplásmica e periplásmica de taghPrl (Figura 3.3, linhas 8 e 12, respectivamente). Obteve-se uma eficiência de expressão periplásmica de 1,3 $\mu\text{g/mL}$. A_{600} . O valor médio de expressão de taghPrl no periplasma obtido em três experimentos foi de $0,87 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$. A_{600} , confirmando os dados já mencionados, obtidos por MORGANTI e col. (1996). A banda mais intensa na posição imediatamente superior àquela relativa à taghPrl periplásmica, analisada em Western blotting (canaleta 8), não foi identificada como uma forma de prolactina (Figura 3.4). O mesmo Western blotting também confirmou a identidade da prolactina expressa no periplasma e no citoplasma. Observa-se, na linha 8, que a forma da banda de taghPrl sugere a presença de uma grande quantidade de proteína bacteriana, de fato observada na linha 12 da Figura 3.3.

Além dos altos níveis de expressão citoplásmica obtidos (aproximadamente 50 vezes superior aos níveis de expressão periplásmica),

observa-se, também, a eficiente repressão do promotor *tac* que, sem ativação, ou seja na ausência de IPTG, não apresentou praticamente nenhuma expressão da proteína colocada sob o seu controle. As amostras sem ativação (controles) foram incubadas simultaneamente e pelo mesmo tempo das amostras ativadas.

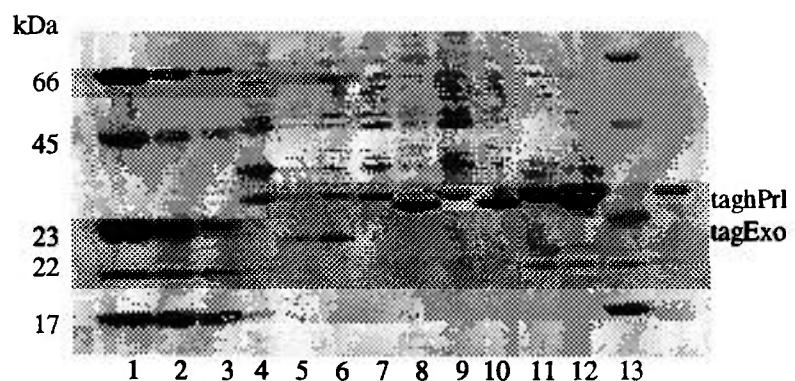


Figura 3.3: Análise em SDS-PAGE da expressão da exoglucanase e da taghPrl na cepa HB2151. As amostras de 4 a 10 se referem ao lisado bacteriano total, enquanto as amostras 11 e 12 somente ao produto de choque osmótico (proteínas periplásmicas). 1, 2 e 3) marcadores de peso molecular (10, 5 e 2,5 µg, respectivamente); 4) *ptac-tagExo* sem ativação; 5) *ptac-tagExo*, ativação por 6h; 6) *ptac-tagExo*, ativação por 9 h; 7) vetor de referência (*ptac-taghPrl*), clone A recém transformado, sem ativação; 8) vetor de referência, clone A, ativação por 9 h; 9) vetor de referência, clone B com um ano de estocagem, sem ativação; 10) vetor de referência, clone B, ativação por 9 h; 11) *ptac-SC-taghPrl*, sem ativação (choque osmótico); 12) *ptac-SC-taghPrl*, ativação por 9 h (choque osmótico); 13) marcadores de peso molecular (2,5 µg).

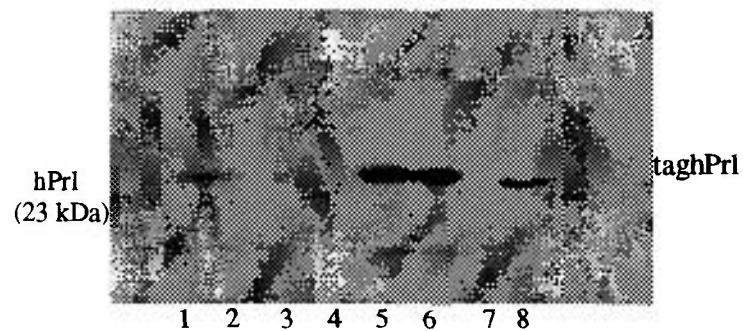


Figura 3.4: Análise em Western blotting em que se observa a expressão de taghPrl pelo vetor de referência no citoplasma e no periplasma de *E. coli* (HB2151). 1, 2 e 3) hPrl pituitária (0,500; 0,250 e 0,125 μ g, respectivamente); 4) vetor de referência sem ativação; 5) vetor de referência, clone A ativação por 9 h; 6) vetor de referência, clone B ativação por 9 h ; 7) *ptac-SC-taghPrl* sem ativação (choque osmótico); 8) *ptac-SC-taghPrl*, ativação por 9 h (choque osmótico).

3.3 Determinação da eficiência de expressão do vetor de referência (*ptac-taghPrl*) em três diferentes cepas bacterianas

No estudo da eficiência de expressão de *taghPrl* no vetor *ptac-taghPrl*, foram utilizadas 3 cepas de *E. coli.* : a cepa HB2151, que foi também utilizada no estudo de expressão da exoglucanase, a cepa RB791, muito utilizada com vetores *ptac*, para expressão citoplásmica e periplásmica de diferentes proteínas [1] e [31] e a cepa RRI que é amplamente utilizada com os vetores contendo o promotor λP_L . A cepa RRI, que normalmente é cultivada a 30°C para manter reprimido o promotor λP_L , foi cultivada a 37°C com os vetores baseado no promotor *tac*.

Na Tabela 3.1 são apresentadas as eficiência médias de expressão de *taghPrl* obtidas, em três experimentos independentes, com as referidas cepas de *E. coli.* Este estudo indicou que a expressão na cepa HB2151 foi claramente maior que nas outras, obtendo-se quase o dobro da expressão quando comparada com a cepa RRI. Na cepa HB2151 também foi obtida a maior atividade específica, o que é de grande interesse para a padronização do processo de purificação. A diferença encontrada na eficiência de expressão em HB2151 com relação aos dados anteriores pode ser devida à grande quantidade de amostra de *taghPrl* aplicada anteriormente no gel, não permitindo uma determinação densitométrica exata por estar acima da região de linearidade da relação dose-resposta.

Tabela 3.1: Eficiência de expressão do vetor de referência nas cepas HB2151, RRI e RB791, determinada por densitometria (n=3).

Cepas	Eficiência de Expressão ($\mu\text{g/mL.A600}$)		Atividade específica ^①	
	$\bar{X} \pm \text{DP}$	CV(%)	$\bar{X} \pm \text{DP}$	CV(%)
HB2151	112,7 \pm 16,3	14%	49,7 \pm 8,1	16%
RRI	59,0 \pm 10,0	17%	44,2 \pm 18,6	42%
RB791	32,7 \pm 4,6	14%	17,9 \pm 2,1	12%

① A atividade específica foi calculada como a porcentagem de taghPrl sobre o total de proteínas bacterianas.

3.4 Construção de diferentes vetores de expressão citoplásmica para met-ala-thr-ser-(his)₆-ile-glu-gly-arg-hPrl (taghPrl)

O estabelecimento das melhores condições de ativação para a expressão de taghPrl citoplásmica no vetor de referência (*ptac-taghPrl*), utilizando a cepa bacteriana HB2151, produziu uma eficiência de expressão de até 112 µg/ml.A₆₀₀ (Tabela 3.1). Esta expressão está entre as mais altas já descritas na literatura para qualquer tipo de proteína recombinante obtida em *E. coli*. Os estudos que se seguiram tiveram o escopo de identificar os elementos responsáveis por esta alta expressão, por meio da análise de expressão de taghPrl nos plasmídeos *pλP_L I*, *pλP_L II*, *pλP_L III*, *pλP_L IV* e *ptac I* que serão descritos a seguir. Deu-se prioridade à obtenção de uma alta expressão em vetores baseados no promotor *λP_L*, que é ativado a 42^oC, por ser este tipo de ativação mais indicada para a obtenção de produtos farmacêuticos injetáveis.

3.4.1 Construção do vetor *pλP_L I*

Com este vetor foi obtida a expressão de taghPrl no citoplasma sob o controle do promotor *λP_L*. Nesta construção foi retirado, do vetor de referência, o cDNA para a taghPrl por meio das enzimas de restrição EcoR I e Hind III e colocado em um fragmento contendo o promotor *λP_L*, a origem de replicação do vetor pUC19 e o gene que confere resistência à ampicilina (*amp^r*) (Fig. 3.5).

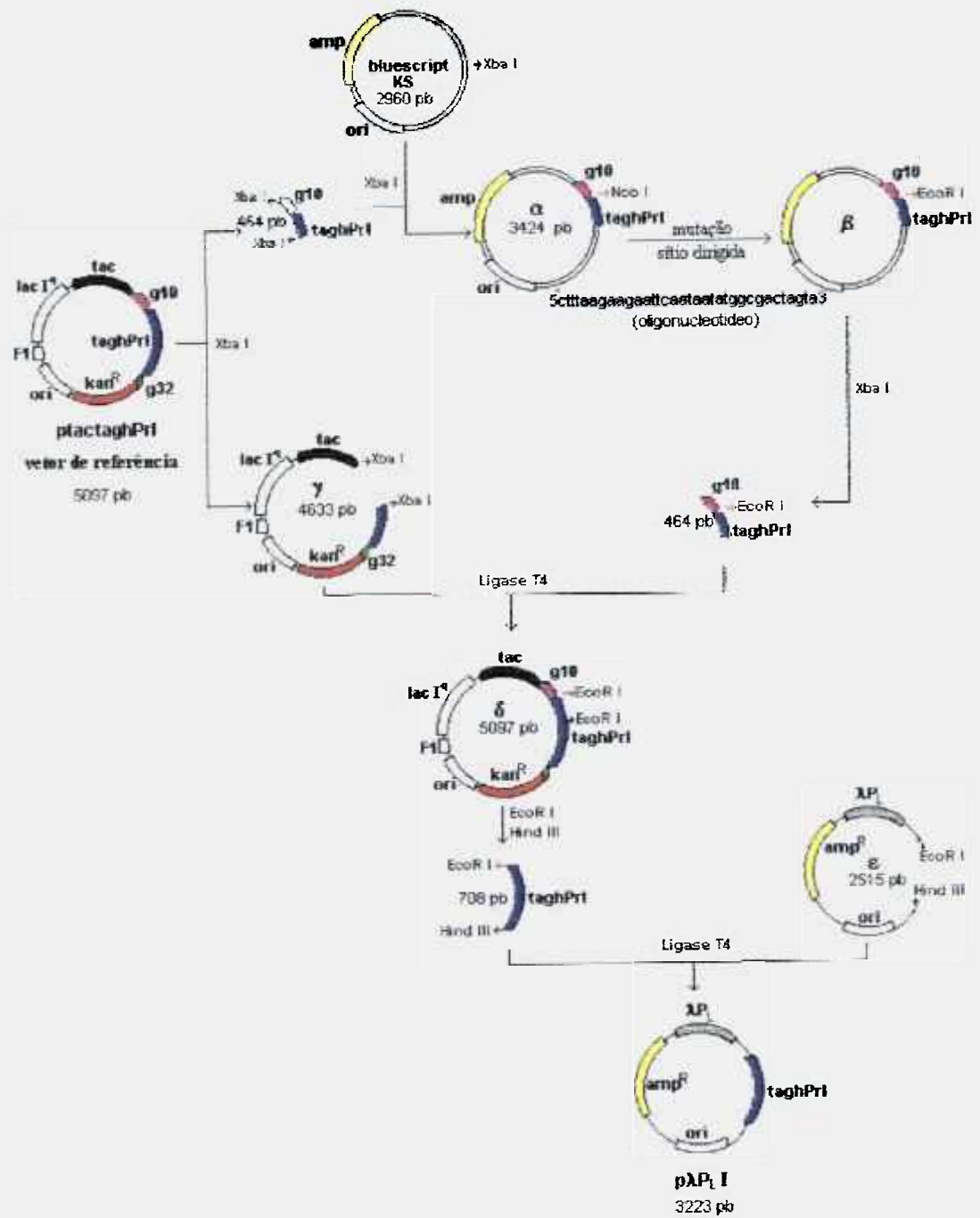


Figura 3.5: Esquema de construção do vetor $p\lambda P_L I$.

3.4.1.1 Criação do sítio EcoR I por mutação sítio dirigida

Para retirar o cDNA da *taghPrl* do vetor de referência foi necessária a criação do sítio para a enzima EcoR I na região 5', entre a seqüência *tag* e a *g10*. Na Figura 3.5 está esquematizada esta construção, na qual encontram-se o esquema de retirada do fragmento de 464 pb do vetor de referência com a enzima Xba I e a inserção deste no vetor pbluescript KS⁻, originando o vetor α . A mutação nesta seqüência foi realizada no vetor KS⁻ porque o vetor original, mesmo possuindo a seqüência *F1*, se mostrou ineficiente na produção de DNA fita simples [41]. A mutação foi realizada em cepa bacteriana RZ1034 com o oligonucleotídeo

5' cttaagaaggagaattcaatatggcgactagtc 3'

Após a mutagenese foram analisados 12 clones utilizando a enzima EcoR I. Este novo sítio foi encontrado somente em dois clones, nos quais foi realizado também o seqüenciamento da região de mutação. Este plasmídeo foi denominado β .

Do plasmídeo β foi retirado o fragmento mutado e recolocado no plasmídeo de referência, originando o plasmídeo δ . Foram analisados 6 clones resultantes desta inserção, dois dos quais apresentaram o inserto na orientação correta.

3.4.1.2 Inserção do cDNA da taghPrl no vetor contendo o promotor λP_L

A inserção do cDNA da taghPrl no vetor $p\lambda P_L-amp^r$ foi feita pela ligação das extremidades coesivas produzidas pelas enzimas EcoR I e Hind III, tanto no vetor quanto no inserto (Figura 3.5). Para obter o fragmento EcoR I-Hind III a partir do plasmídeo δ foi necessário um estudo de clivagens parciais com a enzima EcoR I, pois o DNA da hPrl, que não pode obviamente ser clivado, já possuía um sítio para esta enzima. Pode-se observar o estudo da cinética de reação enzimática na Figura 3.6. Este estudo mostrou que em 15 min de reação produziu-se aproximadamente a mesma quantidade dos fragmentos, derivados de clivagem em um ou em dois sítios EcoR I, sendo esta condição a mais útil para a purificação do fragmento desejado.

