AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE CULTIVO NA EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE INTERESSE TERAPÊUTICO NO
ESPAÇO PERIPLÁSMICO BACTERIANO, UTILIZANDO O PROMOTOR
LAMBDA PL**

Fernanda dos Santos Arthuso Perez

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

**Orientador:
Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares**

**São Paulo
2015**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE CULTIVO NA EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE INTERESSE TERAPÊUTICO NO
ESPAÇO PERIPLÁSMICO BACTERIANO, UTILIZANDO O PROMOTOR
LAMBDA PL**

Fernanda dos Santos Arthuso Perez

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

**Orientador:
Prof. Dr. Carlos Roberto Jorge Soares**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2015

Dedico este trabalho

Aos meus pais, **Leda Gonçalves dos Santos Arthuso** e **Rubens Arthuso** por todo amor, carinho e compreensão, durante toda a minha jornada até aqui.

Ao meu irmão **Rafael** por ser o meu orgulho e por seu amor incondicional.

Ao meu marido e melhor amigo **Leandro**, por todo amor, por estar ao meu lado durante toda essa jornada.

*“Aos outros, dou o direito de ser como são.
A mim, dou o dever de ser cada dia melhor.”*
Chico Xavier

*“Life doesn’t get easier or more forgiving,
we get stronger and more resilient.”*
Steve Maraboli

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Roberto Jorge Soares, pela oportunidade, orientação e ensino.

Ao Dr. Paolo Bartolini, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho.

Aos meus pais e ao meu marido pela compreensão, carinho, ajuda e apoio durante toda essa jornada, por estarem sempre ao meu lado nesta caminhada, por me mostrarem a luz quando eu enxerguei escuridão, por me levantarem quando eu caí, por estarem sempre comigo, o meu sincero obrigada.

À toda minha família, por todos os bons momentos e por acreditarem em mim.

À Miriam, por tudo que me ensinou, ajudou, por todos os bons momentos que passamos juntas.

Ao João Ezequiel por toda a ajuda, apoio técnico e dedicação para podermos visualizar e purificar o interferon.

Ao amigo Junqueira, por todas as boas conversas e conselhos.

Aos amigos, José Maria, Dra. Maria Teresa, Dra. Cibele, Dr. Daniel Perez, Dr. Nélío, Dra. Regina e Dra. Juliana Branco, por toda a ajuda na realização deste trabalho, colaboração, e apoio.

Às minhas queridas amigas Renata, Beatriz e Geyza por estarem comigo desde o início, na época da iniciação científica, por todas as risadas, choros, conselhos, enfim, por tudo, obrigada.

Aos amigos, Eliza, Claudia, Eliana, Flávia, Ivete, Thaís, Roberto, Flávio, Marina e Patricia pela amizade e bons momentos que passamos juntos.

A todos os funcionários do Centro de Biotecnologia que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao CNPq, pela concessão de recursos financeiros.

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE CULTIVO NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE INTERESSE TERAPÊUTICO NO ESPAÇO PERIPLÁSMICO BACTERIANO, UTILIZANDO O PROMOTOR LAMBDA P_L

Fernanda dos Santos Arthuso Perez

Resumo

O sistema de expressão baseado nos promotores P_L ou P_R do fago lambda que usualmente é regulado pelo repressor termo lábil (clts) é amplamente utilizado para produzir proteínas recombinantes em células procarióticas. No entanto, o aumento da temperatura requerido neste sistema para promover a inativação do repressor apresenta algumas limitações, como o aumento da expressão de proteínas de HSP (*Heat Shock Proteins*), por exemplo, proteases, que dependendo da natureza da proteína expressa podem ser prejudiciais ou não. Uma outra limitação é a ativação da resposta SOS, resultando na parada da replicação do DNA celular ou dependendo da cepa pode ocorrer lise celular. Nesse trabalho nós descrevemos o uso do promotor λP_L para expressão constitutiva, isto é, sem a regulação do repressor. Nós otimizamos diferentes condições de cultura para aumentar a secreção no espaço periplásmico de *Escherichia coli* de cinco proteínas: o hormônio do crescimento humano (hGH), que tem sido amplamente utilizado no tratamento de crianças com deficiência e/ou resistência ao hGH, síndrome de Turner, entre outras desordens; prolactina humana (hPRL), um hormônio polipeptídico conhecido por estimular a lactação e por exercer ação regulatória no crescimento e na diferenciação da glândula mamária, dois antagonistas de hPRL, estudados como potenciais fármacos para o tratamento de alguns tipos de cânceres e por fim o interferon α2a (IFN-α2a), que é uma citocina produzida pelas células, em resposta a diferentes estímulos, incluindo ácidos nucleicos virais, células estranhas (particularmente as neoplásicas), antígenos de bactérias, protozoários e vírus. No caso do IFN-α2a, essa citocina de alto valor agregado e de importante aplicação terapêutica, foi desenvolvida em nosso laboratório como parte desse trabalho, incluindo o desenvolvimento e a validação da metodologia de análise por HPLC de fase reversa para determinação do IFN presente no fluído periplásmico bacteriano ou na sua forma pura. As principais estratégias utilizadas para melhorar a expressão foram iniciar a indução junto à densidade óptica máxima do crescimento bacteriano e otimizar a temperatura de indução para controlar a expressão da proteína heteróloga. Essa metodologia pode ser utilizada nos casos onde o produto não será tóxico para a célula hospedeira ou quando a instabilidade do plasmídeo não é problema. A possibilidade de cultivo em temperaturas mais baixas, já que o repressor termo-sensível não se encontra presente, colaborou para o aumento significativo da expressão, mesmo para proteínas menos sensíveis à temperatura de cultivo, como o hGH.

INFLUENCE OF THE CULTIVATION TEMPERATURE ON THE EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEINS OF THERAPEUTIC INTEREST IN THE PERIPLASMIC SPACE, USING LAMBDA P_L PROMOTER

Fernanda dos Santos Arthuso Perez

Abstract

The expression system based on the P_L or P_R promoters of the lambda phage that is usually regulated by the term labile repressor (cits) is widely used to produce recombinant proteins in prokaryotic cells. However, the temperature increase required in this system to promote the repressor inactivation shows some limitations, like the increase of the HSP (Heat Shock Proteins) proteins expression, proteases e.g., that depending on the nature of the expressed protein can be harmful or not. Another limitation is the activation of SOS response, resulting on the stop of the DNA cell replication or depending on the strain can occur cell lysis. In this paper we describe the use of the λP_L promoter for constitutive expression, without the repressor regulation. We optimized different cultivation conditions to increase the secretion in the periplasmic space of *Escherichia coli* of five proteins: the human growth hormone (hGH), that is being widely used in the treatment of children with disabilities and/or resistance to hGH, Turner syndrome, within another disorders; human prolactin (hPRL), a polypeptide hormone known for stimulating the lactation and for exercising regulatory action on growth and on the differentiation of the mammary gland; two hPRL antagonists, studied as potential medicine to the treatment of some kinds of cancers and finally the interferon α2a (IFN-α2a), that is a cytokine produced by the cells, in response to different actions, including viral nucleic acids, neoplastic cells, antigens of bacteria, protozoa and viruses. In the case of IFN-α2a, this high value added and important therapeutic application, was developed in our laboratory as a part of this paper, including the development and the validation of the analysis methodology by reversed-phase HPLC to determine the IFN present in the bacterial periplasmic fluid or in its pure form. The main strategies used to improve the expression were to start the induction with the maximum optical density of bacterial growth and optimize the induction temperature to control the expression of heterologous protein. This methodology can be used in cases where the product won't be toxic to the host cell or when the instability of the plasmid is not a problem. The possibility of cultivation in lower temperatures, since the heat-sensitive repressor is not present, contributed to the significant increase of the expression, even to proteins that are less sensitive to the cultivation temperature, like the hGH.

Lista de Abreviaturas

clts – repressor termo sensível do promotor de bacteriófago lambda (λ)

CRS – Chemical Reference Standard

Da – Dalton

DsbA – peptídeo sinal da proteína DsbA, uma proteína periplásmica de *Escherichia coli* com 21 kDa

E.coli - *Escherichia coli*

hGH – hormônio de crescimento humano

hPRL – prolactina humana

HPSEC – cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular

kDa – kilodalton

LB – Luria Bertani

λP_L - promotor originário do bacteriófago Lambda

P37 – Preparação de referência interna de hPRL recombinante produzida no espaço periplásmico bacteriano

PBS – tampão fosfato salina

RP-HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

SD – shine dalgarno

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

UV – luz ultravioleta

WB – western blotting

WHO – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Material	16
3.1.1 Equipamentos.....	16
3.1.1.1 Material plástico	17
3.1.1.2 Reagentes	18
3.1.1.3 Enzimas, Tampões e Marcador de número de pares de bases	19
3.1.2 Material para purificação e análise das proteínas	19
3.1.2.1 Colunas cromatográficas	19
3.1.2.2 Resinas cromatográficas.....	19
3.1.2.3 Padrões, antissoros e outros reagentes para SDS-PAGE e WB.....	20
3.2 Métodos.....	20
3.2.1 Construção dos plasmídeos.....	20
3.2.1.1 Plasmídeo para expressão de IFN- α 2a em <i>Escherichia coli</i>	20
3.2.1.2 Plasmídeo para expressão de IFN- α 2a cDNA-otimizado em <i>Escherichia coli</i>	23
3.2.2 Análise dos plasmídeos mediante gel de agarose	25
3.2.2.1 Purificação dos fragmentos.....	25
3.2.3 Transformação dos plasmídeos em bactérias <i>Escherichia coli</i>	25
3.2.4 Expressão em bactérias <i>Escherichia coli</i>	25
3.2.5 Purificação	27
3.2.5.1 Purificação do Interferon- α 2a	27
3.2.6 Caracterização físico-química	27
3.2.6.1 Análise por SDS-PAGE de amostras de choque osmótico.....	27
3.2.6.1.1 Revelação com <i>Comassie Brilliant Blue</i> G-250	28
3.2.6.2 Análise por Western Blotting.....	28
3.2.6.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC	29
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Construção do vetor para expressão do IFN- α 2a	31
4.1.1 Análise com enzimas de restrição.....	31

4.1.2	Interferon $\alpha 2a$ cDNA-otimizado	34
4.2	Análise de expressão das proteínas do estudo	37
4.2.1	Análise por SDS-PAGE de amostras de choque osmótico	37
4.2.2	Produtividade em função do momento de “ativação”	39
4.2.3	Estudo de expressão com diferentes temperaturas de “ativação”	40
4.2.3.1	Estudo de expressão com a cepa produtora de hPRL	40
4.2.3.1.1	Análise do lisado bacteriano da cepa produtora de hPRL	42
4.2.3.2	Estudo de expressão com a cepa produtora de G129R-hPRL e $\Delta 1-9$ G129R-hPRL	44
4.2.3.3	Estudo de expressão com a cepa produtora de hGH	48
4.2.3.3.1	Análise do lisado bacteriano da cepa produtora de hGH	51
4.2.3.4	Estudo de expressão com as cepas produtoras de IFN- $\alpha 2a$ e IFN- $\alpha 2a$ cDNA-otimizado	53
4.2.3.5	Análise por Western Blotting de amostras de choque osmótico do IFN- $\alpha 2a$	58
4.3	Purificação do interferon presente no fluído periplásmico	60
4.4	Determinação do IFN- $\alpha 2a$ no fluído periplásmico por RP-HPLC	65
5	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1 INTRODUÇÃO

O Grupo de Hormônios do Centro de Biotecnologia do IPEN entre suas pesquisas desenvolve a produção de hormônios recombinantes humanos, em escala laboratorial, a partir de bactérias (*Escherichia coli*) modificadas geneticamente. Os melhores resultados de expressão nesse hospedeiro foram obtidos utilizando o promotor λP_L e o peptídeo sinalizador DsbA, que possibilitam a secreção da proteína de interesse para o espaço periplásmico bacteriano. Sintetizada portanto na sua forma autêntica, ou seja, sem a metionina inicial (Soares, 2003; 2008).