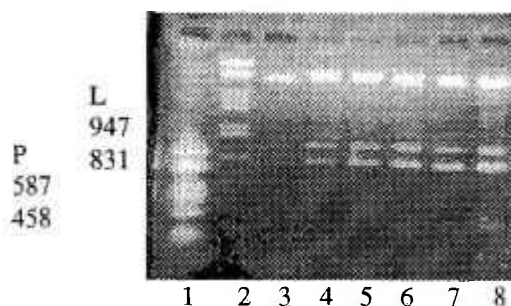


Figura 3.6: Estudo em gel de agarose da cinética de clivagem parcial do plasmídeo δ com EcoR I. Foram usados 800 ng do plasmídeo e 1 u de EcoR I. Fragmentos esperados: 708 pb (desejável) e 540 pb (indesejável). 1) marcador de peso molecular de 590 a 100 pb (P -vetor pUC19 clivado com a enzima Hae III); 2) marcador de peso molecular de 21.000 a 560 pb (L -fago λ clivado com as enzimas Hind III e Eco RI); 3) a 8) Reação enzimática de 0; 5; 10; 15; 20 e 30 min respectivamente, a 37°C.

Estabelecidas as condições de reação, o fragmento de interesse (708 pb) foi purificado com o uso de membrana de troca iônica (materiais e métodos, item 2.2.4). Após a ligação ao fragmento \mathcal{E} , obtido a partir de um vetor em uso no laboratório para a produção de outro hormônio, e transformação, foram obtidos seis clones sendo que três destes apresentaram o inserto na orientação correta.

Concluída a construção do vetor desejado ($p\lambda P_L I$) este foi usado para transformar a cepa RRI sendo realizada uma cinética de expressão com um dos clones. Pode-se observar na Figura 3.7 que a produção de taghPr1, sob o controle do promotor λP_L , teve seu pico de expressão após 8 - 9 h de ativação a 42°C, sendo aproximadamente 10 vezes inferior à expressão do vetor de referência. Nesta figura observa-se, também, a expressão do vetor δ que permaneceu semelhante àquela do vetor de referência, mesmo após a manipulação efetuada. (linhas 12 e 13, respectivamente).

Na Figura 3.10 são analisados, em Western blotting, dois clones derivados de $p\lambda P_L I$, em comparação com outros clones derivados do vetor de referência e do vetor $p\lambda P_L II$. Esta análise confirmou que o produto da expressão deste vetor é realmente uma forma imunologicamente ativa de prolactina humana.

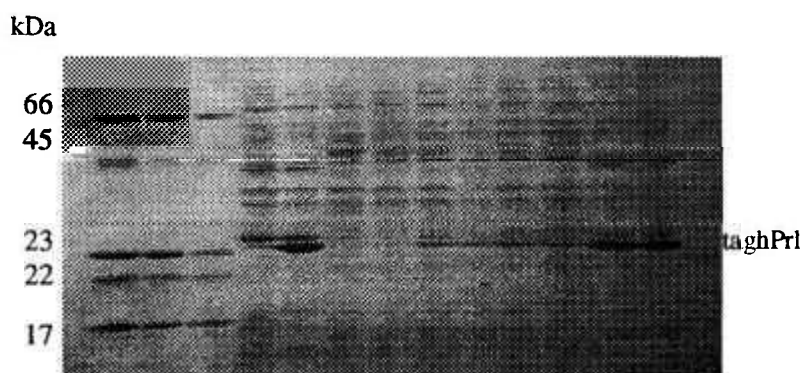


Figura 3.7: Cinética de expressão de taghPrI obtida na cepa RRI transformada com o vetor $p\lambda P_L I$ e analisada em gel de poliacrilamida.

1) a 3) marcadores de peso molecular (3, 2 e 1 μg); 4) vetor de referência sem ativação; 5) vetor de referência, ativado por 9 h;
6) $p\lambda P_L I$ sem ativação; 7) a 11) $p\lambda P_L I$, ativado por 2, 4, 6, 8 e 9 h, respectivamente; 12) repetição da amostra n.º. 5; 13) vetor δ , ativado por 9 h

3.4.2 Construção do vetor $p\lambda PL II$

Com o intuito de avaliar a influência do elemento ativador de tradução $g10$ derivado do bacteriófago T7, na eficiência de expressão de $taghPr1$, este foi inserido no plasmídeo $p\lambda PL I$ (Figura 3.8). Esta seqüência $g10$ também está presente no vetor de referência.

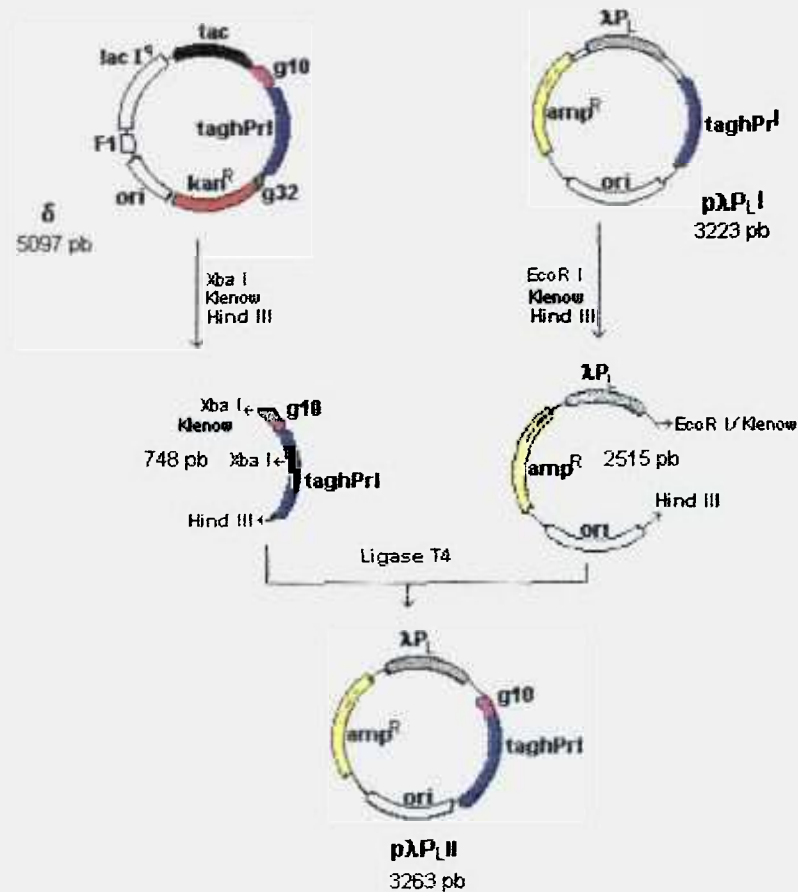


Figura 3.8: Esquema de construção do vetor $p\lambda PL II$.

A retirada do fragmento de 748 pb do vetor δ , contendo a seqüência *g10-taghPrl*, foi efetuada com as enzimas de restrição Xba I, klenow para obter extremidade não coesiva e Hind III. Para a enzima Xba I houve necessidade de fazer, também, uma clivagem parcial porque o gene para hPrl contém um sítio para esta enzima. O fragmento de 2515 pb contendo o promotor λP_L , a origem de replicação e o gene *amp^r* foi retirado do plasmídeo *p λP_L I* utilizando as enzimas EcoR I, klenow e Hind III.

Após a reação de ligação entre os dois fragmentos (748 e 2515 pb), foram encontrados 3 clones com o inserto *g10-taghPrl* na orientação correta.

Este plasmídeo foi testado quanto à expressão de taghPrl, realizando uma cinética de ativação da mesma forma que para o plasmídeo *p λP_L I*. Os resultados apresentados na Figura 3.9 confirmaram o tempo de ativação de 8 h como sendo o de maior expressão de taghPrl. O nível de expressão deste vetor foi discretamente inferior à do mesmo vetor sem a seqüência *g10*. A influência da seqüência *g10* na expressão de taghPrl mostrou-se nula. É interessante observar que, para estas duas construções, o promotor λP_L nunca é totalmente reprimido (linhas 5 e 9).

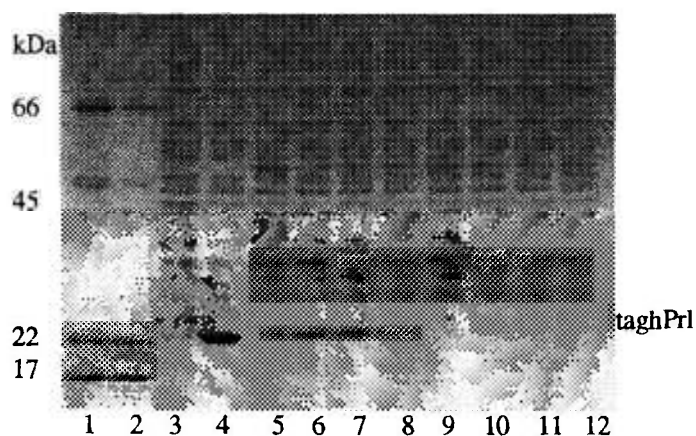


Figura 3.9: Cinética de ativação de taghPrI relativa aos plasmídeos $p\lambda P_L I$ e $p\lambda P_L II$, analisada em gel de poliacrilamida.

1) e 2) marcadores de peso molecular (2 e 1 μ g); 3) vetor de referência sem ativação; 4) vetor de referência ativado; 5) $p\lambda P_L I$ sem ativação; 6) a 8) $p\lambda P_L I$, ativado por 7, 8 e 9 h; 9) $p\lambda P_L II$ sem ativação; 10) a 12) $p\lambda P_L II$, ativado por 7, 8 e 9 h.

O Western blotting apresentado na Figura 3.10 demonstra que a proteína expressa pelos vetores $p\lambda P_L I$ e $p\lambda P_L II$ é uma forma de taghPrI imunologicamente ativa. Observa-se que o vetor com a seqüência *g10* parece possuir um mecanismo mais eficiente de repressão. Uma avaliação quantitativa realizada com base neste Western Blotting indicaria que $p\lambda P_L I$ e $p\lambda P_L II$ possuem praticamente a mesma eficiência de expressão. Ao nosso ver, porém, a quantificação realizada por SDS-PAGE merece maior confiança.

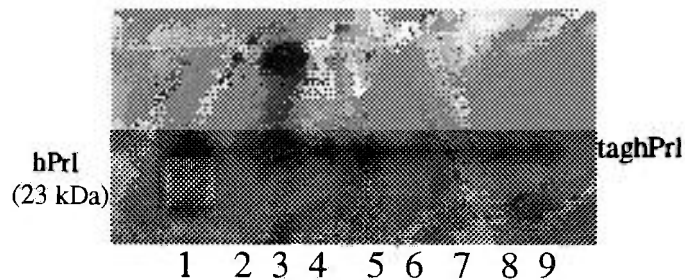


Figura 3.10: Análise em Western blotting de taghPrI expressa pelos vetores $p\lambda P_L I$ e $p\lambda P_L II$, relativa a dois clones. As linhas 5 e 6 são relativas a dois clones diferentes contendo o plasmídeo $p\lambda P_L I$, enquanto as linhas 8 e 9 de dois clones contendo o plasmídeo $p\lambda P_L II$. 1) hPrI pituitária (200 ng); 2) vetor de referência sem ativação; 3) vetor de referência ativado; 4) $p\lambda P_L I$ sem ativação; 5) e 6) $p\lambda P_L I$, ativado por 8 h (clones 1 e 2); 7) $p\lambda P_L II$ sem ativação; 8) e 9) $p\lambda P_L II$, ativado por 8 h (clones 1 e 2).

3.4.3 Construção do vetor $p\lambda P_L III$

No estudo dos elementos de um vetor de expressão que atuam na expressão protéica, foi analisado o conjunto terminador de transcrição ($g32$, derivado do fago T4) – gene que confere resistência ao antibiótico canamicina (kan^r). Partiu-se do $p\lambda P_L II$ para a obtenção do inserto contendo o promotor λP_L , a seqüência $g10$ e o cDNA para a taghPr1 (1086 pb). O fragmento com a origem de replicação e o conjunto $g32-kan^r$ (2426 pb) foi retirado, por praticidade, de um vetor de expressão para o hGH que tinha sido construído a partir do plasmídeo δ Fig. 3.5. Ambos os fragmentos, de 1086 e 2426 pb, foram obtidos a partir de clivagens com as enzimas Aat II e Hind III. Na Figura 3.11 está esquematizada a construção deste vetor.

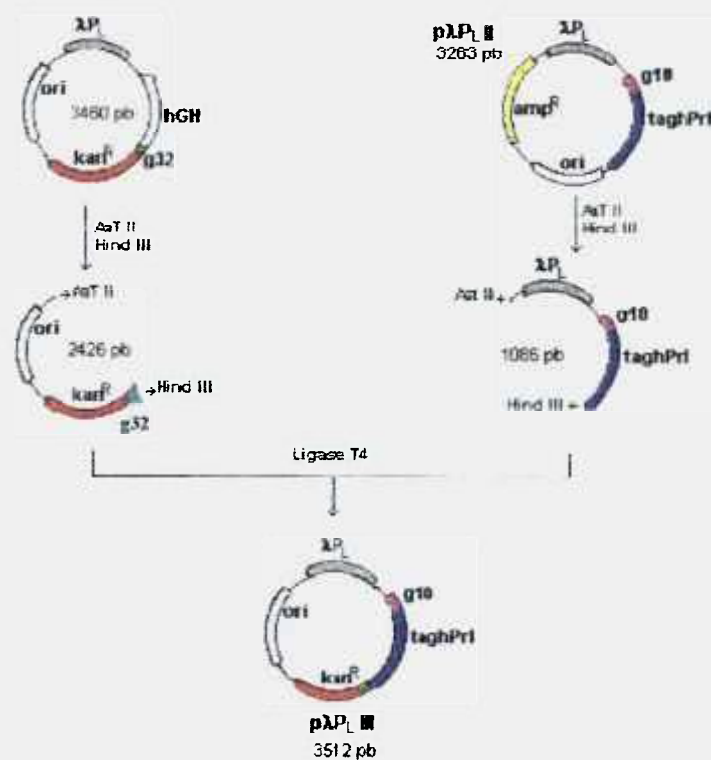


Figura 3.11: Esquema de construção do vetor $p\lambda P_L III$.

A reação de ligase entre estes fragmentos produziu cinco clones contendo um plasmídeo de ~ 3500 pb que possuíam orientação correta do inserto. A expressão de taghPrl produzida a partir destes cinco clones foi analisada em SDS-PAGE. Na Figura 3.12, pode-se observar que a expressão relativa aos clones 3 e 4 (linhas 7 e 8, respectivamente) é sensivelmente maior.

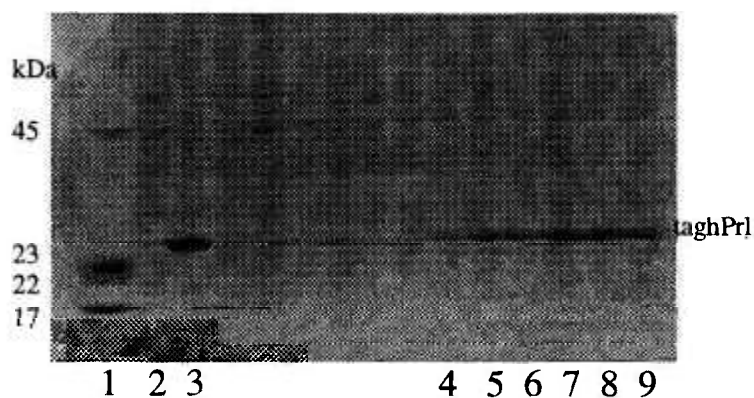


Figura 3.12: Análise em gel de poliacrilamida da expressão de taghPrl nos cinco clones obtidos, contendo o vetor $p\lambda P_L III$.

1) marcadores de peso molecular (2 μ g); 2) vetor de referência sem ativação; 3) vetor de referência ativado; 4) clone 1 sem ativação; 5) a 9) clones 1 a 5, ativados por 8 h. Entre as linhas 3) e 4) foram colocadas amostras não relacionadas com este experimento.

A confirmação da atividade imunológica da taghPrl expressa pelos cinco clones foi confirmada por Western blotting (Figura 3.13). De acordo com esta técnica os clones 4 e 5 foram aqueles que apresentaram o maior nível de expressão (linhas 8 e 9, respectivamente). Foi escolhido, portanto, o clone 4 para os futuros estudos.

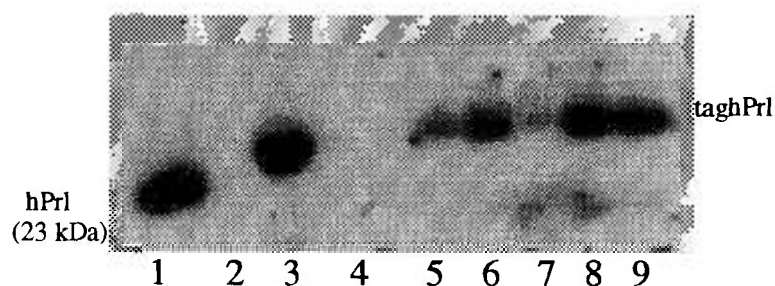


Figura 3.13: Análise em Western blotting da expressão de taghPrl pelo vetor *pλP_L III*.

- 1) hPrl pituitária (200 ng); 2) vetor de referência sem ativação;
- 3) vetor de referência ativado; 4) *pλP_L III* (clone 1) sem ativação;
- 5) a 9) clones 1 a 5, ativados por 8 h.

3.4.4- Construção do vetor *pλP_L IV*

Para analisar a influência dos elementos *g32* e *kan^r*, foi retirada do vetor *pλP_L III* a seqüência *g32*. Para esta finalidade clivou-se o vetor com as enzimas Aat II e Hind III originando dois fragmentos: um de 1086 pb contendo o promotor *λP_L*, a seqüência de DNA *g10* e o cDNA para a *taghPrl* e o outro de 2426 pb contendo a seqüência para a origem de replicação, o gene *kan^r* e a seqüência *g32*. O fragmento de 2426 pb ainda foi clivado com a enzima Pst I produzindo os fragmentos de 1826 pb e 560 pb. No fragmento de 560 pb, que continha parte do gene *kan^r* e a seqüência *g32*, foi realizado o PCR utilizando os oligonucleotídeos:

Sense -5' tttatattaagcttcacgctgccgcaagc 3' e

Anti-sense - 5' cctcgtcctgcagttcattc 3'

Com este procedimento a seqüência *g32* (28 pb) foi retirada, colocando no seu lugar um sítio Hind III e obtendo assim um fragmento de 532 pb (Figura 3.14).

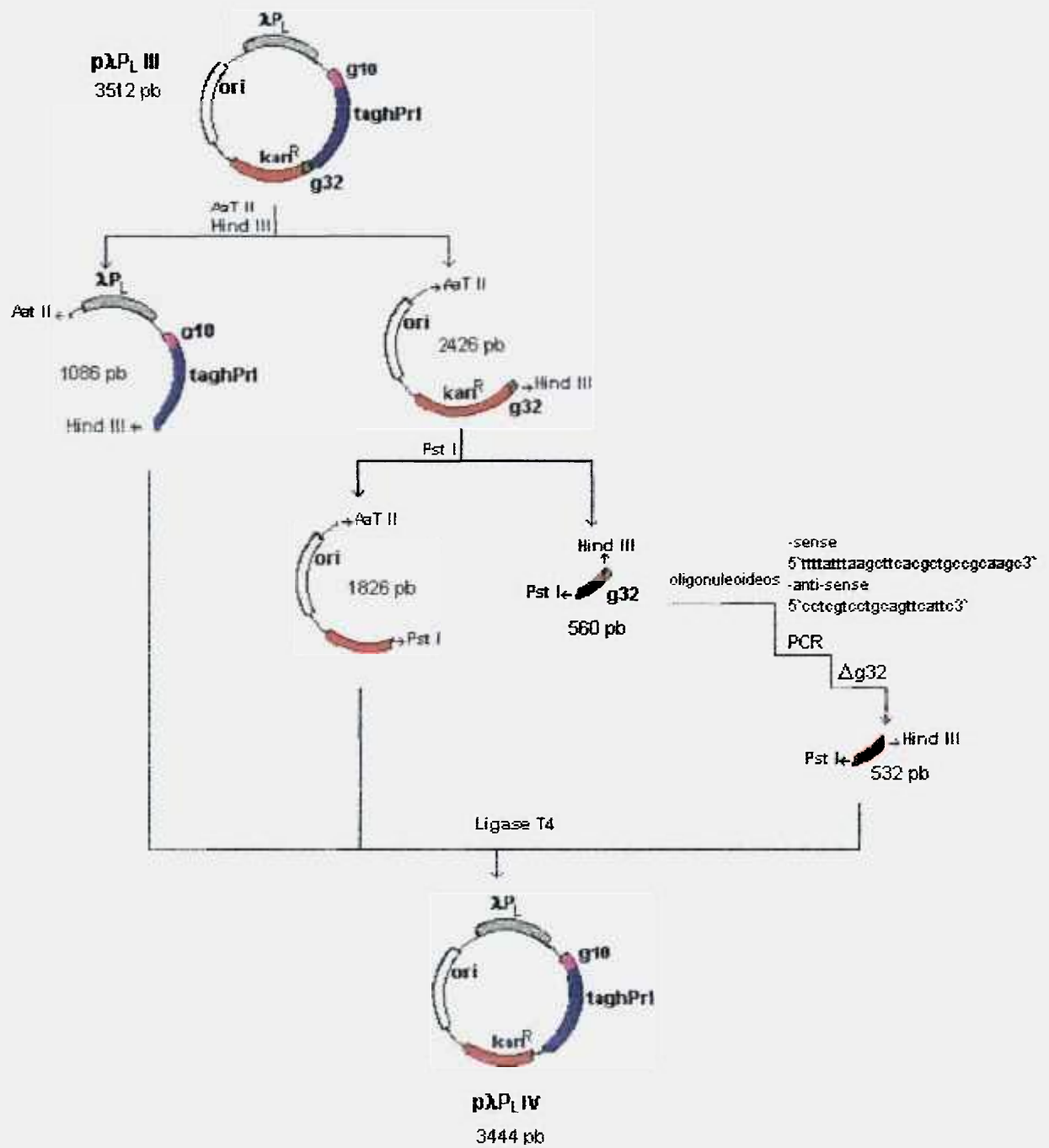


Figura 3.14: Esquema de construção do vetor *pλP_L IV*.

Os fragmentos de 1086 pb, 1826 pb e 532 pb foram utilizados em reação de ligação tríplice que produziu 21 clones. A análise de restrição feita para um dos clones confirmou a ausência da seqüência de 28 pb (Figura 3.15). No mesmo gel podem também ser observados os fragmentos purificados necessários para a construção do vetor *pλP_L IV*.

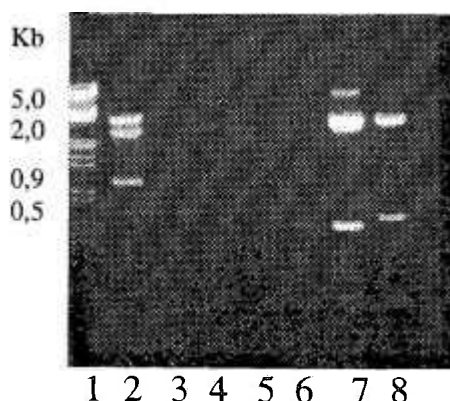


Figura 3.15: Análise de restrição em gel de agarose do plasmídeo *pλP_L IV*

comparado com o vetor *pλP_L III*.

1) marcador de peso molecular (L); 2) clivagem parcial do vetor *pλP_L III* com as enzimas Pst I e Hind III; 3) a 6) fragmentos (1089, 2426, 1826 e 532 pb) purificados para a construção do vetor *pλP_L IV*; 7) clone positivo derivado do *pλP_L IV* com o fragmento de 532 pb; 8) vetor *pλP_L III* com o fragmento de 560 pb.

Com o clone positivo foi feita a análise de expressão de taghPrI. Nesta análise foi comparada a expressão do vetor $p\lambda P_L IV$ com aquela do $p\lambda P_L III$, que contém o terminador de transcrição (Figura 3.16).

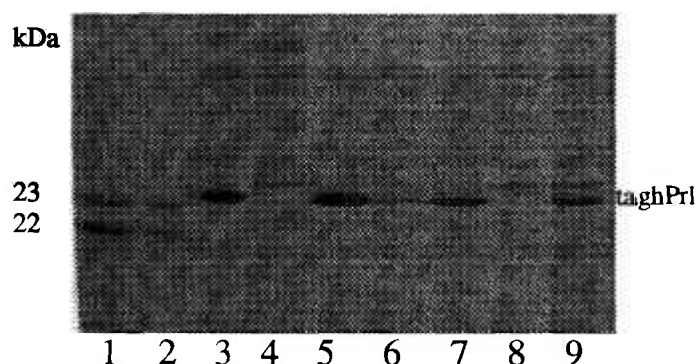


Figura 3.16: Análise, em gel de poliacrilamida, da expressão de taghPrI pelo vetor $p\lambda P_L IV$, que não possui o terminador de transcrição, comparada com aquela relativa ao vetor $p\lambda P_L III$.

1) e 2) marcadores de peso molecular (2 e 1 μg , respectivamente);
3) vetor de referência ativado (preparação de 6 meses); 4) vetor de referência sem ativação; 5) vetor de referência ativado (preparação recente); 6) vetor $p\lambda P_L III$ sem ativação; 7) vetor $p\lambda P_L III$ ativado; 8) vetor $p\lambda P_L IV$ sem ativação; 9) vetor $p\lambda P_L IV$ ativado.

Por quanto podemos observar na Figura 3.16, o nível de expressão de taghPrl pelos dois vetores com o promotor λP_L , tendo ou não a seqüência do terminador $g32$, é da mesma ordem. Observa-se que a repressão no vetor $p\lambda P_L IV$ é mais eficiente que no $p\lambda P_L III$. Estes dados são confirmados por Western blotting apresentado na Figura 3.17.

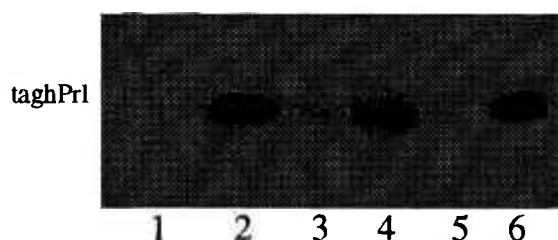


Figura 3.17: Análise em Western blotting de taghPrl, expressa pelos vetores $p\lambda P_L III$ e $p\lambda P_L IV$.

- 1) vetor de referência sem ativação; 2) vetor de referência ativado;
- 3) $p\lambda P_L III$ sem ativação; 4) $p\lambda P_L III$ ativado; 5) $p\lambda P_L IV$ sem ativação; 6) $p\lambda P_L IV$ ativado.

3.4.5- Construção do vetor *ptac I*

Nesta construção foi analisado o efeito da ausência do conjunto *g32-kan^r* na expressão de *taghPrl* sob o controle do promotor *tac*, em direta comparação com o vetor de referência. A construção deste vetor (Fig. 3.18) foi feita a partir do fragmento do plasmídeo *pλP_L II* (2254 pb), que contém a seqüência do gene *amp^r* e a origem de replicação do plasmídeo e do fragmento do plasmídeo δ (858 pb), que contém o promotor *tac*, a seqüência *g10* e aquela da *taghPrl*. Os dois fragmentos foram obtidos a partir de clivagens com as enzimas *Ssp I* e *Hind III*. O vetor obtido diferiu do vetor de referência quanto à ausência da seqüência *g32* e a substituição do gene *kan^r* com o gene *amp^r*. Embora este novo vetor não possua o gene *lacI^d*, a falta desta seqüência não deveria alterar a expressão da proteína de interesse, alterando somente a repressão, como relatado na literatura.