Escherichia coli (*E. coli*) é um dos hospedeiros mais utilizados para a produção de proteínas heterólogas (Babaeipour, 2013). A escolha do sistema de expressão para *Escherichia coli* tem sido estudada exaustivamente por causa da sua importância na pesquisa e indústria (Menart, 2003). Muitas estratégias foram desenvolvidas para alcançar uma expressão de proteínas satisfatória (Makrides, 1996).

A expressão baseada no controle pelo promotor λP_L , regulado pelo repressor termo-sensível, é uma das mais usadas para produção de proteínas em larga escala utilizando *E. coli*. A indução térmica, característica desse promotor, apresenta uma grande vantagem sobre os indutores químicos como IPTG ou o ácido nalidíxico, que são caros e perigosos para os manipuladores e o meio ambiente. O promotor λP_L é ativado quando a temperatura de cultivo aumenta de 30 para 42 °C. Isso ocorre porque o repressor, uma proteína termo-sensível, é inativado a 42 °C, liberando a ação do promotor, o que habilita o início do processo de transcrição/tradução da proteína de interesse. Similar ao que ocorre com outros sistemas de expressão, a produção de proteínas heterólogas causa importante estresse e desequilíbrio metabólico. Por exemplo, a alta expressão de uma proteína recombinante pode desencadear uma vigorosa resposta similar ao choque térmico (*heat shock response*) e a resposta SOS, uma resposta global caracterizada pelo dano ao DNA, como a parada do ciclo celular, do reparo do DNA e indução de mutageneses, resultando em uma carga metabólica para as

células. Como consequência, a taxa específica do crescimento cai e pode ocorrer degradação do ribossomo e alterações no metabolismo do carbono. Juntos, esses efeitos podem alterar a quantidade e qualidade da proteína heteróloga produzida. Contudo, em contraste com os outros sistemas de expressão, a ativação por aumento de temperatura também dispara a resposta ao aquecimento *Heat Shock Response* (HSR). A HSR inclui uma rápida e seletiva síntese de proteínas (*Heat Shock Proteins* – HSP) imediatamente após o aumento de temperatura. Após isso, ocorre um período de adaptação com menor taxa de síntese de proteínas que mais tarde atinge um novo estado estacionário. As HSP atuam como chaperonas e proteases envolvidas no *folding*, na degradação e na regulação do *feed back* adequado da HSP.

Em adição à síntese das proteínas HSP, a resposta fisiológica de *E. coli* após o choque térmico, também ocorre diminuição temporária na taxa de crescimento e mudanças na membrana celular. Essas mudanças são resultantes da alteração da relação de lipídeos e proteínas de membrana (Valdez-Cruz, 2010). Assim, podemos resumir que o ponto crítico dessa metodologia, baseada na mudança de temperatura, está relacionado com os problemas comumente associados com a expressão de proteínas em temperaturas relativamente altas como, por exemplo, proteólise e agregação, que podem influenciar negativamente a produção de proteínas particularmente lábeis. Níveis elevados da expressão do hormônio de crescimento humano (hGH) foram obtidos no laboratório do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) utilizando um sistema baseado no promotor Lambda P_L (λ P_L) controlado pelo regulador termo-sensível clts, inicialmente com a utilização de uma sequência sinalizadora derivada do gene natural do hGH (Oliveira, 1999) que depois foi substituída pela sequência do DsbA, natural de bactérias (Soares, 2003). Observou-se que em temperaturas iguais ou abaixo de 37 °C a expressão de hGH é mínima, enquanto a 42 °C é de 1,8 µg hGH/mL/A₆₀₀ (Soares, 2008).

Considerando as limitações do uso do IPTG e a secreção periplásmica bem sucedida obtida com um vetor para expressão do hGH utilizando o promotor λ P_L e a cepa *E. coli* W3110, Soares e colaboradores (2008) decidiram utilizar este sistema para a secreção da prolactina humana (hPRL). Os resultados mostraram uma expressão muito baixa de hPRL (0,02 µg hPRL/mL/A₆₀₀). Soares e

colaboradores (2008) contornaram esse problema com a utilização do promotor λP_L como promotor constitutivo, ou seja, sem a presença da proteína repressora termo-sensível clts. Esse é um modelo de expressão bastante interessante, pois permite o funcionamento eficiente do promotor em temperaturas mais baixas de cultivo, o que aumenta a eficiência da expressão de proteínas como a hPRL, que se mostrou extremamente instável quando o cultivo bacteriano foi realizado com temperaturas superiores a 37 °C. Essa estratégia resultou em um aumento significativo na expressão da hPRL que passou para aproximadamente 1 μg hPRL/mL/A₆₀₀ (Soares, 2008).

O uso do promotor λP_L como vetor constitutivo já foi descrito na literatura (Menart, 2003; Valdez-Cruz, 2010). Esse método funciona nos casos onde o produto não é tóxico para a célula hospedeira ou quando a instabilidade do plásmídeo (segregacional ou estrutural) não interfere (Valdez-Cruz, 2010). Os resultados positivos com a expressão de hPRL no espaço periplásmico bacteriano, em nosso laboratório, abriram perspectivas de utilizar essa estratégia para a expressão de outras proteínas de interesse.

A questão abordada nesse trabalho é de otimizar e expandir essa metodologia aplicando-a na expressão de outras proteínas, incluindo aquelas que, como no caso do hGH, funcionaram de forma apropriada com o uso do promotor λP_L na presença do promotor termo-sensível. Como consequência disso, optamos também por desenvolver o mesmo sistema para obtenção de uma outra proteína de importante valor agregado e terapêutico, o interferon $\alpha 2a$ (IFN- $\alpha 2a$). Esse estudo se mostra bastante útil, tanto do ponto de vista tecnológico, consolidando o uso constitutivo do promotor λP_L na expressão de proteínas recombinantes, como do ponto de vista científico, fornecendo mais informações sobre a influência da temperatura de cultivo na expressão de proteínas recombinantes.

Proteínas analisadas

Hormônio do Crescimento Humano

O hormônio de crescimento humano (hGH) é um polipeptídeo expresso nas células somatotrópicas da glândula hipofisária anterior com massa molecular de 22.125 Da, formado por uma cadeia simples, composto por 191 aminoácidos e apresenta duas pontes dissulfeto intramoleculares. Contém quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfeto (Cis53-Cis165 e Cis182-Cis189) com duas alças correspondentes, uma maior e outra menor, apresenta vias de sinalização de *feedback* e neurotransmissores que regulam e modulam a sua secreção ao longo da vida, quer direta quer indiretamente (Alatzoglou, 2014).

O hormônio de crescimento (GH) é produzido e secretado especificamente pelas células somatotróficas da glândula pituitária anterior, e sua função mais importante é promover o crescimento linear, com ação sobre o metabolismo e sobre o crescimento longitudinal, estimulando a produção local e sistêmica do fator de crescimento semelhante à insulina – I (IGF-I) (Das, 1996; Alba, 2005). Esse hormônio pertence à família dos hormônios polipeptídicos estruturais, que são formados por uma série de moléculas regulatórias cuja função é transmitir informação específica entre células e órgãos, para o controle do crescimento, desenvolvimento, reprodução e manutenção da homeostase metabólica (Das, 1996).

O hGH tem sido utilizado para tratamento de crianças com deficiência do hormônio de crescimento, resistência ao hGH, crianças pequenas para a idade gestacional, insuficiência renal crônica, síndrome de Turner, e em adultos com deficiência de hormônio de crescimento ou síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Tritos e Mantzoros, 1998; Liberman e Cukier, 2004).

Dados da literatura indicam o seu uso em outras condições, como tratamento de fraturas ou displasias ósseas, queimadura de pele, crianças com baixa estatura idiopática, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Nooman, uso na corticoterapia crônica e em idosos (Soares, 2003).

Prolactina humana

A prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico conhecido por estimular a lactação e por exercer ação regulatória no crescimento e na diferenciação da glândula mamária (Sinha, 1995). Mais de 300 atividades biológicas foram atribuídas à PRL que podem ser subdivididas nas seguintes categorias: funções ligadas à reprodução; endocrinologia e metabolismo; controle e balanço de água e eletrólitos; crescimento e desenvolvimento; inteligência e comportamento; imunorregulação e proteção (Bole-Feysot, 1998; Goffin, 2002; Bernard, 2015). De forma autócrina e parácrina exerce atividades mitogênicas, morfogênicas e secretoras (Ben-Jonathan, 1996).

O gene que codifica a prolactina é único, sendo encontrado em todos os vertebrados, e, nos humanos, está localizado no cromossomo seis (Ormandy, 1997; Bernard, 2015). Possui também ação direta nos controles do ciclo e diferenciação celular e da apoptose (Walker, 2001; 2007). A hPRL madura consiste de uma simples cadeia protéica de 23 kDa, composta por 199 aminoácidos, incluídas seis cisteínas responsáveis por três pontes dissulfeto intramoleculares (4-11, 58-174, e 191-199), contém cinco éxons e quatro íntrons (Sinha, 1995).

Numerosas variantes da proteína prolactina foram identificadas no plasma e na glândula pituitária, muitas das quais são resultados de modificações pós-traducionais da proteína madura, incluindo a fosforilação, glicosilação, sulfatação e desamidação (Freeman, 2000; Bernard, 2015) aumentando desta forma o seu espectro de ação (Price, 1995).

A Figura 1 mostra algumas destas modificações em formato esquemático.

Figura 1: Diagrama esquemático da molécula de PRL e algumas das suas variantes estruturais (Sinha, 1995).

Essa proteína, quando expressa em células de mamíferos como, por exemplo, células lactotróficas da hipófise, apresenta um sítio de glicosilação único e parcialmente ocupado na Asn-31 (asparagina) com um alcance de ocupação de 10-30% de hPRL glicosilada (G-hPRL) em relação ao total de hPRL de qualquer origem, hipofisária ou recombinante (Price, 1995; Heller, 2010; Rodrigues Goulart, 2010).

A glicosilação é uma modificação pós-traducional que ocorre na maioria das proteínas secretadas por células de mamíferos. Pode acontecer ou no retículo endoplasmático, onde uma cadeia oligossacarídica é transferida para a proteína e se liga covalentemente a uma asparagina localizada na sequência do tripeptídeo Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina (Pro). Recebe então o nome de “glicosilação *N-linked*” (Figura 2), como no caso da prolactina humana (Asn 31), ovina, bovina e outras (Sinha, 1995), ou no Complexo de Golgi, em que a cadeia oligossacarídica se liga à serina (Ser) ou treonina (Thr), denominada “glicosilação *O-linked*”, como nos casos da prolactina de rato e peru (Sinha, 1995). Podem ainda ocorrer os dois tipos de glicosilação na mesma glicoproteína. As bactérias não são capazes de realizar modificações pós-traducionais complexas como a glicosilação e alguns sistemas eucariontes, como as leveduras apresentam um padrão de glicosilação bem diferente como estrutura com alta manose, por exemplo.