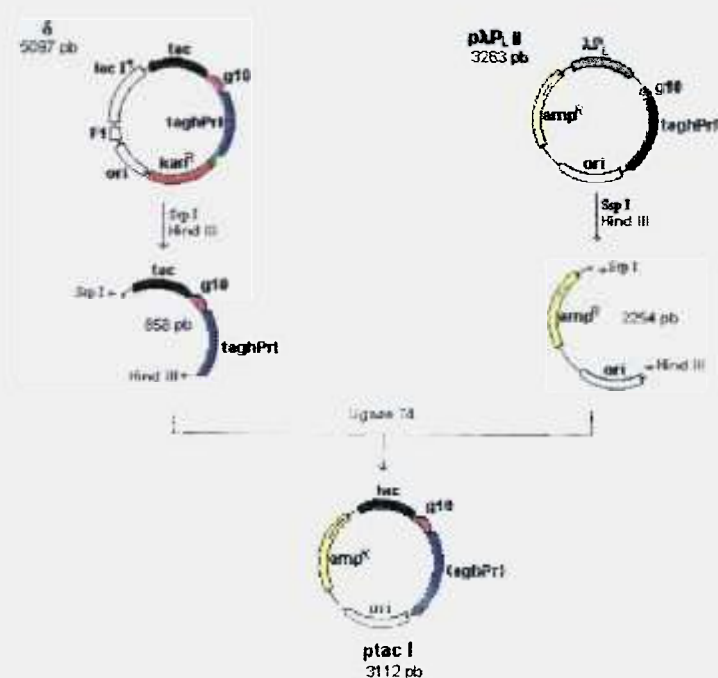


Figura 3.18: Esquema de construção do vetor *ptac I*.

Após a ligação dos dois fragmentos, obteve-se dois clones positivos, que foram testados quanto a orientação do inserto. Destes clones apenas um manteve o DNA íntegro apresentando o inserto na orientação correta.

A análise de expressão da taghPrl deste vetor foi feita em gel de poliacrilamida (Figura 3.19) e a comprovação da presença de uma forma de prolactina imunoreativa em Western blotting (Figura 3.20). Na Figura 3.19, observa-se que a expressão da taghPrl com este vetor é aproximadamente igual às obtidas com os vetores contendo o promotor λP_L e o gene *amp^r*. Como esperado, a amostra sem ativação deste vetor, teve a mesma expressão que a ativada, demonstrando que a quantidade de proteína repressora produzida pelo gene *lacI^q*, contido no cromossomo bacteriano, é bem inferior àquela expressa pelo plasmídeo.

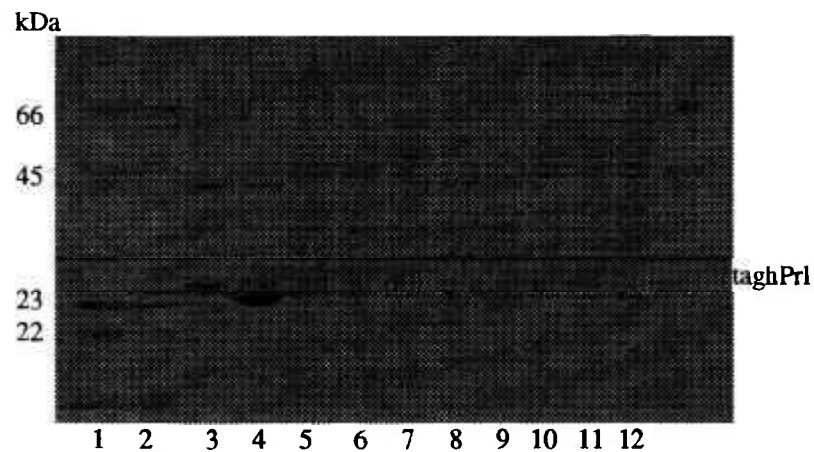


Figura 3.19: Análise em gel de poliacrilamida da expressão de taghPrl pelo vetor *ptac I*.

1) e 2) marcadores de peso molecular (2 e 1 μ g, respectivamente);
 3) vetor de referência sem ativação; 4) vetor de referência, ativado por 9 h; 5) *ptac I* sem ativação; 6) *ptac I*, ativado por 9 h;
 7) *p λ P_{L I}* sem ativação ; 8) e 9) *p λ P_{L I}*, ativado por 7 e 8 h ;
 10) *p λ P_{L II}* sem ativação; 11) e 12) *p λ P_{L II}*, ativado por 7 e 8 h.

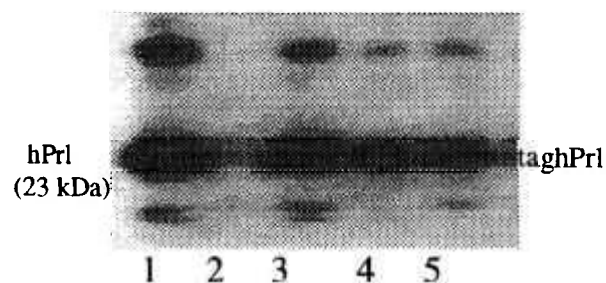


Figura 3.20: Análise em Western blotting da expressão de taghPrl pelo vetor *ptac I*. 1) hPrl pituitária (200 ng); 2) vetor de referência sem ativação; 3) vetor de referência, ativado por 9h; 4) *ptac I* sem ativação; 5) *ptac I*, ativado por 9 h.

3.5 Estudo da eficiência de expressão de taghPrl nos 5 vetores obtidos

Uma estatística relativa aos níveis de expressão de taghPrl para os cinco vetores construídos e para o vetor de referência, utilizando as cepas HB2151 e RRI, está reportada na Tabela 3.2. Após extensa análise estatística, foi confirmado que o valor da eficiência de expressão encontrado para o vetor de referência é o dobro na cepa HB2151 em comparação à expressão do mesmo na cepa RRI. A eficiência de expressão dos vetores $p\lambda PL III$ e $p\lambda PL IV$ foi da mesma ordem daquela apresentada pelo vetor de referência quando na cepa RRI.

Tabela 3.2: Eficiência de expressão para taghPrl obtida com os 6 vetores em análise, calculada em $\mu\text{g/mL} \cdot A_{600}$.

Vetores	Cepas	Eficiência de expressão	
		($\mu\text{g/mL} \cdot A_{600}$)	n
<i>ptac-taghPrl</i>	HB2151	$110,3 \pm 26$	17
<i>ptac-taghPrl</i>	RRI	$52,4 \pm 34,4$	11
<i>p\lambda PL I</i>	RRI	$16,3 \pm 9,7$	13
<i>p\lambda PL II</i>	RRI	$12,8 \pm 6,4$	11
<i>p\lambda PL III</i>	RRI	$69,6 \pm 35,4$	7
<i>p\lambda PL IV</i>	RRI	$61,4 \pm 9,1$	7
<i>ptac I</i>	HB2151	$9,2 \pm 6,9$	9

Na Tabela 3.3 estão os valores da atividade específica da taghPrl obtida no lisado bacteriano. Observa-se que os valores obtidos com os vetores $p\lambda P_L III$ e $p\lambda P_L IV$ são da mesma ordem dos valores obtidos com o vetor de referência, mesmo quando este é expresso na cepa HB2151, onde tem a sua maior expressão. Os baixos valores de atividade específica encontrados para os vetores com o gene *amp^r* acompanharam os baixos níveis de expressão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.3: Atividade específica^① de taghPrl no lisado bacteriano.

Vetores	Cepas	Atividade específica ①	
		X ± DP	n
<i>ptac-taghPrl</i>	HB2151	48,4±3,4	5
<i>ptac-taghPrl</i>	RRI	31,8±7,9	5
<i>pλP_L I</i>	RRI	20,6±5,2	5
<i>pλP_L II</i>	RRI	16,4±6,4	6
<i>pλP_L III</i>	RRI	42,0±7,5	6
<i>pλP_L IV</i>	RRI	30,0±5,0	7
<i>ptac I</i>	HB2151	8,5±2,3	6

① A atividade específica é calculada como a porcentagem de taghPrl sobre o total de proteínas bacterianas.

Na Tabela 3.4 são apresentados os valores médios da eficiência de expressão obtidos com todos os vetores e seus principais elementos constitutivos. Podemos observar que as construções que contém o gene *kan^r* apresentaram em média uma expressão 4,8 vezes maior daquela apresentada pelos vetores que contém o gene *amp^r*. As respectivas médias são as seguintes: $\bar{X}_{kan^r} = 61,1 \pm 14\%$ e $\bar{X}_{amp^r} = 12,8 \pm 28\%$. Confirmou-se também, como já observado, que os outros elementos analisados (promotor, *g10* e *g32*) não exerceram nenhuma influência significativa na expressão citoplásmica de taghPrl.

Tabela 3.4: Eficiência de expressão de taghPrl obtida com os vetores que utilizam o promotor λP_L e com o vetor de referência.

plasmídeo	promotor	<i>g10</i>	<i>g32</i>	Antibiótico	$\mu\text{g/mL A}_{600}$
<i>ptac-taghPrl</i> ①	<i>tac</i>	+	+	<i>kan^r</i>	52,4
<i>ptac I</i>	<i>tac</i>	+	-	<i>amp^r</i>	9,2
<i>pλP_L I</i>	λP_L	-	-	<i>amp^r</i>	16,3
<i>pλP_L II</i>	λP_L	+	-	<i>amp^r</i>	12,8
<i>pλP_L III</i>	λP_L	+	+	<i>kan^r</i>	69,6
<i>pλP_L IV</i>	λP_L	+	-	<i>kan^r</i>	61,4

① vetor de referência

3.6 Obtenção de taghPrl monomérica a partir de corpos de inclusão.

A partir dos corpos de inclusão citoplásmicos, obtidos com o vetor de referência na cepa HB2151, nos quais a atividade específica do hormônio era de aproximadamente 50 %, estudaram-se alguns processos pelos quais este hormônio poderia ser solubilizado, renaturado e purificado. Das metodologias descritas na literatura [10, 34, 47] para obtenção de prolactina monomérica a partir de corpos de inclusão, duas foram utilizadas nesse trabalho. Como descrito nos Métodos, uma metodologia prevê a solubilização dos corpos de inclusão mediante um detergente e a renaturação por diluição, na presença de oxigênio atmosférico. A outra é baseada na solubilização com uma solução contendo uréia e β -mercaptoetanol e a renaturação por diálise.

3.6.1 Metodologia de solubilização com detergente

O estudo foi iniciado com a metodologia de solubilização por ação do detergente N-laurilsarcosina. Após análises qualitativa e quantitativa de cada etapa deste processo, observou-se que a solubilização da taghPrl ocorria em grande parte na etapa que utilizava o deoxicolato de sódio. Este detergente aniônico, que é utilizado para solubilizar as proteínas bacterianas a serem descartadas [34, 57], solubilizou também grande parte da taghPrl.

Na Figura 3.21 observa-se a análise eletroforética dos produtos obtidos nas várias etapas do processo. As linhas 8 e 9 se referem a diferentes volumes da solução de deoxicolato que foi descartada nesta etapa, nos quais se encontra uma grande quantidade de taghPrl dissolvida. Se compararmos a

quantidade de taghPrl presente nos corpos de inclusão (linha 7) com a eliminada após tratamento com deoxicolato (linha 8), observamos que quase todo o produto estava sendo eliminado nesta etapa.

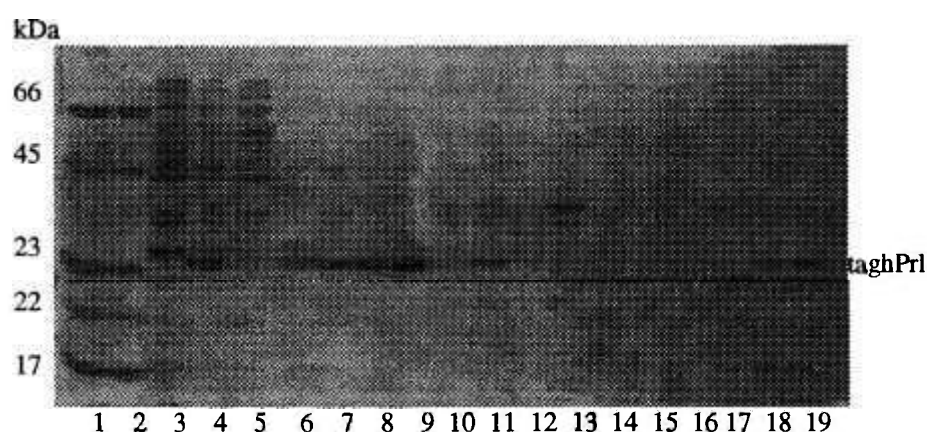


Figura 3.21: Análise em gel de poliacrilamida de taghPrl obtida nas etapas de solubilização e renaturação utilizando o método com N-laurylsarcosina. As quantidades aplicadas em cada linha são indicadas como porcentagens relativas ao total da cultura processada. Utilizou-se o vetor de referência na cepa HB2151.

1) e 2) marcadores de peso molecular (2,50 e 1,25 μ g); 3) lisado de cultura bacteriana sem ativação (0,13%); 4) lisado de cultura bacteriana ativada (0,13%); 5) sobrenadante do lisado bacteriano após centrifugação (0,5%); 6) e 7) corpos de inclusão (0,06% e 0,13%); 8) e 9) solução de deoxicolato a ser descartado (0,13% e 0,25%); 10) corpos de inclusão ressuspensos em água de lavagem (0,13%); 11) água de lavagem dos corpos de inclusão a ser descartada (2,5%); 12) taghPrl solubilizada com N-laurilsarcosina (0,15%); 13) precipitado obtido após solubilização e centrifugação (1,88%); 14) taghPrl renaturada (0,13%); 15) precipitado obtido após renaturação e centrifugação (7,5%); 16) a 18) produto final (0,13%, 0,25% e 0,63%); 19) repetição da amostra n.º 4 (0,06%).