Figura 2: Transferência de oligossacarídeos Asparagina “N-linked” (Shelikoff, 1994).

O gene da prolactina, junto com o do hormônio de crescimento (GH) e o gene do lactogênio, são originários de um gene ancestral único, o que leva a PRL a apresentar uma alta similaridade estrutural e funcional com esses hormônios polipeptídicos (Goffin, 2005; Xu, 2013). Ambos (hPRL e hGH) são hormônios peptídicos, com uma massa molecular ligeiramente superior a 20 kDa que originam em grande parte da glândula hipofisária anterior, em seres humanos e em outros vertebrados. O hormônio do crescimento humano e a prolactina

humana compartilham de 16% de identidade na sua sequência de aminoácidos, são muito semelhantes topologicamente, e membros da família de citocinas classe I (Xu, 2013).

Dados da literatura indicam o potencial uso clínico da hPRL após transplante de medula óssea, por estimular a hematopoiese e a recuperação imune, ou na reversão da mielossupressão induzida por azidotimidina ou por terapias mielo-ablativas (Woody, 1999). Estudos indicam também sua potencial aplicação como agente imunoterápico nos casos de infecção por HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) (Richards, 1998). Evidências como a secreção e ação local da hPRL (efeito autócrino/parácrino) relacionam este hormônio com o desenvolvimento de câncer de mama e de próstata (Ginsburg e Vonderhaar, 1995; Reynolds, 1997; Llovera, 2000).

Mesmo sendo a maioria das aplicações da hPRL ainda em fase de estudo, o seu uso *in vitro* em laboratório de diagnóstico clínico é considerável. Isto justifica a relativa alta procura desse hormônio, cujo custo na forma altamente purificada, pode atingir o valor de US\$ 5.000/mg.

Antagonistas de hPRL

Pesquisas tendo por base a relação da PRL com diferentes tipos de câncer se voltaram para o desenvolvimento de antagonistas de PRL e sua potencial ação anti-cancerígena. Foram estudados, por dois grupos distintos, dois tipos de análogos-antagonistas. O primeiro é derivado dos conhecimentos relativos ao antagonista do hGH, onde a substituição do aminoácido glicina (Gly) 120 por outro, de maior tamanho e com carga positiva, a arginina (Arg), resulta em um impedimento estérico que não permite a ligação desse hormônio à segunda molécula do receptor (Fuh, 1992; Chen, 1995). A partir dessas considerações, sintetizou-se por analogia o antagonista G129R-hPRL (Goffin, 1994; Chen, 1999; Bernichtein, 2003). Um segundo antagonista foi estudado e desenvolvido por outros autores com base nos resultados relativos à isoforma de prolactina fosforilada, um antagonista natural presente numa proporção de 10-15% na hipófise humana (Walker, 1994). Este antagonista (S179D-hPRL) prevê a substituição da serina (Ser) 179, presente na quarta α -hélice da hPRL por aspartato (Asp) (Chen, 1998), sendo que o ácido aspártico aparentemente exerce

o mesmo impedimento estérico apresentado pela serina fosforilada. Os dois análogos antagonistas de hPRL demonstraram efeitos anti-tumorais *in vivo* (Xu, 2003; Chen, 2002) podendo, em futuro próximo, contribuir para o tratamento de câncer humano de próstata e mama.

Recentemente foi desenvolvido um antagonista “puro” o $\Delta 1-9$ G129R-hPRL, retirando os nove resíduos N-terminais do G129R-hPRL, que é um antagonista parcial de primeira geração. Os antagonistas de prolactina humana, que competem com os receptores de prolactina (PRLR) são uma nova classe de drogas potenciais, desenvolvidas para inibir a dimerização dos receptores nas patologias sensíveis a prolactina e que não podem ser tratadas com inibidores de hPRL. Patologias estas como os prolactinomas dopamina-resistentes (isto é, tumores da glândula pituitária de células secretoras de PRL), bem como o câncer da mama, câncer de próstata e hiperplasia benigna da próstata, em que a evidência para as ações de promoção de crescimento tumoral autócrino de PRL foram relatadas na últimas décadas (Jomain, 2007).

As propriedades antagonistas do $\Delta 1-9$ G129R-hPRL foram avaliadas por Ferraris e colaboradores (2013) usando um amplo painel *in vitro* e *in vivo*, envolvendo vários tipos de células (mama, próstata, pele, células neurais, etc.) de rato, camundongo ou de origem humana. Utilizando abordagens farmacológicas para conseguir inibir a sinalização dos receptores de prolactina, estes estudos demonstraram que a retirada dos nove resíduos N-terminais do G129R-hPRL removeu o agonismo residual desta proteína e que a mesma compete eficazmente com a PRL na ligação com o receptor de prolactina (Ferraris, 2013).

Interferon α -2a e Interferon α -2a cDNA-otimizado

Os interferons (IFNs) e os seus receptores são um subconjunto da classe 2 α de citocinas helicoidais que existiram em cordados primitivos e que datam de 500 milhões de anos (Pestka, 2004; 2007). Dez tipos de interferons foram descobertos em mamíferos, mas apenas sete são encontrados em seres humanos: α , β , ϵ , κ , ω , ν e γ (Pestka, 2007).

Alick Isaacs e Jean Lindenmann em 1956 estudaram o fenômeno da ação viral, onde células expostas a um vírus, quando subsequentemente expostas a esse mesmo vírus se tornaram resistentes. Com observações detalhadas desse

efeito, perceberam que o mesmo poderia ser transferido, movendo o fluido da cultura onde essas células estavam expostas ao vírus para novas culturas, esse efeito também foi transferido, nomearam essa atividade de interferência viral de “interferon” (Pestka, 1983).

Os interferons são citocinas produzidas pelas células, em resposta a diferentes estímulos, como ácidos nucléicos virais, células estranhas (particularmente as neoplásicas), antígenos de bactérias, protozoários e vírus. Apresentam ação antiviral, imunomoduladora e antiproliferativa, que influenciam o metabolismo, crescimento e diferenciação das células (Baron, 1992; Pfeffer, 1998, Alcamí, 2003).

Os interferons humanos foram inicialmente classificados como: de leucócito (L), de fibroblasto (F), e imuno (I); em nomenclatura proposta posteriormente passaram a ser classificados como α , β e γ , respectivamente (Pestka, 1983). Posteriormente foram divididos em dois tipos: Tipo I (α e β) e Tipo II (γ) (Pestka, 2007). Os interferons do tipo I, alfa e beta, são produzidos pelos leucócitos e fibroblastos, respectivamente, possuem uma atividade antiproliferativa e imunomoduladora em vários tipos celulares, enquanto que o tipo II, gama (único conhecido) são produzidos exclusivamente pelos linfócitos (Klaus, 1997).

Em 2002, um novo grupo de IFNs foi descoberto independentemente por dois grupos distintos de cientistas liderados por Kotenko e Gallagher (2003), e Sheppard (2002). O novo IFN- λ , é classificado em três sub-tipos: IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3, também são conhecidos como IFNL1, IFNL2, IFNL3 (Li, 2009; Schneider, 2014). Recentemente um quarto membro foi descoberto por Prokunina-Olsson (2013) o IFNL4.

Os interferons tipo I são polipeptídios que são secretados pelas células infectadas e possuem três funções principais. Em primeiro lugar, eles induzem estados antimicrobianos intrínsecos às células, nas células infectadas e vizinhas, que limitam a difusão de agentes infecciosos, em particular agentes patogênicos virais. Em segundo lugar, eles modulam a resposta imune inata de uma forma equilibrada, promovendo a apresentação dos antígenos e ativando a função das células *natural killer*. Em terceiro lugar, ativa o sistema imune adaptativo, promovendo assim o desenvolvimento de uma elevada afinidade antígeno-específico das células T e B e memória imunológica (Fig. 3) (Ivashkiv e Donlin, 2014).

Figura 3. Interferon tipo I: controles da imunidade inata e adaptativa e programas antimicrobianos intracelulares. (Ivashkiv e Donlin, 2014)

Interferons tipo I constituem a maior classe de IFNs. Nos seres humanos, esta classe compreende IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , e IFN- ω , todos os quais estão presente no cromossomo nove, e sua via de sinalização ocorre através de um complexo heterodimérico compreendido pelo receptor de IFN- α 1 (IFNAR1) e as subunidades de IFN- α pelo IFNAR2 (Fig. 4). Cada IFN tipo I é codificado por um único gene, com a exceção do IFN- α , que compreende 13 subtipos em seres humanos.

Figura 4. Cascata de sinalização do interferon. (Schneider, 2014)

Os três diferentes tipos de IFN possuem vias de sinalização através de complexos de receptores distintos na superfície celular: IFNs do tipo I atuam através dos receptores heterodímeros de IFN (IFNAR1) e IFN- α (IFNAR2). IFNs do tipo III sinalizam através do receptor de interleucina-10 (IL-10R2 e IFNLR1), e o IFN de tipo II por meio de dímeros de heterodímeros constituídos por receptores IFN-1 γ (IFNGR1) e 2 (IFNGR2).

A ligação de ambos os tipos I e III desencadeia a fosforilação da Janus quinase 1 (JAK1) e tirosina-quinase 2 (TYK2), que por sua vez fosforilam os receptores, em específico, resíduos de tirosina intracelulares. Após a fosforilação do receptor, ocorre a fosforilação do STAT1 e 2 (transdutor de sinal e ativador de transcrição). STAT1 e 2 se associam para formar um heterodímero, que por sua vez, recruta o fator de regulação IFN 9 (IRF9) para formar o fator ISGF3.

A ligação do IFN tipo II aos receptores IFNGR1 e 2 ocorre através de ligações complexas, a fosforilação da JAK1 e JAK2 é pré-associada com a

tirosina-quinase, e a fosforilação da cadeia do receptor leva ao recrutamento e a fosforilação de STAT1. Homodímeros de STAT1 fosforilados formam o fator de ativação IFN- γ (GAF). Ambos ISGF3 e GAF são translocados para o núcleo e ligam-se ao ISRE (elemento responsivo pelo estímulo de interferon) e na sequência ativadora-gama (GAS), elementos promotores, respectivamente, resultando na expressão de genes antivirais (Schneider, 2014).

O IFN- α foi o primeiro medicamento a demonstrar efeitos benéficos em pacientes com hepatite C, em 1986. Atualmente, todos os tratamentos da hepatite C são baseados no uso de preparações de IFN- α combinadas ou não com a ribavirina. A terapia resulta em rápido declínio dos níveis do vírus da hepatite C no soro e, a longo prazo, ocorre sua extinção no soro e fígado, ocorrendo a cura da infecção crônica (Feld e Hoofnagle, 2005; Thitinan e Mcconville, 2009).

Os interferons alfa-2 (IFN- α 2) são parte de um grupo heterólogo de proteínas com atividades biológicas semelhantes. Os três principais subtipos de IFN- α 2 são designados α -2a, α -2b e α -2c (Srivastava, 2005).

Existem dois tipos de interferons- α recombinantes, o rhINF α -2a e o 2b que, estruturalmente, são proteínas bioterapêuticas não glicosiladas com 165 aminoácidos, diferindo pela presença dos aminoácidos lisina e arginina, respectivamente, na posição 23, com duas pontes dissulfeto intramoleculares e massa molecular de aproximadamente 19,2 kDa (Klaus, 1997).

As citocinas apresentam grande interesse econômico. Na avaliação do total de vendas nos Estados Unidos, na categoria de Drogas Biológicas, as citocinas renderam 4,8 bilhões de dólares, um aumento de 14,8% quando comparado com 2011, os interferons foram os mais rentáveis, com um total de 79% das vendas do mercado. Em 2012, os hormônios foram a segunda maior classe de vendas de produtos biológicos e uma das principais categorias em termos de crescimento, posição esta em que se mantiveram estáveis durante os últimos 8-10 anos. (Aggarwal, 2014). Ressaltamos outrossim que no Brasil há pelo menos 8 empresas (www.anvisa.gov.br) que comercializam o IFN- α 2a, em geral obtido através de importação.

A *E. coli* é um hospedeiro bem conhecido e estudado para a produção de proteínas recombinantes (Baneyx, 1999, Srivastava, 2005), embora muitos genes não possam ser expressos de forma eficiente neste organismo. Isto pode ser devido às características estruturais únicas e sutis da sequência do gene, a

estabilidade e eficiência de transcrição/tradução do mRNA, e as diferenças dos códons utilizados no gene de interesse e os códons utilizados comumente para este hospedeiro (Srivastava, 2005).

De acordo com dados da literatura (Robinson, 1984, Srivastava, 2005) os códons AGG/AGA, CUA, AUA, CCA ou CCC podem reduzir a quantidade e a qualidade da proteína sintetizada se utilizados em *Escherichia coli*. Dados da literatura sugerem que a utilização destes códons podem influenciar negativamente na expressão das proteínas de interesse. Diante deste fato, resolvemos realizar um estudo adicional caracterizado pela construção de um segundo vetor para a expressão do IFN- α 2a no periplasma bacteriano. Neste caso, o cDNA correspondente ao IFN foi otimizado pela substituição dos códons raros pelos mais comuns, conforme relatado por Srivastava (2005), que obteve com essas alterações um aumento expressivo na expressão de IFN em corpos de inclusão.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Estudar a influência da temperatura de cultivo na expressão de proteínas recombinantes no espaço periplásmico bacteriano utilizando o promotor λP_L funcionando como promotor constitutivo.

Objetivos específicos:

- Construção do vetor para expressão de IFN α -2a no espaço periplásmico de *Escherichia coli* utilizando o promotor λP_L .
- Estudar a influência da temperatura de cultivo na expressão das proteínas recombinantes hGH, hPRL, G129R-hPRL, Δ 1-9 G129R-hPRL, IFN α -2a e IFN α -2a cDNA-otimizado, visando incrementar sua expressão periplásmica e consequente aumento de rendimentos de produção.
- Desenvolver metodologia de análise por RP-HPLC, HPSEC, SDS-PAGE e Western Blotting para o IFN α -2a presente no fluído periplásmico.
- Padronizar processo de cultivo de *Escherichia coli* com uma cepa produtora de IFN α -2a assim como sua purificação visando produção em escala laboratorial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Equipamentos

- Agitador magnético, modelo 258, Fanem (São Paulo, Brasil)
- Agitador rotatório tipo Vortex, modelo 162, Marconi (São Paulo, Brasil)
- Aparelho Milli-Q modelo Direct-Q, Millipore (Bedford, MA-EUA)
- Autoclave vertical, modelo 103, Faber-Primar (São Paulo, Brasil)
- Autoclave vertical, modelo 503, ELETROlab (São Paulo, Brasil)
- Balança analítica, modelo H20T, Mettler (Zurich, Suíça)
- Balança analítica, modelo M5AS, Mettler (Zurich, Suíça)
- Balança analítica, modelo P1000N, Mettler (Zurich, Suíça)
- Balança analítica, modelo P2010, Mettler (Zurich, Suíça)
- Banho-maria, modelo 1102, Fanem (São Paulo, Brasil)
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC-2B, Sorvall, Newtown (Connecticut, EUA)
- Centrífuga refrigerada automática, modelo: 5810R, Eppendorf, (Hamburgo, Alemanha)
- Destilador de água, modelo 016, Faber-Primar (São Paulo, Brasil)
- Espectrofotômetro, modelo NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Waltham (MA, EUA)
- Espectrofotômetro, modelo ultraspec 2100 pro, Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia)
- Estufa de esterilização e secagem, modelo 315 SE, Fanem (São Paulo, Brasil)
- Estufa de cultura, modelo 002-CB, Fanem (São Paulo, Brasil)
- Fonte de alta tensão para eletroforese ECPS 3000/150, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Fonte de alta tensão para eletroforese EPS 600, GE-Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)

- Fotodocumentador, modelo MiniBis Pro, DNR Image Systems (Jerusalém – Israel)
- Freezer –80 °C, modelo 917, Thermo Forma, Waltham (MA, EUA)
- Freezer –80 °C, modelo Forma 700 Series, Thermo Scientific, Waltham (MA, EUA)
- Fluxo Laminar, Veco (São Paulo, Brasil)
- Incubadora refrigerada com agitação orbital, modelo TE-421, Tecnal (São Paulo, Brasil)
- Máquina de produzir gelo, modelo EGE 300M, Everest (Rio de Janeiro, Brasil)
- Medidor digital de pH, modelo Orion Star A211, Thermo Scientific Waltham (MA, EUA)
- Membrana de nitrocelulose (22 µm), Hynbond – C modelo RPN 303C, Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia)
- Micro-centrífuga, modelo 5415C, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha)
- Sistema de Cromatografia de Alta Eficiência (HPLC) Shimadzu, modelo SCL-10 A, acoplado a um detector de UV SPD-10 AV (Shimadzu, MD, EUA), usando o software LCsolution – Shimadzu
- Sistema de Cromatografia de Alta Eficiência (HPLC) Shimadzu, modelo LC-20AT, acoplado a um detector de UV SPD-20A (Shimadzu, MD, EUA), usando o software LCsolution – Shimadzu
- Sistema de eletroforese vertical Horfer Mini VE, Amersham Bioscience (Uppsala, Suécia)
- Sistema de purificação ÄKTA purifier, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Sistema de transferência semi-seco Hoefer TE 70, GE Healthcare (Buckinghamshire, Inglaterra)

3.1.1.1 Material plástico

- Pipetas de 1, 2, 5, 10 e 25 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Placas de petri de 10 cm de diâmetro, Corning Costar Corp. (NY, EUA)
- Tubos para centrífuga de 15 e 50 mL, Corning Costar Corp. (NY, EUA)

- Tubos eppendorf de 0,5 e 1,5 mL (Hamburgo, Alemanha)

3.1.1.2 Reagentes

- Ácido acético glacial P.A., Labsynth (São Paulo, Brasil)
- Ácido clorídrico P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- Acrilamida, Merck (São Paulo, Brasil)
- Acetonitrila, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA)
- Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA), Synth (São Paulo, Brasil)
- Agar (Bacto Agar), Becton Dickinson and Company (Sparks, MD, EUA)
- Agarose, Uniscience (São Paulo, Brasil)
- Álcool Isopropílico, P.A., Synth (São Paulo, Brasil)
- Álcool metílico, Merck (São Paulo, Brasil)
- Ampicilina, Bayer (São Paulo, Brasil)
- Bicarbonato de Amônio, P.A., Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha)
- Bis-acrilamida, Merck (São Paulo, Brasil)
- Brometo de etídeo, Merck (São Paulo, Brasil)
- Cloreto de Sódio, P.A., Dinâmica (São Paulo, Brasil)
- Coomassie Brilliant Blue G 250, GE Healthcare (São Paulo, Brasil)
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), GE Healthcare (São Paulo, Brasil)
- Etanol, P.A., Merck (São Paulo)
- Extrato de Levedura, Becton Dickinson and Company (Sparks, MD, EUA)
- Fosfato de sódio monobásico P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- Fosfato de sódio dibásico P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- Glicerol, Merck (São Paulo, Brasil)
- Hidróxido de Sódio, P.A., Merck (São Paulo)
- Leite desnatado em pó Molico, Nestlé (São Paulo), composição declarada: gordura (1%), proteínas (36%), lactose (52%), sais minerais (8%), água (3%)
- Metanol, P.A., Merck (São Paulo, Brasil)
- n-Propanol, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA)
- Padrões de massa molecular, GE Healthcare (São Paulo, Brasil)
- Persulfato de amônio, Merck (São Paulo, Brasil)
- Sacarose, Difco (São Paulo, Brasil)

- TEMED (N, N, N', N' tetrametilenodiamina), Sigma (St Louis, EUA)
- Triptona, Becton Dickinson and Company (Sparks, MD, EUA)
- Tris Base, Sigma (St Louis, EUA)

3.1.1.3 Enzimas, Tampões e Marcador de número de pares de bases

- Enzima de restrição BamHI, Thermo Scientific, Waltham (MA, EUA)
- Enzima de restrição NdeI, Thermo Scientific, Waltham (MA, EUA)
- Buffer R (red), Thermo Scientific, Waltham (MA, EUA)
- Buffer Tango, Thermo Scientific, Waltham (MA, EUA)
- Ladder 1 Kb, Thermo Scientific, Waltham (MA, EUA)

3.1.2 Material para purificação e análise das proteínas

3.1.2.1 Colunas cromatográficas

A) Coluna utilizada para cromatografia clássica de troca iônica

- Coluna Resource Q (1 mL), GE Healthcare (Uppsala, Suécia)

B) Colunas de aço inoxidável utilizadas em Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

- Coluna TSK G 2000 SW (60 cm X 7,5 mm D.I.), acoplada a uma pré-coluna SW (7,5 cm X 7,5 mm D.I.), Tosohaas (Montgomeryville, PA, EUA), para HPLC de exclusão molecular
- Coluna C4 Vydac 214TP54 (25 cm x 4,6 mm D.I.) acoplada a uma pré-coluna Vydac 214 FSK 54, para HPLC de fase reversa, analítica

3.1.2.2 Resinas cromatográficas

- Sílica gel, grupo funcional Diol, tamanho das partículas 10 µm e poros de 125 Å Tosohaas (Montgomeryville, PA, EUA), para HPLC de Exclusão Molecular
- Sílica com grupos de ligação butil alifático, tamanho das partículas de 5 µm e diâmetro de 300 Å, Vydac Separations Group (Hisperia, CA, EUA) para HPLC de Fase Reversa
- Poliestireno/Divinilbenzeno, tamanho das partículas 15 µm, para coluna Resource Q

3.1.2.3 Padrões, antissoros e outros reagentes para SDS-PAGE e WB

- hPRL utilizada como padrão de referência interno (P37), produzida no laboratório do Centro de Biotecnologia do IPEN a partir de bactérias *E.coli* modificadas geneticamente e calibrada contra o padrão internacional
- Antissoro anti-prolactina humana, produzido em coelho, do NIDDK-NHI (Bethesda, MD, USA)
- Antissoro anti-hGH, produzido em coelho, do NIDDK-NHI (Bethesda, MD, USA)
- Antissoro anti-interferon $\alpha 2$ humano da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA).
- IFN- $\alpha 2a$ rec WHO – CRS (Chemical Reference Solution) – OMS (Londres, Inglaterra)
- hPRL rec WHO – CRS (Chemical Reference Solution) – OMS (Londres, Inglaterra)
- hGH rec WHO – CRS (Chemical Reference Solution) – OMS (Londres, Inglaterra)

3.2 Métodos

3.2.1 Construção dos plasmídeos

3.2.1.1 Plasmídeo para expressão de IFN- $\alpha 2a$ em *Escherichia coli*

O DNA contendo a sequência correspondente ao sítio de restrição da enzima NdeI, códon de iniciação, peptídeo sinalizador DsbA, cDNA do IFN α -2a com a sequência nativa do hormônio, *stop codon* e o sítio de restrição BamHI foi inserido no cassete de expressão desenvolvido no laboratório do Centro de Biotecnologia do IPEN, o mesmo utilizado para obter o vetor do mPRL (λ PL-DsbA-mPRL) (Suzuki, 2012). Esse cassete contém o promotor λ P_L e o gene para resistência à ampicilina (Soares, 2003).