Na Tabela 3.5 são apresentados os rendimentos aproximados de cada etapa do processo. Pode-se observar que houve também grandes perdas entre a etapa de lise bacteriana (linha 4) e o isolamento dos corpos de inclusão (linha 7).

Tabela 3.5: Recuperação de taghPrl nas etapas do processo de extração, solubilização e renaturação, utilizando o método de Luck e col. (1992).

Etapas	taghPrl (mg)	Recuperação relativa a quantidade inicial (%)
Lisado bacteriano	3,75	100
Corpos de inclusão	1,87	50
Lavagem com solução de deoxicolato	0,31	8,4
Lavagem com água	nd ^①	-
Produto solubilizado	nd	-
Produto final solubilizado e renaturado	0,24	6,4

① não detectável

3.6.2 Metodologia de solubilização com detergente, modificada

A partir destes resultados, após contatos pessoais com o Dr. Luck que sugeriu a omissão da etapa de solubilização das proteínas bacterianas com deoxicolato. Os resultados obtidos após a alteração da metodologia estão na Figura 3.22. Pode-se observar que não houve perdas significativas entre as etapas de extração dos corpos de inclusão e a solubilização com N-laurilsarcosina (linhas 7 e 10). A perda de taghPrl na etapa de lise também não foi observada neste experimento. O sobrenadante produzido após a lise e o isolamento dos corpos de inclusão foi concentrado por liofilização e o resultado está apresentado na linha 6. Na Tabela 3.6 estão relacionadas as etapas e as respectivas recuperações obtidas neste experimento, com uma recuperação final de 33 %, sem contaminação aparente de proteínas bacterianas.

A média da recuperação de taghPrl para dois experimentos realizados utilizando deoxicolato foi de $6,2\% \pm 0,3$ enquanto que sem a utilização deste composto foi de $27,5\% \pm 7,8$.

Tabela 3.6: Recuperação de taghPrI nas etapas do processo de extração, solubilização e renaturação, utilizando a metodologia sem o uso do deoxicolato de sódio.

Etapas	taghPrI (mg)	Recuperação relativa a quantidade inicial (%)
Lisado bacteriano	2,4	100
Corpos de inclusão	2,0	83,3
Lavagem com água	1,8	69,6
Produto final renaturado e solubilizado	0,8	33,3

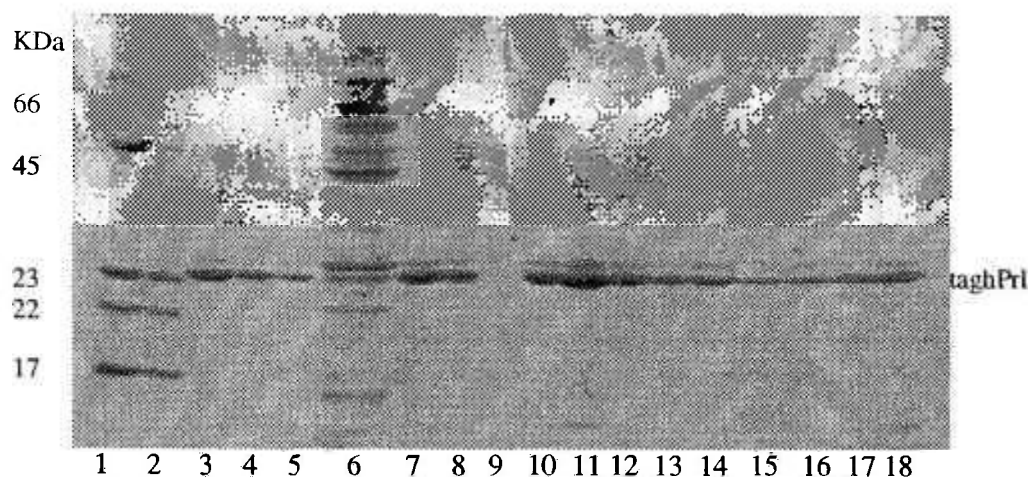


Figura 3.22: Análise em gel de poliacrilamida das etapas de solubilização e renaturação de taghPrI sem o uso do deoxicolato.

1) e 2) marcadores de peso molecular (2,50 e 1,25 μg); 3) a 5) lisado de cultura bacteriana ativada (0,12%, 0,06% e 0,03%); 6) sobrenadante descartado do lisado bacteriano após centrifugação e liofilização (50%); 7) e 8) corpos de inclusão (0,13% e 0,06%); 9) água de lavagem dos corpos de inclusão a ser descartada (2,5%); 10) e 11) taghPrI solubilizada com N-laurilsarcosina (0,15% e 0,3%); 12) e 13) precipitado obtido após solubilização e centrifugação (0,38% e 0,19%); 14) e 15) taghPrI renaturada (0,25% e 0,13%); 16) precipitado obtido após renaturação e centrifugação (descartado) (7,5%); 17) e 18) produto final (0,13% e 0,25%).

3.6.2.1 Análise qualitativa do produto obtido mediante solubilização com detergente

Considerando que a técnica de SDS-PAGE somente oferece uma avaliação muito aproximada quanto à qualidade de uma proteína, analisou-se o produto final também com outra metodologia. Esta metodologia utilizou uma coluna cromatográfica de exclusão molecular (Sephacryl S100), que possibilitou a avaliação da pureza da taghPrl e sua natureza monomérica ou polimérica.

O produto solubilizado e renaturado, segundo a metodologia de solubilização com detergente modificada, foi dialisado para a retirada do N-laurilsarcosina contra o tampão de eluição (bicarbonato de amônio 50 mM) e analisado nesta coluna cromatográfica. No perfil de eluição da amostra, apresentado na Figura 3.23, pode-se observar que praticamente toda a proteína se encontra na região do volume de exclusão molecular, tratando-se portanto, de algum tipo de complexo de alto peso molecular. Encontrou-se somente uma forma de baixo peso molecular em quantidade limitada, não havendo indicações da presença de taghPrl monomérica também por análise em SDS-PAGE.

3.6.2.1 Análise qualitativa do produto obtido mediante solubilização com detergente

Considerando que a técnica de SDS-PAGE somente oferece uma avaliação muito aproximada quanto à qualidade de uma proteína, analisou-se o produto final também com outra metodologia. Esta metodologia utilizou uma coluna cromatográfica de exclusão molecular (Sephacryl S100), que possibilitou a avaliação da pureza da taghPrI e sua natureza monomérica ou polimérica.

O produto solubilizado e renaturado, segundo a metodologia de solubilização com detergente modificada, foi dialisado para a retirada do N-laurilsarcosina contra o tampão de eluição (bicarbonato de amônio 50 mM) e analisado nesta coluna cromatográfica. No perfil de eluição da amostra, apresentado na Figura 3.23, pode-se observar que praticamente toda a proteína se encontra na região do volume de exclusão molecular, tratando-se portanto, de algum tipo de complexo de alto peso molecular. Encontrou-se somente uma forma de baixo peso molecular em quantidade limitada, não havendo indicações da presença de taghPrI monomérica também por análise em SDS-PAGE.

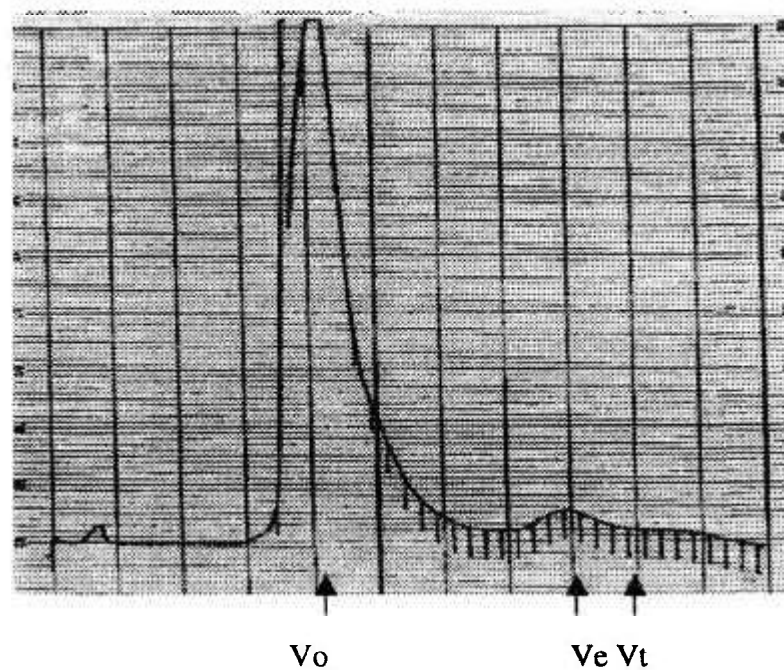


Figura 3.23: Perfil de eluição obtido em Sephacryl S-100 para a amostra purificada pelo método da N-laurilsarcosina, modificado. V_0 = volume de exclusão molecular (81,5 mL); V_t = volume total da coluna (186,5 mL); V_e = volume de eluição de uma forma de baixo peso molecular (166,5 mL).

3.6.3 Método de Paris: solubilização com uréia e renaturação mediante diálise prolongada

Em consequência dos resultados obtidos com o método de solubilização com N-laurilsarcosina, estudou-se outro método que utiliza uréia e β -mercaptoetanol na solubilização e denaturação. A renaturação foi feita por diálise prolongada contra uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM e, após a diálise, a amostra foi concentrada por liofilização.

A Tabela 3.7 apresenta as recuperações das etapas principais deste processo de obtenção de taghPrl monomérica. O rendimento final de 10,6% corresponde à forma monomérica eluída da coluna.

Tabela 3.7: Recuperação de taghPrl monomérica nas etapas principais da metodologia de Paris.

Etapas	taghPrl (mg)	Recuperação relativa à quantidade inicial (%)
Lise bacteriana	39,5	100
Renaturação	15	38
Produto eluído	4,2	10,6

O produto final deste processo foi analisado em Sephacryl-S100 sendo o perfil cromatográfico apresentado na Figura 3.24-A. Pode-se observar que existe um pico relativamente alto na região de exclusão molecular (V_0) e um pico menor com um volume de eluição de 111 mL. Observou-se em gel

de poliacrilamida que este pico menor correspondia à taghPrl. Considerando que a quantidade de prolactina aplicada na coluna foi de 6,4 mg e que a taghPrl eluída neste pico foi de 1,7 mg, a recuperação em forma monomérica correspondeu a 27%.

Com o intuito de verificar se a forma agregada havia se formado na coluna, a amostra de taghPrl purificada foi novamente aplicada na mesma coluna. O perfil de eluição está apresentado na Figura 3.24-B, no qual o volume de eluição de 114,7 mL corresponde à taghPrl. A quantificação da taghPrl por absorbância em 279 nm, antes e depois desta coluna, não indicou perdas significativas, demonstrando que a etapa cromatográfica não causa diretamente formação de agregados. O pico relativamente pequeno com volume de eluição de 82 mL, correspondente ao V_0 (Figura 3.24-B), foi provavelmente derivado de uma contaminação do agregado, presente na amostra aplicada.

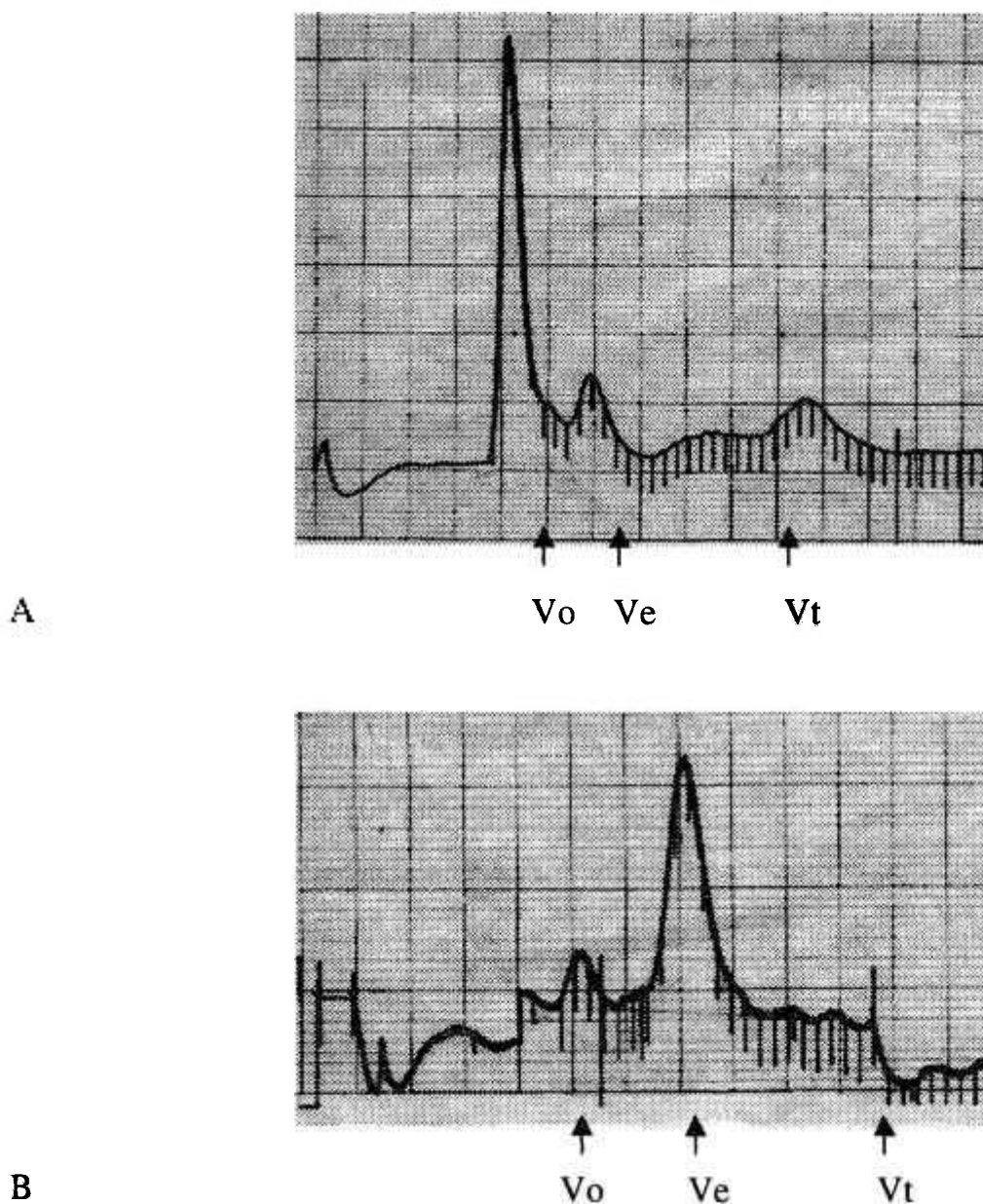


Figura 3.24: Perfil de eluição obtido em Sephacryl-S100 para a amostra de taghPrl, solubilizada com uréia e renaturada com diálise.