O vetor foi chamado de λ P_L-DsbA-IFN α 2a (Figura 5). A sequência apresentada na Figura 6 foi sintetizada pela GenScript Corporation (Piscataway - NJ – EUA) no cassete de expressão pUC57. Foram fornecidos também

comprovantes dos sequenciamentos e outras informações necessárias sobre o vetor pUC57.

O cassete obtido foi amplificado em bactérias *E. coli* cepa DH5 α e depois utilizado para transformar a cepa de expressão W3110.

Figura 5. Esquema de construção do plasmídeo bacteriano para expressão de IFN α -2a no espaço periplásmico bacteriano. O inserto contendo a sequência do cDNA do IFN α -2a foi sintetizado no vetor pUC57. O inserto de 572 pb foi extraído com a utilização das enzimas de restrição NdeI e BamHI e inserido no vetor λ P_L-DsbA na posição onde se encontrava o inserto da mPRL.

```

5'gaattcatatgAAA AAG ATT TGG CTG GCG CTG GCT GGT TTA GTT TTA GCG TTT AGC 45
-18      Lys Lys Ile Trp Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ala Phe Ser -4

46   GCA TCG GCG TGT GAT CTG CCT CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG   90
-3   Ala Ser Ala Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg   12

91   AGG ACC TTG ATG CTC CTG GCA CAG ATG AGG AAA ATC TCT CTT TTC   135
13   Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe   27

136  TCC TGC TTG AAG GAC AGA CAT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG   180
28   Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu   42

181  TTT GGC AAC CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT   225
43   Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His   57

226  GAG ATG ATC CAG CAG ATC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA   270
58   Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser   72

271  TCT GCT GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA   315
73   Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu   87

316  CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG ATA CAG GGG   360
88   Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly   102

361  GTG GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC TCC ATT CTG   405
103  Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu   117

406  GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC ACT CTC TAT CTG AAA GAG   450
118  Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu   132

451  AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC   495
133  Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile   147

496  ATG AGA TCT TTT TCT TTG TCA ACA AAC TTG CAA GAA AGT TTA AGA   540
148  Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg   162

541  AGT AAG GAA tgataaggatcc-3'
163  Ser Lys Glu

```

Figura 6. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos do IFN-α2a, onde em verde temos os sítios de restrição das enzimas EcoRI e NdeI, (extremidade 5') e BamHI (extremidade 3'); sublinhado temos a sequência correspondente ao peptídeo sinalizador DsbA. O cDNA do IFN-α2a teve sua sequência obtida no site da NCBI Reference Sequence: NM_000605.3 Homo sapiens interferon, alpha 2 (IFNA2), mRNA. O *stop codon* duplo está destacado em amarelo.

3.2.1.2 Plasmídeo para expressão de IFN- α 2a cDNA-otimizado em *Escherichia coli*

O DNA contendo a sequência correspondente ao sítio de restrição da enzima NdeI, códon de iniciação, peptídeo sinalizador DsbA, cDNA do IFN α -2a otimizado com a sequência nativa do hormônio, *stop codon* e o sítio de restrição BamHI foi inserido no cassete de expressão desenvolvido em nosso laboratório, o mesmo utilizado para obter o vetor do mPRL (λ PL-DsbA-mPRL) (Suzuki, 2012). Mesmo protocolo utilizado para a construção do vetor do IFN- α 2a (Fig. 7 e 8). A substituição dos códons naturais do interferon α 2a humano pelos códons mais comuns utilizados pela *E. coli* foi baseado no trabalho de Srivastava e colaboradores (2005).

Figura 7. Esquema de construção do plasmídeo bacteriano para expressão de IFN α -2a cDNA-otimizado no espaço periplásmico bacteriano. O inserto contendo a sequência do cDNA do IFN α -2a otimizado foi sintetizado no vetor pUC57. O inserto de 572 pb foi extraído com a utilização das enzimas de restrição NdeI e BamHI e inserido no vetor λ P_L-DsbA na posição onde se encontrava o inserto da mPRL.

5'	gaattcatatg	AAA AAG ATT TGG CTG GCG CTG GCT GGT TTA GTT TTA GCG TTT AGC	45
-18		Lys Lys Ile Trp Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ala Phe Ser	-4
46	GCA TCG GCG	TGT GAT CTG CCT CAG ACC CAT AGC CTG GGC AGC CGT	90
-3	Ala Ser Ala Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg		12
91	CGT ACC CTG	ATG CTG GCG CAG ATG CGT AAA ATC AGC CTG TTT	135
13	Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe		27
136	AGC TGC CTG AAA GAT CGT	CAT GAT TTT GGC TTT CCG CAG GAA GAA	180
28	Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu		42
181	TTT GGC AAC CAG TTT CAG AAA GCG	GAA ACC ATC CCG GTT CTG CAT	225
43	Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His		57
226	GAA ATG ATC CAG CAG ATC TTT AAC CTG TTT	AGC ACC AAG GAT AGC	270
58	Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser		72
271	AGC GCG GCG TGG GAT GAA ACC CTG CTG GAT	AAA TTT TAT ACC GAA	315
73	Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu		87
316	CTG TAT CAG CAG CTG AAC GAT CTG GAA GCG	TGT GTT ATC CAG GGC	360
88	Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly		102
361	GTT GGC GTT ACC GAA ACC CCG CTG ATG AAA GAA GAT	AGC ATC CTG	405
103	Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu		117
406	GCG GTT CGT AAA TAC TTT CAG CGT ATC ACC CTG	TAT CTG AAA GAA	450
118	Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu		132
451	AAA AAA TAT AGC CCG TGC GCG TGG GAA GTT GTT CGT	GCG GAA ATC	495
133	Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile		147
496	ATG CGT AGC TTT AGC CTG AGC ACC AAC CTG CAG	GAA AGC CTG CGT	540
148	Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg		162
541	AGC AAG GAA tgataa	ggatcc-3'	
163	Ser Lys Glu		

Figura 8. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos do IFN- α 2a cDNA-otimizado, em verde temos os sítios de restrição das enzimas EcoRI e NdeI, (extremidade 5') e BamHI (extremidade 3'), em destaque temos os códons que foram modificados para otimizar a sequência do gene, que representa uma diferença de 58,78% do não otimizado, sublinhado temos a sequência correspondente ao peptídeo sinalizador DsbA. O stop códon duplo está destacado em amarelo.

3.2.2 Análise dos plasmídeos mediante gel de agarose

Os plasmídeos obtidos da transformação das bactérias DH5 α por choque térmico foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição (NdeI e BamHI) e posteriormente analisados mediante eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (1 mg/mL). A agarose foi dissolvida em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x e aquecida para ser dissolvida. Após o resfriamento foi adicionado o brometo de etídeo. As amostras foram adicionadas em poços individuais e submetidas a corrida eletroforética com corrente elétrica de 60 volts e diferença de potencial de 45 mA.

3.2.2.1 Purificação dos fragmentos

Os fragmentos (vetor e inserto), digeridos com as enzimas de interesse, observados depois da corrida eletroforética em gel de agarose foram purificados utilizando o *kit* de purificação em gel da Qiagen (QIAquick Gel Extraction Kit®).

3.2.3 Transformação dos plasmídeos em bactérias *Escherichia coli*

Para a expressão das diferentes proteínas proposta neste trabalho (hGH, hPRL, G129R-hPRL, Δ 1-9 G129R-hPRL, IFN α -2a e IFN α -2a cDNA-otimizado) no periplasma bacteriano foram utilizadas as cepas de *E. coli* W3110, transformadas por choque térmico com os vetores de expressão λ PL-DsbA-hPRL, λ PL-DsbA-hGH, λ PL-DsbA-G129R-hPRL, λ PL-DsbA-IFN α 2a ou λ PL-DsbA-IFN α 2a-cDNA-otimizado e a cepa RRI contendo o vetor de expressão λ PL-DsbA- Δ 1-9-G129R-hPRL.

Optamos por não utilizar o plasmídeo do repressor pRK248clts, cuja presença prejudicou a expressão da hPRL (Soares, 2008).

3.2.4 Expressão em bactérias *Escherichia coli*

O cultivo foi realizado em frascos com capacidade para 500 mL contendo 100 mL de meio LB com ampicilina 0,1 mg/mL, inoculando-se uma única colônia de *E. coli* obtida da placa de seleção e incubando a 30 °C com agitação

rotacional. Após o crescimento a 30 °C (até a massa bacteriana atingir a fase log ou atingir a fase estacionária) a temperatura foi mantida em 30 °C ou elevada para: 32, 35, 37 ou 42 °C por 6 horas.

O fluido periplásmico dos diferentes clones foi obtido por meio de choque osmótico, que consiste basicamente na incubação em solução hipertônica seguido de incubação em solução hipotônica. A sua finalidade é extrair as proteínas periplásmicas, sem que ocorra ruptura das células, como pode ser observado na Figura 9 (Koshland e Botstein, 1980). Utilizamos o método de Koshland e Botstein, 1980, com modificações, como descrito por Soares e colaboradores (2003).

Brevemente, terminada a fermentação, o meio foi centrifugado a 4000 g durante 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspensão em solução Tris-HCl (10 mM, pH 7,5)/ sacarose 20%, e adicionado uma solução de EDTA 0,5 M pH 8,0 e mantido em repouso em banho de gelo por cinco minutos, novamente resuspensão e mantido em repouso por mais cinco minutos. O material foi novamente centrifugado, nas mesmas condições descritas anteriormente, e o precipitado ressuspensão em solução de Tris-HCl (1 mM, pH 7,0) e mantido em banho de gelo por cinco minutos, novamente resuspensão e mantido em repouso por mais cinco minutos. Após nova centrifugação, o sobrenadante contendo as proteínas periplásmicas foi estocado a -80° C. O volume de Tris-HCl/ sacarose é calculado pela fórmula: $V_{\text{sac}} \text{ (mL)} = (A_{600} \times \text{volume do meio (mL)}) / 100$ e o volume de EDTA pela fórmula: $V_{\text{EDTA}} \text{ (mL)} = V_{\text{sac}} / 30$.

Figura 9: Exemplo esquemático do choque osmótico. **(A)** Bactéria em meio hipertônico; **(B)** Bactéria em meio hipotônico.

3.2.5 Purificação

3.2.5.1 Purificação do Interferon- α 2a

O interferon presente no produto do choque osmótico foi purificado seguindo a metodologia descrita por Srivastava e colaboradores (2005) com modificações.

Foi utilizada uma coluna Resource Q[®] de 1 mL, que possui uma resina de troca aniônica. A coluna foi equilibrada com 0.05 M TRIS-HCl (pH 8,0) (fase móvel A). A absorbância em UV foi monitorada a 280 nm.

Com o objetivo de eliminar impurezas foi realizada uma lavagem com 2% desta mesma fase móvel acrescida de 2M NaCl (fase móvel B). A eluição do interferon foi realizada com 10% da fase móvel B. O fluxo utilizado foi de 3 mL/min e as frações coletadas foram de 1 mL.

Diferentes frações contendo a proteína foram analisadas por SDS-PAGE, e a com maior concentração de proteína de interesse foi selecionada para a segunda etapa de purificação, uma coluna de Exclusão Molecular de Alta Eficiência (HPSEC).

3.2.6 Caracterização físico-química

As proteínas de interesse produzidas neste trabalho foram caracterizadas mediante técnicas físico-químicas como SDS-PAGE, Western Blotting, HPLC de fase reversa (RP-HPLC) e de exclusão molecular (HPSEC).

3.2.6.1 Análise por SDS-PAGE de amostras de choque osmótico

As amostras do choque osmótico foram analisadas mediante eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Bowen, 1980; Sambrook, 1989).

A eletroforese foi realizada utilizando-se gel de poliacrilamida 15% em condição não redutora. O equipamento utilizado foi o sistema de eletroforese vertical Hoefer mini VE (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), aplicando-se uma corrente com intensidade de 35 mA. A duração aproximada da corrida foi de uma hora.

As amostras foram preparadas adicionando-se o tampão de amostra (4x) e em seguida fervidas por aproximadamente cinco minutos.

A fixação foi realizada imergindo o gel em solução fixadora contendo 50% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 40% de água, sob leve agitação durante uma hora. Após a fixação, a revelação foi realizada com *Coomassie Brilliant Blue G-250*.

3.2.6.1.1 Revelação com *Coomassie Brilliant Blue G-250*

A revelação foi realizada com o gel imerso em solução corante composta por 0,25% de azul de *Coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue G-250*), 45% de metanol e 8% de ácido acético por aproximadamente 30 minutos, a seguir descorando em solução de ácido acético 10%, fazendo-se “lavagens” a cada uma hora (3-4 vezes). Após a descoloração o gel foi conservado em solução de ácido acético 1%.

3.2.6.2 Análise por Western Blotting

Para serem analisadas por Western Blotting, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE e, em seguida, à uma transferência semi-seca para membrana de nitrocelulose (22 µm) realizada por eletroeluição e, posteriormente, utilizando o antissoro anti-prolactina humana ou anti-hGH do NIDDK-NIH (Bethesda, MD, USA) produzido em coelho, ou o antissoro anti-interferon α2 humano da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA).

Após a transferência, a membrana foi tratada por 10 minutos com tampão fosfato salina (PBS) contendo 5% de leite em pó desnatado e liofilizado (Nestlé, São Paulo, Brasil), sendo incubada por 18 horas a temperatura ambiente com 50 mL de antissoro diluído em PBS e 5% de leite em pó. Após a incubação com o antissoro, foram realizadas cinco lavagens com PBS contendo 5% de leite. A seguir, a membrana foi incubada por uma hora com 50 mL de uma solução PBS e 5% de leite contendo anticorpo secundário anti-IgG de coelho (1:1000, incubando por uma hora) (quando utilizado para hPRL, G129R-hPRL ou hGH) ou anti-IgG de mouse (quando utilizado para analisar o IFN-α2a). A revelação foi feita por

quimioluminescência com peroxidase e luminol (1:1), incubando por cinco minutos (Immobilion™) e exposto ao filme por 30 segundos.

3.2.6.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC

A avaliação qualitativa e quantitativa das proteínas de interesse foram realizadas por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (HPSEC) e em fase reversa (RP-HPLC) (Riggin, 1988; Dalmora, 1997; Soares, 2002). Em ambas, a detecção foi feita mediante luz ultravioleta (UV), no comprimento de onda de 220 nm.

No caso da HPSEC, a técnica de eluição foi isocrática utilizando como fase móvel o tampão bicarbonato de amônio 0,025 M, pH 7,0 ajustado com ácido fosfórico 2%, sendo o fluxo de trabalho de 1,0 mL/min.

Na RP-HPLC a coluna foi mantida a 45 °C e foram usados na fase móvel 71% de Tris 0,05 M, pH 7,5 e 29% de N-propanol, sendo o fluxo de trabalho de 0,5 mL/min, para analisar o hormônio do crescimento (GH), a prolactina e seu antagonista.

Para a análise do interferon- α 2a e interferon- α 2a cDNA otimizado foi desenvolvida uma nova condição de trabalho que pode ser observada na Tabela 1.

Tanto em HPSEC quanto em RP-HPLC a determinação do tempo de retenção e a quantificação se fez comparativamente à preparação recombinante IPEN de prolactina obtida em *E. coli* e/ou do padrão internacional de prolactina, hormônio do crescimento e interferon- α 2a recombinante da Organização Mundial de Saúde (WHO), ou CRS (*Chemical Reference Standard*).

Tabela 1: Condições experimentais estabelecidas para análise de IFN- α 2a e IFN- α 2a cDNA-otimizado por RP-HPLC.

Características	Descrição
Coluna	C ₄ Vydac
Temperatura da coluna	25 °C
Comprimento de onda	220 nm
Sistema de detecção	Absorbância em luz ultravioleta
Fluxo da fase móvel	0,5 mL/min
Fase móvel	Solução A: Fosfato de Sódio 0,05M pH 7,0 Solução B: 50% de A + 50% de acetonitrila
Modo de eluição	1° Step) 70% de Tampão B de 0 a 20 min.; 2° Step) 80% de Tampão B de 20 a 30 min.; 3° Step) 100% de Tampão B de 30 a 50 min.; 4° Step) 70% de Tampão B de 50 a 70 min.
Volume injetado (padrão)	5 μ L/7,5 μ g

4 RESULTADOS

4.1 Construção do vetor para expressão do IFN- α 2a

4.1.1 Análise com enzimas de restrição

Os vetores λ P_L-DsbA-mPRL e pUC57 contendo o gene do IFN- α 2a foram digeridos com as enzimas de restrição NdeI e BamHI. A análise por eletroforese em gel de agarose dessa reação é apresentada na Figura 10. Os fragmentos correspondentes ao cDNA do IFN- α 2a (572 pb) e ao vetor λ P_L (2567 pb) foram purificados e utilizados na reação de ligase e posterior transformação nas cepas de *E. coli* DH5 α .

A análise de restrição dos clones obtidos confirmou a correta construção do vetor λ P_L-DsbA-IFN α 2a, conforme apresentado na Figura 11, onde podemos observar que todos os clones analisados apresentaram o perfil esperado, ou seja, bandas do cDNA do IFN com 572 pb e do vetor com 2567 pb.

Figura 10. Análise de restrição do plasmídeo com enzimas por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. São mostrados os fragmentos correspondentes aos plasmídeos digeridos com as enzimas de restrição BamHI e NdeI.

- 1) Marcador de massa molecular em número de par de bases (pb) (1 kb DNA Ladder);
- 2-4) Vetor λP_L com gene da mPRL, digerido com NdeI e BamHI;
- 5-7) Vetor pUC57 com gene do IFN- $\alpha 2a$ (700 ng), digerido com NdeI e BamHI;
- 8) Marcador de massa molecular em número de par de bases (pb) (1 kb DNA Ladder).

Figura 11. Análise de restrição do plasmídeo com enzimas por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. São mostrados os fragmentos correspondentes aos plasmídeos digeridos com as enzimas de restrição BamHI e NdeI.

- 1) Marcador de massa molecular em número de par de bases (pb) (1 kb DNA Ladder);
- 2) Vetor λP_L com gene do IFN α -2a, clone 1, digerido com NdeI e BamHI;
- 3) Vetor λP_L com gene do IFN α -2a, clone 3, digerido com NdeI e BamHI;
- 4) Vetor λP_L com gene do IFN α -2a, clone 4, digerido com NdeI e BamHI;
- 5) Vetor λP_L com gene do IFN α -2a, clone 5, digerido com NdeI e BamHI;
- 6) Marcador de massa molecular em número de par de bases (pb) (1 kb DNA Ladder).

4.1.2 Interferon α 2a cDNA-otimizado

A construção do IFN- α 2a cDNA-otimizado seguiu basicamente a mesma metodologia utilizada na construção do IFN- α 2a. Nessa outra construção alguns dos códons raros para a *E. coli* presentes no cDNA do IFN- α 2a foram substituídos por códons mais comuns, conforme já descrito no Material e Métodos (Fig. 8). Na prática foram modificados 58,78% dos códons, modificação essa realizada com base no trabalho de Srivastava e colaboradores (2005). Na Figura 12 podemos observar o vetor pUC 57 com 2659 pb e inserto IFN α -2a cDNA-otimizado com 572 pb (poços 2-5) após digestão com as enzimas NdeI e BamHI.

Na análise do vetor final observamos duas bandas (Fig. 13): a do vetor com 2567 pb e a do inserto do IFN- α 2a cDNA-otimizado com 572 pb, nesta figura podemos observar o gene de interesse (poço 2).

Figura 12. Análise de restrição do plasmídeo com enzimas por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. São mostrados os fragmentos correspondentes aos plasmídeos digeridos com as enzimas de restrição BamHI e NdeI.

- 1) Marcador de massa molecular em número de par de bases (pb) (1 kb DNA Ladder);
- 2-5) Vetor pUC57 com gene do IFN $\alpha 2a$ cDNA-otimizado, digerido com NdeI e BamHI;
- 6) Marcador de massa molecular em número de par de bases (pb) (1 kb DNA Ladder).

Figura 13. Análise de restrição do plasmídeo com enzimas por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. São mostrados os fragmentos correspondentes aos plasmídeos digeridos com as enzimas de restrição BamHI e NdeI.

- 1) Marcador de massa molecular em número de par de bases (pb) (1 kb DNA Ladder);
- 2) Vetor λ PL com gene do IFN α -2a cDNA-otimizado, clone 6, digeridos com NdeI e BamHI;
- 3) Vetor pUC57 com gene do IFN α 2a cDNA-otimizado.

4.2 Análise de expressão das proteínas do estudo

Para a expressão das diferentes proteínas (hGH, hPRL, G129R-hPRL, Δ 1-9 G129R-hPRL, IFN α -2a e IFN α -2a cDNA otimizado) no periplasma bacteriano foram utilizadas as cepas de *E. coli* W3110, contendo seus respectivos vetores de expressão. Foi utilizada a cepa RRI para a expressão do Δ 1-9 G129R-hPRL, pois resultados preliminares com a cepa W3110 mostraram rendimentos muito inferiores ao esperado para esta proteína. O fluído periplásmico dos diferentes clones foi obtido por meio de choque osmótico.