V_0 = volume de exclusão molecular (81 mL); V_t = volume total da coluna (186 mL); A – Separação cromatográfica de taghPrl aplicada em coluna após liofilização, ($V_e = 111$ mL); B – Repetição da separação cromatográfica utilizando a taghPrl obtida em “A” ($V_e = 114,7$ mL).

Após a constatação que a taghPrl não agregava devido à técnica cromatográfica, outro ponto estudado foi o efeito da liofilização. Como descrito na literatura o processo de liofilização pode levar a uma polimerização descontrolada das proteínas. Portanto, para avaliar este efeito, uma amostra não liofilizada, obtida mediante o mesmo processo descrito, foi aplicada na coluna, produzindo o perfil cromatográfico da Figura 3.25. Neste experimento a recuperação de taghPrl monomérica, embora não resolvida do primeiro pico foi de 37% (do aplicado na coluna). O produto final ficou muito diluído (0,05 mg/mL), porém permitiu aumentar de aproximadamente 10% o rendimento em forma monomérica.

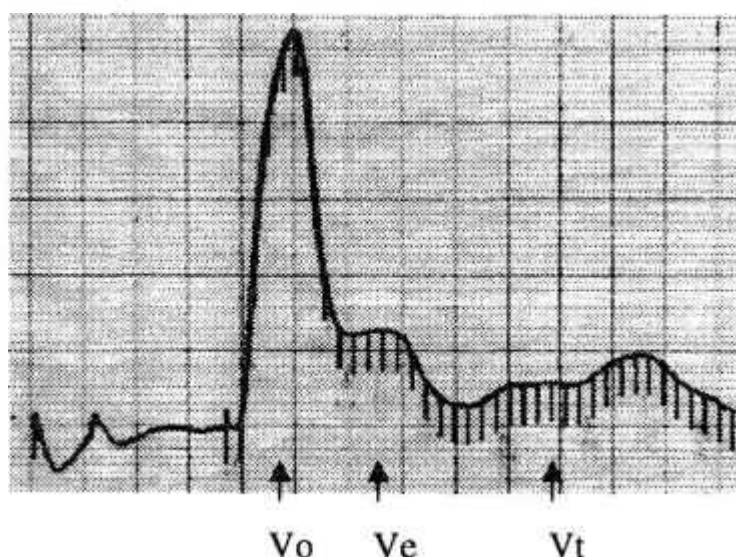


Figura 3.25: Perfil de eluição obtido em Sephacryl-S100 para a amostra solubilizada pelo método com uréia, sem a etapa de liofilização.

V_0 = volume de exclusão molecular (81 mL); V_t = volume total da coluna (186 mL); V_e = volume de eluição (121 mL).

3.6.4 Metodologia de solubilização com uréia, modificada

Em vista dos resultados obtidos após retirar a etapa de liofilização, que levaram a um aumento de 10 % na recuperação da forma monomérica e a um produto muito diluído, optou-se por iniciar o experimento com uma solução mais concentrada de taghPrl para compensar em parte a diluição subsequente. Esta concentração inicial foi de 3 a 5 vezes maior e possibilitou a aplicação na coluna de uma quantidade maior de taghPrl, com o mesmo volume.

Na Figura 3.26 está apresentado o perfil cromatográfico desta purificação, em que se observa aproximadamente a mesma área para o pico correspondente ao volume de exclusão molecular e o pico de taghPrl monomérica.

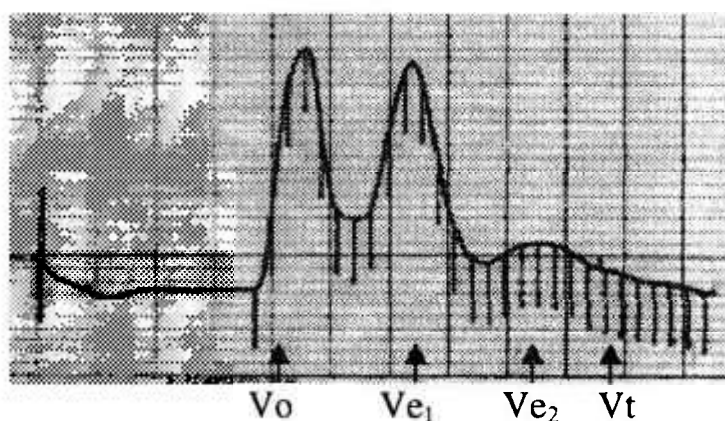


Figura 3.26: Perfil de eluição obtido em Sephacryl-S100 para a amostra solubilizada pelo método da uréia, modificado.

V_0 = volume de exclusão molecular (81 mL); V_t = volume total da coluna (186 mL); V_{e1} = volume de eluição da forma de peso molecular maior (118,5 mL); V_{e2} = volume de eluição da forma de menor peso molecular (156 mL).

Na Tabela 3.8 é apresentada a recuperação de taghPrl monomérica obtida pelo método de Paris com e sem liofilização e pelo método modificado. Pode-se observar que o processo de solubilização, utilizando uma amostra mais concentrada, não dificultou a ação solubilizante da uréia, tanto que a recuperação na forma monomérica de taghPrl foi aproximadamente 2 vezes maior, em relação aos rendimentos obtidos pelo método original. O rendimento final de todo o processo foi de $35,4 \pm 6,2$ % (n=4).

Tabela 3.8: Recuperação de taghPrl monomérica em Sephacryl-S100, utilizando diferentes estratégias baseadas no método de Paris.

Estratégia	taghPrl aplicada na coluna (mg)	taghPrl monomérica eluída (mg)	Recuperação de taghPrl monomérica (%)
Com liofilização	6,4	1,7	27
Sem liofilização	2	0,74	37
Sem liofilização, a partir de amostra concentrada	9	4,9	50

Os 2 picos eluidos da Sephacryl-S100 foram analisados em SDS-PAGE (Figura 3.27). Esta análise confirmou que a taghPrl eluiu em Ve_1 . Foram analisadas, também neste SDS-PAGE, as etapas de solubilização e renaturação.

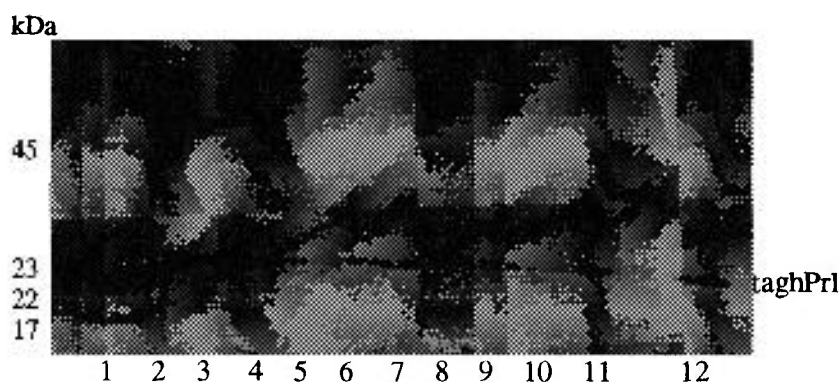


Figura 3.27: Análise em gel de poliacrilamida de taghPrl obtida nas etapas de solubilização, renaturação, purificação e nas frações eluidas da Sephacryl-S100, de acordo com a metodologia modificada.

1) marcadores de peso molecular ($2\mu\text{g}$); 2) lisado de cultura bacteriana ativada (0,13%); 3) taghPrl renaturada e dialisada (0,10%); 4) amostra 3 após centrifugação (0,10%); 5) precipitado obtido após renaturação e diálise (descartado) (0,76%); 6) amostra correspondente a V_0 ; 7) fração central correspondente a Ve_1 ; 8) fração central correspondente a Ve_2 ; 9) *pool* de todas as frações que compõem o Ve_1 ; 10) e 11) *pool* de Ve_1 , liofilizado, (0,459% e 1,38%); 12) produto solubilizado em 8 M de uréia (0,10%), antes da renaturação e diálise.

A Tabela 3.9 apresenta um exemplo relativo à recuperação das principais etapas deste processo, bem como a taghPrI eluída em V_0 e na forma monomérica. Pode-se observar que não há praticamente perda de taghPrI na região de alto peso molecular (0,7%).

Tabela 3.9: Recuperação de taghPrI dos corpos de inclusão, utilizando a metodologia em que a taghPrI está mais concentrada na etapa de solubilização com uréia, modificada.

Etapas	taghPrI (mg)	Recuperação relativa a quantidade inicial (%)
Lise bacteriana	29	100
Renaturação	24	82,8
Produto eluido em V_0	0,2	0,7
Produto eluido em V_{e1}	13	44,8

Para a determinação do peso molecular da taghPr1 na coluna de Sephacryl-S100, foi feita uma curva de calibração com os dados obtidos na eluição de 5 proteínas utilizadas como padrões. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.10.

Tabela 3.10: Volumes de eluição e seus respectivos K_d e $K_d^{1/3}$ obtidos com a eluição de 5 proteínas padrão da coluna de exclusão molecular.

Proteína	Volume de eluição (mL)	K_d ①	$K_d^{1/3}$	Peso molecular (kDa)
Citocromo	128.5	0.452	0.767	12,3
Mioglobina	118	0.352	0.706	17
hGH	112.2	0.298	0.668	22
Ovoalbumina	95	0.133	0.510	45
Soroalbumina bovina	89.7	0.083	0.436	66

①Considerando $V_o = 81$ mL e $V_t = 186$ mL

A curva de calibração, obtida em coluna de exclusão molecular, utilizada para a análise de taghPrl está apresentada na Figura 3.28. A curva foi calculada com os dados de $K_d^{1/3}$ e pesos moleculares apresentados na Tabela 3.10.

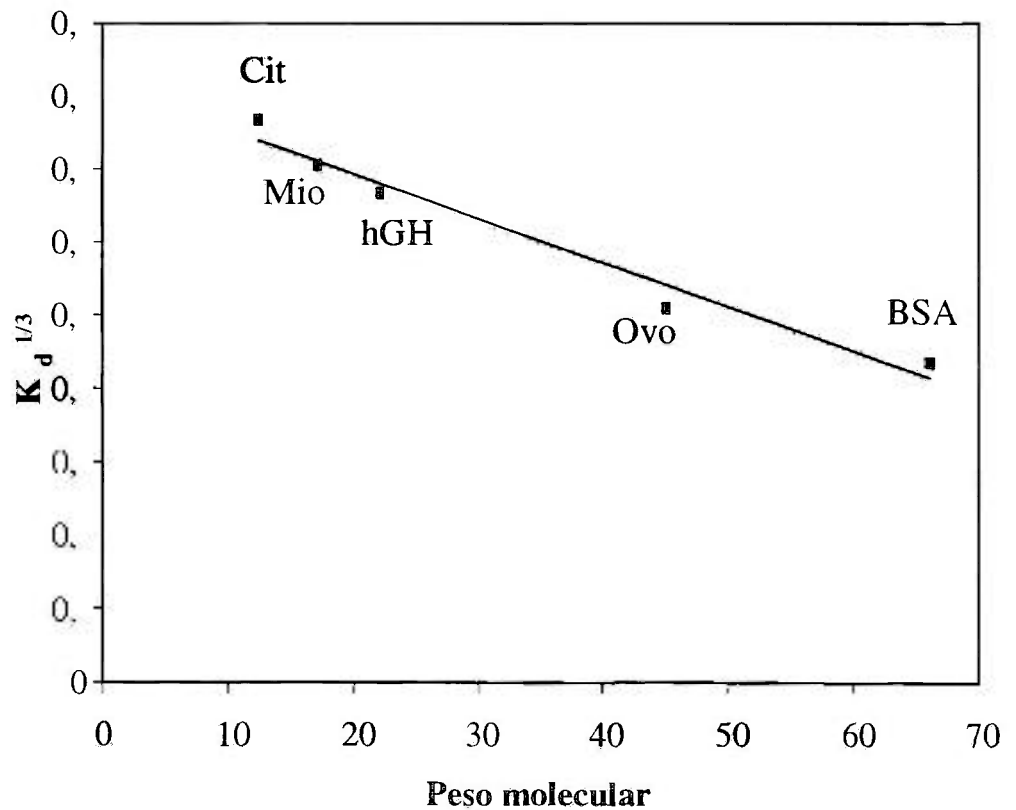


Figura 3.28: Curva de calibração obtida em uma coluna de Sephacryl-S100 (100x1,6 cm de diâmetro interno) equilibrada e eluída com tampão de bicarbonato de amônio 50 mM, pH = 7,0. Fluxo: 1 mL/min. Volume das frações: 5 mL. Equação da curva: $K_d^{1/3} = 0,8141 - 0,0061 \times PM$. Os padrões utilizados são os mesmos já apresentados na Tabela 3.10.

O rendimento final e o peso molecular da taghPrl correspondente a cada uma das análises cromatográficas em Sephacryl-S100, são reportados na Tabela 3.11.

Pode-se observar que há diferenças significativas nos valores dos pesos moleculares obtidos nos 4 experimentos. Este fato não foi observado em gel de poliacrilamida (Figura 3.27), onde a posição da taghPrl eluída nas separações cromatográficas correspondeu à mesma posição da taghPrl no lisado bacteriano. Os valores de peso obtidos indicam que se trata de uma forma monomérica. Não foi possível porém encontrar uma explicação que justificasse esta queda de peso molecular aparente para as amostras não liofilizadas.

Tabela 3.11: Recuperação final de taghPrI e peso molecular obtido nos experimentos que utilizaram diferentes estratégias baseadas no método de Paris.

Estratégia	Concentração de taghPrI/ mL de solubilizante (mg/mL)	Recuperação final (%)	$K_d^{1/3}$	Peso molecular ^① (kDa)
Com liofilização-A	0,16	10,6	0,659	25,6
Com liofilização-B ^②	-	-	0,685	21,3
Sem Liofilização	0,16	13,4	0,725	14,7
Sem liofilização, a partir de amostra concentrada	0,70±0,16 ^③	35,4±4,5 ^④	0,707±0,016	17,6 ±2,7

① Peso molecular (PM) calculado a partir da equação da reta

$$K_d^{1/3} = 0,8141 - 0,0061 \times PM$$

② Reaplicação da taghPrI monomérica obtida no procedimento com liofilização;

③ $X \pm DP$ (n = 2)

④ $X \pm DP$ (n = 4)

3.7 Determinação da bioatividade de taghPrl em cultura de células Nb2

Foi utilizada uma cultura de células Nb2 para avaliar a bioatividade da taghPrl em sua forma solúvel e renaturada, obtida a partir da metodologia de Paris modificada. Foram realizados 3 ensaios sendo que um está apresentado como exemplo na Figura 3.29. O ensaio indica que a taghPrl possui uma capacidade de proliferação celular semelhante à produzida por doses equivalentes de prolactina pituitária. A taghPrl, após todo o processo de extração, solubilização, renaturação e purificação adquiriu portanto uma conformação próxima à natural. A potência da taghPrl, com relação ao padrão internacional, cuja potência declarada é de 21,2 U.I./mg, resultou de $38,8 \pm 2,9$ U.I./mg, ($n = 3$ ensaios independentes).

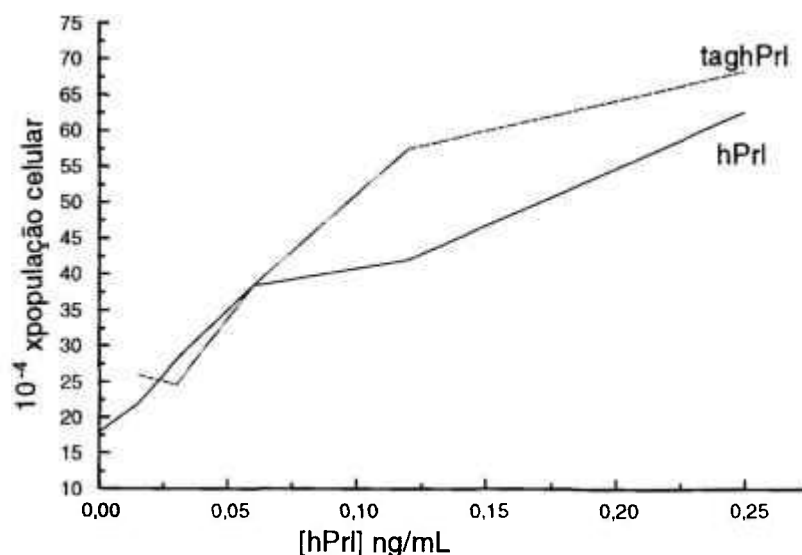


Figura 3.29: Curva dose resposta relativa ao crescimento de células Nb2 em meio de cultura contendo o padrão internacional de hPrl (WHO) e taghPrl obtida mediante a metodologia de solubilização com uréia, modificada.

4. Discussão

Neste trabalho analisou-se primeiramente a influência de alguns componentes estruturais de vetores procarióticos sobre o nível de expressão de taghPrl em corpos de inclusão bacterianos. Em uma segunda etapa estabeleceu-se uma metodologia de obtenção de taghPrl na sua forma monomérica a partir destes corpos de inclusão, resultantes da expressão citoplásmica do hormônio, em bactérias.

No primeiro estudo, sobre a eficiência de expressão de taghPrl, foram definidas as condições de ativação do promotor *tac* para uma melhor produção. A ativação do promotor *tac* na cepa HB2151 foi estudada relativamente à exoglucanase, proteína utilizada como referência de expressão, por ser uma proteína bacteriana e por ter sido utilizada pelos autores que construíram e otimizaram o funcionamento do vetor original. Nas condições estabelecidas neste trabalho, com uma otimização do tempo de cultivo e da concentração de IPTG utilizada, foi de fato obtida uma certa expressão de exoglucanase. Estas condições, aplicadas à expressão de taghPrl, propiciaram uma produção ainda maior, que pode chegar, em biorreator, até cerca de 1g/L.

Neste estudo de otimização da expressão houve a necessidade de se estudar a expressão de taghPrl também na cepa RRI, pois o estudo dos constituintes de um vetor seria feito com um vetor contendo o promotor λP_L e este vetor $p\lambda P_L$ só pode ser utilizado em cepa RRI. Como já mencionado pela literatura [35], podem ocorrer variações na expressão de proteínas recombinantes dependendo da cepa bacteriana utilizada. Utilizando o promotor *tac* com a cepa RRI constatou-se uma marcada redução na expressão de

taghPrl em relação à cepa HB2151. A porcentagem de taghPrl produzida em relação à quantidade de proteína bacteriana (40%) foi da mesma ordem nas duas cepas (HB2151 e RRI), sugerindo a existência de um limite de atividade específica para esta proteína heteróloga no citoplasma bacteriano.

Estabelecidas as condições ideais de expressão e com os resultados obtidos na produção de taghPrl pelo vetor ptac-taghPrl nas duas cepas utilizadas, foi realizado o estudo dos componentes do vetor que podem influir na eficiência de expressão de uma proteína recombinante, uma vez fixado o promotor λP_L . Foi feita a expressão de taghPrl no vetor $p\lambda P_L I$, que contém, além do promotor λP_L , o gene *amp^r* e houve baixa expressão. A seqüência *g10* do bacteriófago T7 foi inserida no vetor $p\lambda P_L I$ obtendo-se o vetor $p\lambda P_L II$. A presença da seqüência *g10* não influenciou absolutamente na expressão. Os novos dados diferem dos estudos realizados por OLINS e col. (1989) com esta seqüência, na expressão de diferentes proteínas em *E. coli*, que mostraram um incremento de expressão de 40 a 340 vezes para proteínas heterólogas, enquanto que para duas proteínas de *E. coli* o incremento foi somente de 1,6 a 12 vezes. Os resultados obtidos no presente trabalho são semelhantes aos encontrados por LEHMEIER e AMANN (1992), que não obtiveram aumento na expressão de duas proteínas humanas comparando vetores com e sem a seqüência *g10*. Estes autores estudaram a expressão em biorreator e a produção das proteínas que tiveram um incremento de expressão devido à seqüência *g10*, foi de 5 a 20 mg/L, enquanto que em nosso caso a produção chegou a 400 mg/L já em erlenmayer. Esta expressão é bem maior daquela geralmente descrita para prolactina em bactérias (Tabela 1.1).

A influência do terminador de transcrição *g32* também foi praticamente nula em nosso caso, quando compararam-se os vetores *pλP_L III* e *pλP_L IV*. Apesar de não terem sido encontrados trabalhos que fizessem um estudo sobre a influência do *g32* na expressão em bactéria, KRISCH and ALLET (1982) propuseram que esta seqüência estabilizaria o mRNA, na expressão do gene *lacZ*.

Um elemento que, neste estudo, apresentou uma influência altamente significativa e inesperada foi o gene que confere resistência à canamicina. A produção de *taghPrl* pelos vetores *pλP_L III* e *IV*, os dois contendo este gene, foi da mesma ordem que a produção do vetor de referência na cepa RRI. A eficiência de expressão de *taghPrl* pelo vetor *pλP_L IV* (com o gene *kan^r*) foi aproximadamente 6 vezes maior em relação ao vetor *pλP_L II*, em todo idêntico, mas com o gene *amp^r* no lugar do *kan^r*.

Em virtude dos resultados obtidos na expressão de *taghPrl* pelo vetor de referência e pelo *pλP_L III*, que só diferem no tipo de promotor, fica confirmada a designação de promotores de alta eficiência, feita por GRAHAM e col. (1995) para o *tac* e por SONG e col. (1988) para o *λP_L* não tendo sido encontrada, em nosso caso, diferença significativa entre os dois promotores. Os dados de DEUSCHLE e col. (1986), que obtiveram uma expressão duas vezes superior com o promotor *λP_L* em relação ao *tac* não foram confirmados neste trabalho. A confirmação de que a eficiência dos promotores *λP_L* e *tac* é da mesma ordem, resultou também de análise dos dados obtidos com os vetores *pλP_L II* e *ptac I*. Embora a eficiência tenha sido baixa em ambos, não houve diferença significativa entre a expressão dos dois.

Os vetores *pλP_L I*, *pλP_L II* e *ptac I*, todos contendo o gene de resistência à ampicilina, tiveram a mesma ordem de expressão de taghPrl. Esta expressão foi quase 1/5 da expressão dos vetores com o gene *kan^r*, em cepas RRI.

O vetor *ptac I*, que apresentou a mais baixa eficiência entre os 5 vetores, possui o gene de resistência à ampicilina que, como observado para os vetores da série *pλP_L*, leva a uma produção menor de taghPrl. Este vetor contém a seqüência do repressor *lacI^q* só no cromossomo bacteriano. Embora o produto deste gene só atue como repressor, ocorreu a hipótese de que esta seqüência, uma vez inserida no vetor, poderia atuar positivamente na expressão de taghPrl. Estudos feitos por AMANN e col. (1988) comparando a expressão da proteína cat em vetores com e sem o gene *lacI^q* verificaram porém que a expressão da proteína, quando induzida por IPTG, era idêntica nos dois casos. Estes autores, também, observaram que o nível basal de expressão (sem indução) em experimentos sem esse gene era o mesmo daquele obtido com indução. Isto, na prática, também acontece em nosso caso. O trabalho de HANKS e col. (1989), na expressão de prolactina de galinha, confirmou os resultados de AMANN e col. (1988), pois estes autores utilizaram um vetor de expressão sem esta seqüência, só contendo-a no cromossomo bacteriano e observaram, em Western blotting, que havia a mesma expressão de prolactina no vetor sem ativação.

Como já mencionado anteriormente, a utilização de proteínas recombinantes produzidas no citoplasma em corpos de inclusão requer etapas subseqüentes de solubilização e renaturação. Utilizando a metodologia de Luck e col., para solubilizar e renaturar os corpos de inclusão de taghPrl, foi observado que o deoxicolato de sódio solubilizava a taghPrl, juntamente com

as proteínas bacterianas, levando a baixíssimos rendimentos. Esta extração de proteínas bacterianas, também foi utilizada por SONG e col. (1988), para prolactina de salmão, não tendo sido feito um estudo comparativo de solubilização entre as proteínas bacterianas e a proteína de interesse. Este estudo foi feito pelo mesmo Luck na eliminação de impurezas nos corpos de inclusão compostos por uma forma de prolactina bovina sem a alça central, em que esta foi solubilizada. Em nosso caso a retirada do deoxicolato possibilitou um incremento na recuperação de taghPrl de 6,4% para 27%.

LUCK e col (1989 e 1991) porém demonstraram a obtenção de prolactina monomérica somente mediante análise por SDS-PAGE sem redução, não realizando outra análise qualitativa. Utilizando uma metodologia mais sensível às alterações de tamanho molecular, a cromatografia de exclusão molecular, observamos que o nosso produto final permanecia todo agregado.

O produto obtido neste trabalho utilizando a metodologia de Paris, mostrou assim, pela primeira vez, uma porcentagem considerável de prolactina monomérica que não tinha sido observada com outros métodos. A obtenção de um produto mais concentrado antes da etapa cromatográfica, para evitar o processo de liofilização, levou a rendimentos ainda maiores em taghPrl monomérica. Esta metodologia propiciou rendimentos maiores também nas etapas de lise bacteriana e de renaturação. Nossa recuperação total de 34%, em todo o processo de solubilização e renaturação de prolactina em corpos de inclusão, é bem superior aos valores de 5 – 15 % geralmente encontrados na literatura [47, 61].

O peso molecular por nós encontrado para a taghPrl está infelizmente muito abaixo do esperado e não conseguimos encontrar uma justificativa para isto, a não ser uma alteração conformacional capaz de influenciar as propriedades hidrodinâmicas da molécula, devida ao número e tipo de tratamentos aos quais a taghPrl foi submetida. Também estudos realizados utilizando HPLC de exclusão molecular não levaram a resultados melhores. Ressaltamos por outro lado que PARIS e col., utilizando o mesmo tipo de coluna cromatográfica, não realizaram a determinação nem do peso molecular, nem da porcentagem de prolactina monomérica obtida por meio do processo por eles padronizado.

A renaturação da taghPrl e sua correta estrutura terciária foram finalmente confirmadas pelo ensaio de proliferação em células Nb2, em que a atividade do nosso produto resultou superior, a do Padrão Internacional de hPrl pituitária e da mesma ordem daquela já descrita para a taghPrl periplásmica [41, 42].

5. Conclusões

Foram estudados vetores que, nas cepas bacterianas HB2151 e RRI, são capazes de produzir uma forma imunologicamente ativa de prolactina em níveis extremamente altos e com ótima reprodutibilidade. Foi identificada a seqüência que é aparentemente responsável por estes altos níveis de expressão. A simples presença da seqüência do gene *kan^r* devido a mecanismos que ainda estamos investigando, proporciona uma expressão ~ 6 vezes maior à obtida na presença do gene *amp^r*. Este fato, não relatado na literatura, merece posteriores estudos, sua importância na produção biotecnológica sendo, obviamente, considerável. Alguns testes preliminares já realizados na ausência de antibióticos parecem de fato excluir que isto seria devido simplesmente ao tipo de antibiótico presente no cultivo. Finalmente foi padronizada uma técnica de solubilização e renaturação de taghPrl em corpos de inclusão com os maiores rendimentos já descritos e pela primeira vez capaz de fornecer um produto comprovadamente monomérico. Estes resultados indicam que a prolactina humana de origem citoplásmica, bacteriana, cujos níveis de expressão são notoriamente superiores aos periplásmicos, pode já ser considerada um produto potencialmente muito interessante para aplicações farmacêuticas.