4.2.1 Análise por SDS-PAGE de amostras de choque osmótico

As amostras do choque osmótico foram analisadas mediante eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em condições não redutoras. Na Figura 14 temos um exemplo de análise qualitativa das proteínas de interesse (hGH, hPRL e IFN- α 2a) obtidas com ativação de 37 °C iniciada quando o crescimento atingiu 1,5 A₆₀₀ (crescimento na fase log).

Observamos que a banda correspondente as proteínas de interesse coincidem com os respectivos padrões. É interessante observar que o IFN- α 2a, apesar de apresentar 19 kDa, no gel aparenta possuir 15 kDa, na comparação com o marcador de massa molecular.

Figura 14: Análise em SDS-PAGE, em condição não redutora, dos diferentes produtos de choque osmótico das cepas produtoras do hormônio do crescimento humano, prolactina humana e interferon humano. 1) Marcador de massa molecular; 2) Padrão CRS de hGH (1 µg); 3) Amostra de choque osmótico hGH; 4) Padrão CRS de hPRL (1 µg); 5) Amostra de choque osmótico hPRL; 6) Padrão CRS de IFN-α2a (1 µg); 7) Amostra de choque osmótico IFN-α2a; 8) Padrão comercial - Roferon A (1 µg).

4.2.2 Produtividade em função do momento de “ativação”

Soares e colaboradores (2003) descreveram que a produção do hGH utilizando o sistema de expressão com o promotor λP_L e o repressor clts sofre forte influência da fase de crescimento bacteriano na qual ocorre o aumento de temperatura (ativação do promotor).

A partir deste dado optamos por fazer um estudo complementar comparando a ativação na fase log de crescimento ($DO = 1,5 A_{600}$), e quando o crescimento máximo é atingido, realizado desta vez na ausência do repressor com a fase estacionária ($DO \sim 3,5 A_{600}$). No gráfico da Figura 15 podemos perceber que a ativação na fase de crescimento estacionária foi a que apresentou melhores resultados, tanto para a produção do hGH como para a produção da hPRL, com um incremento de aproximadamente duas vezes na expressão.

Figura 15. Comparação entre a produtividade obtida com início da “ativação” na Fase de crescimento Log *versus* Fase de crescimento Estacionária, utilizando cepas *E. coli* W3110 produtoras de hGH e hPRL com temperatura de “ativação” de 37 °C em ambos os casos.

Cabe ressaltar que o termo “ativação”, ainda continua sendo empregado, mesmo com o uso constitutivo do promotor λP_L . Na prática esse termo reflete o momento no qual ocorre a mudança de temperatura que tem por resultado o

aumento na expressão, provavelmente são envolvidos outros fatores durante essa mudança de temperatura que atuam sobre a expressão, fatores esses, abordados com maior profundidade na discussão.

4.2.3 Estudo de expressão com diferentes temperaturas de “ativação”

Uma vez estabelecido que o momento mais apropriado para iniciar a ativação é na fase de crescimento estacionária, foi iniciado um novo estudo. Desta vez foi analisada a influência da temperatura de cultivo na expressão de cada uma das proteínas de interesse. Foram comparadas as temperaturas de ativação 30, 32, 35, 37 e 42 °C, lembrando que o crescimento inicial das bactérias ocorre sempre a 30 °C.

4.2.3.1 Estudo de expressão com a cepa produtora de hPRL

As amostras de choque osmótico obtidas durante o processo de fermentação nas diferentes temperaturas de cultivo da cepa produtora de hPRL foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC). Exemplos destas análises podem ser observados na Figura 16.

Os resultados referentes ao estudo com o clone produtor de hPRL são apresentados na Tabela 2. Podemos verificar que a temperatura de 35 °C foi a que apresentou a melhor produtividade específica.

Tabela 2. Comparação da expressão da hPRL em diferentes temperaturas de “ativação”.

hPRL		
Temperatura (°C)	µg/mL/A ₆₀₀	n
30	1,029	1
32	1,260	2
35	1,457	2
37	0,848	3
42	0,235	1

Figura 16. Exemplo de análises por RP-HPLC de 100 μ L de fluído periplásmico de hPRL obtido a partir de diferentes temperaturas de “ativação”. (A) Padrão de referência interno de hPRL - 5 μ L / 5 μ g; (B) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 30 °C; (C) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 32 °C; (D) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 35 °C; (E) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 37 °C; (F) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 42 °C.

4.2.3.1.1 Análise do lisado bacteriano da cepa produtora de hPRL

Como descrito em Soares e colaboradores (2008), a análise do lisado bacteriano demonstrou uma instabilidade na expressão da hPRL quando presente no citoplasma bacteriano, instabilidade essa fortemente influenciada pela temperatura de cultivo. Com base nessas informações, expandimos esse estudo para as diferentes temperaturas de cultivo analisadas neste trabalho, não só na temperatura de 37 e 42 °C, como relatado por Soares e colaboradores (2008). Observamos na Figura 17 que a hPRL presente no citoplasma bacteriano submetida a temperaturas relativamente altas sofreu uma forte degradação, e por consequência a produtividade final diminuiu.

Figura 17. Análise por Western Blotting dos fluídos periplásmicos obtidos após choque osmótico da cepa produtora da hPRL em diferentes temperaturas de ativação; (1) padrão de referência interno de hPRL P37 (20 ng); (2, 3, 4 e 5) choque osmótico com temperaturas de ativação de 32, 35, 37 e 42 °C respectivamente; (6, 7, 8 e 9) lisado bacteriano com temperaturas de ativação de 32, 35, 37 e 42 °C respectivamente; (10) padrão de referência interno de hPRL (20 ng).

Visualizamos na coluna 9 (Fig. 17) que a banda correspondente a hPRL presente no lisado bacteriano com “ativação” a 42 °C é bem menos intensa que a banda apresentada nas colunas 7 e 8, correspondente ao lisado obtido com 35 e 37 °C de “ativação”, respectivamente.

4.2.3.2 Estudo de expressão com a cepa produtora de G129R-hPRL e Δ 1-9 G129R-hPRL

Assim como ocorreu no caso da hPRL, dados da Tabela 2, podemos verificar na Figura 18 que em temperaturas mais baixas ocorreu melhor expressão do antagonista G129R-hPRL, que por sua vez foi degradado em temperaturas mais elevadas.

Já o antagonista Δ 1-9 G129R-hPRL, mostrou um comportamento muito similar ao da hPRL, onde podemos observar no gráfico da Figura 19 que a temperatura de 35 °C demonstrou ser a melhor para a expressão desta proteína.

Figura 18. Comparação dos níveis de expressão do antagonista G129R-hPRL com cultivo em diferentes temperaturas de “ativação”.

Figura 19. Comparação dos níveis de expressão do antagonista Δ 1-9 G129R-hPRL com cultivo em diferentes temperaturas de “ativação”.

As amostras de choque osmótico obtidas durante o processo de fermentação nas diferentes temperaturas de cultivo das cepas produtoras dos antagonistas G129R-hPRL e Δ 1-9 G129R-hPRL foram analisadas e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC). Os valores máximos de expressão para cada clone foram: 1,16; 1,53; 1,22; 1,38 $\mu\text{g/mL/DO}_{600}$ para o antagonista G129R-hPRL nas temperaturas 30, 32, 35, 37 e 42 respectivamente, já para o antagonista Δ 1-9 G129R-hPRL foram: 0,83; 0,61; 0,64; 0,82; 0,42 $\mu\text{g/mL/DO}_{600}$ nas temperaturas 30, 32, 35 e 37 respectivamente. Exemplos destas análises podem ser observadas nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

Figura 20. Exemplo de análises por RP-HPLC de 100 μ L de fluído periplásmico do antagonista G129R-hPRL obtido a partir de diferentes temperaturas de “ativação”. (A) Padrão de referência interno de hPRL - 5 μ L / 5 μ g; (B) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 30 °C; (C) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 32 °C; (D) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 35 °C; (E) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 37 °C; (F) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 42 °C.

Figura 21. Exemplo de análises por RP-HPLC de 100 μ L de fluído periplásmico do antagonista Δ 1-9 G129R-hPRL obtido a partir de diferentes temperaturas de “ativação”. (A) Padrão de referência interno de hPRL - 5 μ L/5 μ g; (B) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 30 °C; (C) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 32 °C; (D) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 35 °C; (E) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 37 °C.

4.2.3.3 Estudo de expressão com a cepa produtora de hGH

Em contraste com os dados obtidos com o estudo nas diferentes temperaturas para a hPRL, mostrados na Tabela 2, podemos verificar na Figura 22 que o hGH apresentou estabilidade em relação a temperatura, mesmo quando ainda presente no citoplasma. É importante ressaltar que apesar dessa estabilidade que possibilitou a utilização do repressor clts, conforme relatado por Soares e colaboradores (2003; 2008), esse estudo mostrou de forma inédita que o cultivo com o promotor λP_L constitutivo na temperatura de 37 °C foi mais eficiente, mesmo para a expressão desse hormônio. Indicando que essa metodologia pode potencialmente melhorar os níveis de expressão mesmo para proteínas que respondem bem ao sistema clássico que utiliza o promotor λP_L e o repressor clts.

Figura 22. Comparação dos níveis de expressão do hGH com cultivo em diferentes temperaturas de “ativação”.

As amostras de choque osmótico obtidas durante o processo de fermentação nas diferentes temperaturas de cultivo da cepa produtora do hormônio do crescimento foram analisadas e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC). O valor máximo de expressão foi 1,0; 1,83; 1,94; 2,46; 1,80 $\mu\text{g/mL/DO}_{600}$ para o hGH nas temperaturas 30, 32, 35, 37 e 42, respectivamente. Exemplos destas análises podem ser observados nas Figura 23.

Figura 23. Exemplo de análises por RP-HPLC de 100 μ L de fluído periplásmico de hGH obtido a partir de diferentes temperaturas de “ativação”. (A) Padrão de referência CRS de hGH - 5 μ L/5 μ g; (B) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 30 °C; (C) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 32 °C; (D) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 35 °C; (E) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 37 °C; (F) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 42 °C.

4.2.3.3.1 Análise do lisado bacteriano da cepa produtora de hGH

Assim como foi feito para a prolactina, prosseguimos com o estudo do lisado bacteriano na cepa produtora do hormônio de crescimento humano (Fig. 24).

O estudo do lisado bacteriano proveniente do produto de choque osmótico do hGH mostrou um comportamento bem diferente ao da prolactina e seus antagonistas, o hGH confirmou ser bem mais estável no citoplasma, podemos observar essa maior estabilidade quando observamos menos formas degradadas presentes no Western Blotting, quando comparadas ao lisado bacteriano da hPRL na Figura 17.

Figura 24. Análise por Western Blotting dos fluídos periplásmicos obtidos após choque osmótico da cepa produtora da hGH em diferentes temperaturas de cultivo; (1) padrão CRS hGH (20 ng); (2, 3, 4 e 5) choque osmótico com temperaturas de “ativação” de 32, 35, 37 e 42 °C, respectivamente; (6, 7, 8 e 9) lisado bacteriano com temperaturas de “ativação” de 32, 35, 37 e 42 °C respectivamente; (10) padrão CRS hGH (20 ng).