6. Referências

- [1] AMANN, E.; BIRGIT, O. and ABEL, K-J. Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene*, v.69, p. 301-315, 1988.
- [2] BARTOLINI, P.; MORGANTI, L.; MURATA, Y.; RIBELA, M. T., SCHWARZ, I.; BELLINI, M. H. and SOARES; C. R. *Utilization radioimmunoassay reagents for pituitary hormones*. Developments in radioimmunoassay and related procedures, IAEA-SM-324/67 Vienna : 1992, p. 197-204.
- [3] BELIN, D.; MUDD, E. A.; PRENTKI, P.; YI-YI, Y. and KRISH, H. M. Sense and antisense transcription of bacteriophage T4 gene 32. *J. Mol. Biol.*, v. 194, p. 231-243, 1987.
- [4] BHAIRI, M. S. *Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biological systems*. California, USA : Calbiochem, 1997.
- [5] BOER, H. A.; COMSTOCK, L. J. and VASSER, M. The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , v. 80, p. 21-25, 1983.
- [6] BURNETTE, W. N. "Western Blotting": Eletrophoretic transfer of proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinate protein A. *Anal. Biochem.*, v. 112, p.195-203, 1981.
- [7] CLARK, E. De B. Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 9, p. 157-163, 1998.
- [8] CROWL, R. Expression of human interferon genes in *E. coli* with the lambda P_L promotor. *Methods Enzimol.*, v. 119, p. 376-383, 1986.
- [9] COOKE, N. E.; COIT, D.; SHINE, J.; BAXTER, J. D. and MARTIAL, J. A. Human prolactin: cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J. Biol. Chem.*, v. 256, n. 8, p. 4007-4016, 1981.

- [10] CUNNINGHAM, B. C.; HENNER, D. J. and WELLS, J. A. Engineering human prolactin to bind to the human growth hormone receptor. *Science*, v. 247, p. 1461-1465, 1990.
- [11] DALMORA, S.; OLIVEIRA, J. E.; AFFONSO, R.; GIMBO, E.; RIBELA, M.T.C.P. and BARTOLINI, P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. *J. Chromath. A*, v. 782, p. 199-210, 1997.
- [12] DEUSCHLE, U.; KAMMERER, W.; GENTZ, R. and BUJARD, H. Promoters of *Escherichia coli* : a hierarchy of *in vivo* strength. *EMBO J.*, v.5, n. 11, p. 2987-2994, 1986.
- [13] DOWER, J. W.; MILLER, J. F. and RAGSDALE, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage eletroporation. *Nucleic Acids Res.*, v. 16, n. 13, p. 6127-6145, 1988.
- [14] FISHER, B.E.; SUMMER, I. and GOODENOUGH, P. Isolation and renaturation of bio-active proteins expression in *Escherichia coli* a sinclusion bodies. *Anrneim.-Forsch./Drug Res*, v.42, n. 12, p. 1512-1515, 1992.
- [15] FISHER, B.E. Renaturation of recombinant proteins produced as inclusion bodies. *Biotech. Adv.*, v. 12, p. 89-101, 1994.
- [16] FU, J.; TOGNA, A. P.; SHULER, M. L. and WILSON, D. B. *Escherichia coli* host cell modifications in continuous culture affecting heterologous protein overproduction: A population dynamics study. *Biotechnol. Prog.*, v. 8, p.340-346, 1992.
- [17] FUTAMI, J.; TSUSHIMA, Y.; TADA, H.; SENO, M. and YAMADA, H. Convenient and efficient *in vitro* folding of disulfide-containing globular protein from crude bacterial inclusion bodies. *J. Biochem.*, v. 127, p. 435-441, 2000.
- [18] GERDING, J. J. T.; KOPPERS, A. HAGEL, P. and BLOEMENDAL, H. II. Effect of urea on the eye lens protein α -crystallin. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 243, p. 374-379, 1971.

- [19] GILBERT, M. S.; LOWRY, P. J.; CASTRO, M. G.; WOODS, R. J. and SAVVA, D. Expression and partial purification of human prolactin in *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, v. 23, n. 1, p. 107-114, 1991.
- [20] GOUT, P. W.; BEER, C. T. and NOBLE, R. L. Prolactin-stimulated growth of cell cultures established from malignant Nb2 rat lymphomas. *Cancer Res.*, v. 40, p: 2433-2436, 1980.
- [21] GRAHAM, R. W.; GREENWOOD, J. M.; WARREN, R. A; KILBURN, D. G. and TRIMBUR, D. E. The pTug A and pTug AS vectors for the high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene*, v. 158, p. 51-54, 1995.
- [22] HABENER, J.F. Genetic control of hormone formation. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W.; KRONENBERG, H.M. and LARSEN, P.R. *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia 9th ed. Jean D. Wilson, 1998, p. 11-42.
- [23] HANGEL, P.; GERDING, J. J. T.; FIEGGEN, W. and BLOEMENDAL, H. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 243, p. 366-373, 1971.
- [24] HANKS, M. C.; TALBOT, R. T. and SANG, H. M. Expression of biologically active recombinant-derived chicken prolactin in *Escherichia coli*. *J. Mol. Endocrinol.* v. 3, p. 15-21, 1989.
- [25] HIRAOKA, Y.; NOMATA, K.; TSUBOTA, N.; TANABE, K. and FUKASAWA, T. Efficient production of biologically active human prolactin in *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 81, p. 147-154, 1991.
- [26] KARATZAS, C. N.; GUÉMÉNÉ, D.; ZADWORNÝ, D. and KÜHNLEIN, U. Production and characterization of recombinant turkey prolactin. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 106 B (n. 2), p. 273-280, 1993.
- [27] KOSHLAND, D. and BOTSTEIN, D. Secretion of β -lactamase requires the carboxy end of the protein. *Cell*, v. 20, p. 749-760, 1980.

- [28] KRISCH, H. M. and ALLET, B. Nucleotide sequences involved in bacteriophage T₄ gene 32 translational self-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 79, p. 4937-4941, 1982.
- [29] KUNKEL, T. A Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 82, p. 488-492, 1985.
- [30] LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- [31] LEHMEIER, B. and AMANN, E. Tac promoter vectors incorporating the bacteriophage T7 gene 10 translational enhancer sequence for improved expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, v. 23, p. 153-165, 1992.
- [32] LUCK, D. N.; NGSEE, J. K.; ROTTMAN, F. M. and SMITH, M. Synthesis of bovine prolactin in *Escherichia coli*. *DNA*, v. 5, p. 21-28, 1986.
- [33] LUCK, D. N.; GOUT, P. W.; BEER, C. T. and SMITH, M. Bioactive recombinant methionyl bovine prolactin: structure-function studies using site-specific mutagenesis. *Mol. Endocrinol.*, v. 3, n. 5, p. 822-831, 1989.
- [34] LUCK, D. N.; GOUT, P. W.; SUTHERLAND, E. R.; FOX, K.; HUYER, M. and SMITH, M. Analysis of disulphide bridge function in recombinant bovine prolactin using site-specific mutagenesis and renaturation under mild alkaline conditions: a crucial role for the central disulphide bridge in the mitogenic activity of the hormone. *Protein Engng.*, v. 5, n. 6, p. 559-567, 1992.
- [35] MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Ver.*, v. 60, n. 3, p. 512-538, 1996.

- [36] MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. and SAMBROOK, J. *Molecular cloning-A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed. N Y: Cold Spring Harbor, 1989.
- [37] MARTSON, F. A. O. The purification of eucaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, v. 240, p. 1-12, 1986.
- [38] MARTSON, F. A. O. and HARLEY, D. L. Solubilization of protein aggregates. *Methods Enzimol.*, v. 182, p. 265-276, 1990.
- [39] MELI, R.; RASO, G. M.; BENTIVOGLIO, C.; NUZZO, I.; GALDIERO, M. and DI CARLO, R. Recombinant human prolactin induces protection against *Salmonella tyhimunum* infection in the mouse: role of nitric oxide. *Immunopharmacology*, v. 34, p. 1-7, 1996.
- [40] MORGANTI, L. *Produção de prolactina humana autêntica por técnicas de DNA recombinante*. São Paulo, 1993, Tese de Doutorado em Tecnologia Nuclear. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- [41] MORGANTI, L.; HUYER, M.; GOUT, P. W. and BARTOLINI, P. Production and characterization of biologically active Ala-Ser-(His)6-Ile-Glu-Gly-Arg-human prolactin (tag-hPrl) secreted in periplasmic space of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 23, p. 67-75, 1996.
- [42] MORGANTI, L.; SOARES, C. R. J.; AFFONSO, R.; GOUT, P. W. and BARTOLINI, P. Synthesis and characterization of recombinant, authentic human prolactin secreted into the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 27, p. 63-70, 1998.
- [43] NICOLL, C. S.; MAYER, G. L. and RUSSELL, S. M. Strutral features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocrinol. Rev.*, v. 7, n. 2, p. 169-203, 1986.
- [44] OHKUBO, T.; TANAKA, M.; NAKASHIMA, K.; SHIMADA, K.; SAITO, N. and SATO, k. High-level expression of biologically active chicken prolactin in *E. coli*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 105 A n. 1, p. 123-128, 1993.

- [45] OLINS, P. O and RANGWALA, S. H. A novel sequence element derived from bacteriophage T7 mRNA acts as an enhancer of translation of *lacZ* gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, v. 264, n. 29, p. 16973-16976, 1989.
- [46] O'NEILL, G.; GOH, S. H.; WARREN, R. A.; KILBURN, D. G. and MILLER Jr., R. C. Structure of the gene encoding the exoglucanase of *Cellulomonas fimi*. *Gene*, v. 44, p. 325-330, 1986.
- [47] PARIS, N.; RENTIER-DELRUE, F.; DEFONTAINE, A.; GOFFIN, V.; LEBRUN, J. J.; MERCIER, L. and MARTIAL, J. A. Bacterial production and purification of recombinant human prolactin. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v. 12, p. 436-449, 1990.
- [48] PATTERSON, T. A.; COSTATINO, N.; DASGUPTA, S. and COURT, D. L. Improved bacterial host for regulated expression of genes from λP_L plasmid vector. *Gene*, v. 132, p. 83-87, 1993.
- [49] RICHARDS, S. M.; GARMAN, R. D.; KEYES, L.; KAVANAGH, B. and MCPHERSON, J. M. Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. *Cell Immunol.*, v. 184, p. 85-91, 1998.
- [50] RUDOLPH, R. and LILIE, H. *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB*, v. 10, p. 49-56, 1996.
- [51] SANGER, F.; NICKLEN, S. and COULSTON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- [52] SHINE, J. and DALGARNO, L. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 71, n. 4, p. 1342-1346, 1974.
- [53] SONG, S.; TRINH, K. Y.; HEW, C. L.; HWANG, S. J.; BELKHODE, S. and IDLER, D. R. Molecular cloning and expression of salmon prolactin cDNA. *Eur. J. Biochem.*, v. 172, n. 2, p. 279-285, 1988.

- [54] STARK, G. R. Modification of proteins with cyanate. *Methods Enzimol.*, v. 24, p. 579-584, 1998.
- [55] STRYER, L. *Biochemistry*, 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1996
- [56] SWENNEN, D.; RENTIER-DELRUE, F.; AUPERIN, B.; PRUNET, P.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S. E.; LION, M. and MARTIAL, J. A. Production and purification of biologically active recombinant tilapia(*Oreochromis niloticus*) prolactins . *J. Endocrinol.*, v. 131, p. 219-227, 1991.
- [57] THATCHER, D. R. and HITCHCOK, A. Protein folding in biotechnology. In: PAIN, R. H. *Mechanisms of protein folding*. Great Britain 1st ed. Oxford University Press, 1996. p. 229-254.
- [58] UFEARO, C. S. and ORISAKWE, O.E. Restoration of normal sperm characteristics in hypoprolactinemic infertile men treated with metoclopramide and exogenous human prolactin. *Clin. Pharmacol. Therap.*, v. 58, p. 354-359, 1995.
- [59] WILLIMS, C. F. and LIVINGSTONE, V. Infant insufficient milk syndrome associated with maternal postpartum hemorrhage. *J. Hum. Lact.*, v. 11; p. 123-126, 1995.
- [60] WOODY , M. A.; WELNIAK, L. A.; SUN, R.; TIAN, Z. G.; HENRY, M.; RICHARDS, S.; RAZIUDDIN, A.; LONGO, D. L. and MURPHY, W. J. Prolactin exerts hematopoietic growth-promoting effects *in vivo* and partially counteracts myelosuppression by azidothymidine. *Experimental Hematology*, v. 27, p. 811-816, 1999.
- [61] YAMAMOTO, M.; HARIGAYA, T., ICHIKAWA, T.; HOSHINO, K.; NAKASHIMA, K. Recombinant mouse prolactin: expression in *Escherichia coli*, purification and biological activity. *J. Mol. Endocrinol.*, v. 8, p. 165-172, 1992

- [62] YONEDA, N.; IRAHARA, M.; SAITO, S.; UEMURA, H. and AONO, T. Usefulness of recombinant human prolactin for treatment of poor puerperal lactation in a rat model. *Eur. J. Endocrinol.*, v. 133, p. 613-617. 1995.
- [63] ZAHA, A. *Biologia molecular básica*. 1st ed., Rio Grande do Sul, Mercado Aberto , 1996.
- [64] ZELLWEGER, R.; WICHMANN, W.; AYALA, A.; DE MASO, C. M. and CHAUDRY, I. H. Prolactin administration following hemorrhagic shock improves macrophage cytokine release capacity and decreases mortality from subsequent sepsis. *J. Surg. Res.*, v. 63, p. 53-58, 1996.