4.2.3.4 Estudo de expressão com as cepas produtoras de IFN- α 2a e IFN- α 2a cDNA-otimizado

As amostras de choque osmótico obtidas durante o processo de fermentação nas diferentes temperaturas de cultivo das cepas produtoras de IFN- α 2a e IFN- α 2a cDNA-otimizado foram analisadas quantitativas e qualitativas por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC). Os perfis cromatográficos em RP-HPLC obtidos do fluído periplásmico destas análises podem ser observados na Figura 25 e 26, respectivamente.

A quantificação das amostras do fluído periplásmico, foi realizada através da análise da área do pico correspondente da proteína de interesse, comparada à área obtida no padrão de referência CRS IFN- α 2a. É importante ressaltar que essa metodologia de análise por RP-HPLC do IFN- α 2a foi desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa durante esse projeto e possibilitou de forma inédita avaliar a qualidade e a quantidade do IFN- α 2a presente no extrato bruto (fluído periplásmico) obtido por choque osmótico.

Os estudos realizados para validação dessa metodologia são apresentados no capítulo 4.4.

Figura 25. Exemplos de análises por RP-HPLC de 100 μ L de fluído periplásmico de IFN- α 2a obtido a partir de diferentes temperaturas de “ativação”. (A) Padrão CRS IFN- α 2a - 5 μ L/7,5 μ g; (B) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 30 °C; (C) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 32 °C; (D) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 35 °C; (E) Fluído periplásmico obtido na temperatura de 37 °C.

Figura 26. Exemplos de análises por RP-HPLC de 100 μ L de fluído periplásmico contendo IFN- α 2a cDNA-otimizado obtido a partir de diferentes temperaturas de “ativação”. (A) Padrão CRS IFN- α 2a - 5 μ L/7,5 μ g; (B) Fluido periplásmico obtido na temperatura de 30 $^{\circ}$ C; (C) Fluido periplásmico obtido na temperatura de 32 $^{\circ}$ C; (D) Fluido periplásmico obtido na temperatura de 35 $^{\circ}$ C; (E) Fluido periplásmico obtido na temperatura de 37 $^{\circ}$ C.

Os resultados referentes aos estudos da expressão em função da temperatura de “ativação” dos clones produtores de IFN- α 2a da construção com o cDNA natural e o cDNA otimizado são apresentados na Figura 27 e 28, respectivamente. A expressão do IFN- α 2a apresenta melhor resultado quando realizada em temperaturas mais amenas, como 30 e 32 °C, não sendo observadas diferenças significantes entre estas duas temperaturas, contudo em comparação com temperaturas mais altas, como 37 °C observamos uma perda gradual e significativa na expressão da proteína, podendo chegar a aproximadamente 65 %.

Já a cepa produtora do IFN- α 2a cDNA-otimizado apresentou uma melhora gradativa quando a produção foi realizada com temperaturas mais baixas. Podemos observar, no gráfico da Figura 28, que quanto menor a temperatura de “ativação” maior a produtividade. Assim como observado para o IFN- α 2a o IFN- α 2a cDNA-otimizado apresenta uma diferença significativa quando comparada a temperatura de 30 com 37 °C, aproximadamente de 73 %.

Observamos na Figura 29 que a cepa produtora de IFN- α 2a cDNA-otimizado, produziu aproximadamente 10% mais IFN, no entanto foi constatado também, durante nossos estudos com cultivo em frascos, que a densidade óptica máxima de crescimento desse clone foi de aproximadamente 1,70 DO₆₀₀, bem inferior ao crescimento de aproximadamente 4,0 DO₆₀₀, obtido com o clone produtor de IFN- α 2a derivado do vetor com o cDNA natural. Portanto, a escolha do clone mais apropriado para uma futura produção depende ainda de estudos mais profundos, envolvendo o cultivo em biorreator, em condições mais controladas de cultivo que possam elevar a DO máxima de crescimento.

Os valores máximos de expressão para cada clone foram: 1,84; 1,71; 1,11; 0,76 $\mu\text{g/mL/DO}_{600}$ nas temperaturas 30, 32, 35 e 37 respectivamente, para o IFN- α 2a e 2,22; 1,85; 1,23; 0,698 $\mu\text{g/mL/DO}_{600}$ nas temperaturas 30, 32, 35 e 37, respectivamente, para o IFN- α 2a cDNA-otimizado.

Figura 27. Comparação dos níveis de expressão do IFN- $\alpha 2a$ com cultivos em diferentes temperaturas de “ativação”.

Figura 28. Comparação dos níveis de expressão do IFN- $\alpha 2a$ cDNA-otimizado com cultivos em diferentes temperaturas de “ativação”.

Figura 29. Estudo comparativo dos níveis de expressão entre as cepas produtoras de IFN- α 2a e IFN- α 2a cDNA-otimizado, em diferentes temperaturas de “ativação”.

4.2.3.5 Análise por Western Blotting de amostras de choque osmótico do IFN- α 2a

A Figura 30 apresenta análise por Western Blotting de amostras de fluído periplásmico da cepa W3110 produtora de IFN- α 2a, confirmando a atividade imunológica da proteína de interesse produzida.

Observamos também o aparecimento de proteínas com uma alta massa molecular, fato este devido a uma possível reação cruzada do anticorpo com proteínas de *Escherichia coli*.

Figura 30. Análise por Western Blotting dos fluídos periplásmicos obtidos após choque osmótico da cepa produtora de IFN- α 2a em diferentes temperaturas de cultivo; (1); choque osmótico com temperatura de cultivo de 30 °C (2); choque osmótico com temperatura de cultivo de 32 °C (3) choque osmótico com temperatura de cultivo de 35 °C; (4) choque osmótico com temperatura de cultivo de 37 °C; (5) padrão de referência CRS IFN- α 2a.

Além do IFN- α 2a na posição esperada e em conformidade com o padrão CRS, observamos também outras bandas na parte superior do Western Blotting que podem ser resultantes de agregados de IFN- α 2a ou reação inespecífica com outras proteínas de *E. coli*.

4.3 Purificação do interferon presente no fluído periplásmico

A purificação do interferon foi realizada seguindo técnicas cromatográficas descritas por Srivastava e colaboradores (2005) com modificações, e ocorreu em duas etapas:

- Foi utilizada uma coluna cromatográfica contendo resina de troca iônica, Resource Q, na qual o fluído periplásmico obtido do choque osmótico foi aplicado. O perfil cromatográfico obtido deste processo de purificação é apresentado na Figura 31;

FIGURA 31. Perfil cromatográfico obtido do fluido periplásmico obtido através de choque osmótico da cepa produtora de IFN- α 2a aplicado na coluna Resource Q, o IFN- α 2a foi eluído na fração #13 (destacada), esta por sua vez foi utilizada na segunda etapa de purificação.

Podemos observar na sobreposição dos cromatogramas da Figura 32 que esta primeira etapa de purificação foi capaz de eliminar impurezas com hidrofobicidades próximas (em azul) quando comparado com a análise do fluído periplásmico obtido através de choque osmótico (em preto) que prejudicam o processo de purificação. A segunda etapa de purificação foi realizada como descrito abaixo:

- A fração (#13) correspondente ao interferon coletada da coluna Resource Q por sua vez foi aplicada em uma coluna de Exclusão Molecular de Alta Eficiência (HPSEC).

A partir dessa segunda etapa de purificação obtivemos o interferon com um alto grau de pureza (Fig. 33).

Figura 32: Comparação por sobreposição dos cromatogramas das amostras dos choques osmóticos obtido da fermentação da cepa w3110 produtora de IFN- α 2a (preto); Padrão CRS de IFN- α 2a (vermelho); fração #13 da purificação com a coluna Resource Q (azul).

Figura 33: (A) Análise por HPSEC da fração #13 (Fig. 31) da purificação do produto de choque osmótico obtido da fermentação da cepa W3110 produtora de IFN- α 2a. (B) Análise por HPSEC do IFN- α 2a presente na fração #13 e purificada por HPSEC (parte destacada). O padrão de referência CRS IFN- α 2a apresentou um tempo de retenção de 17.43 minutos

4.4 Determinação do IFN- α 2a no fluido periplásmico por RP-HPLC

Uma metodologia que utiliza o HPLC de fase reversa (RP-HPLC) para análise qualitativa e quantitativa do IFN- α 2a já purificado ou presente no fluido periplásmico obtido por choque osmótico das cepas bacterianas foi validada quanto a precisão, exatidão e sensibilidade.

Na Figura 34 são apresentadas as análises de amostras com o padrão CRS IFN- α 2a puro, do fluido periplásmico obtido da cepa de *E. coli* W3110 não transformada (amostra “falsa”) e de uma combinação dessas duas amostras. Verificamos que nas mesmas condições de corrida as proteínas presentes no fluido periplásmico na sua maior parte são eluídas no início da corrida, observamos também a presença de algumas proteínas bacterianas com tempo de retenção (t_R) próximo a 40 minutos, e que o interferon padrão sai como um pico isolado com t_R de aproximadamente 50 minutos. Confirmamos, portanto, que a metodologia permite separar de forma satisfatória o IFN presente no fluido periplásmico das outras proteínas de *E. coli*.

Na Figura 35 é apresentada uma curva de calibração para o CRS IFN- α 2a determinada por RP-HPLC, relacionando a área do pico com a quantidade conhecida de proteína pura aplicada. A quantidade de IFN analisada compreende a faixa de 0,625 até 10 μ g de IFN. A equação da curva de calibração obtida é:

$Y_{ua} = 128,16x \mu g + 30,155$, onde “ua” são unidades arbitrárias de área. O coeficiente de correlação linear foi altamente significativo ($r = 0,9981$; para $n=18$), confirmando a linearidade da resposta obtida no intervalo analisado.

O limite de detecção (sensibilidade) da metodologia foi calculado com base no desvio padrão ($n=3$ determinações por replicata) da dose mínima usada (0,625 μ g) e da dose zero (aplicação somente do tampão). Para isso foi aplicado o teste de *Student* de acordo a formulação de Rodbard (Rodbard,1978), a sensibilidade obtida foi de 0,54 μ g (ou 0,01 μ g/mL), com um coeficiente de variação intra-ensaio de 38,76%.

Para avaliar a exatidão do método foi realizado um teste de recuperação com adição de amostra conhecida de IFN puro em amostras “falsas” de fluido

periplásmico obtido da cepa W3110 não transformada. Os resultados são apresentados na Tabela 3. A recuperação média foi de 99,3% e a correlação entre o IFN adicionado e recuperado foi: $0,96 \times \text{IFN adicionado} + 0,176$ ($r = 0,9983$, $n = 8$).

Tabela 3. Teste de recuperação de amostras conhecidas de puro IFN- α 2a adicionado em amostras de fluido periplásmico obtido da cepa W3110 não transformada.

IFN- α 2a adicionado (μg)	Área do pico (u. a.)	IFN- α 2a determinado (μg)	Recuperação (%)
10	1361.9	10,34	103,4
5	615.4	4,74	93,5
2.5	307.2	2,53	101,0
1,25	163.7	1,24	99,5

A precisão intra e inter dias da metodologia foi avaliada em um único dia e em dias diferentes utilizando amostras com CRS IFN- α 2a analisadas sobre as mesmas condições (Tabela 4).

Tabela 4. Determinações Intra- e inter-dias do IFN- α 2a avaliado por RP-HPLC no fluido periplasmático obtido do choque osmótico

Amostra	Intra-dia ^a (μg)	Inter-dias ^a (μg)
1	$10,65 \pm 0,4^b$	$10,49 \pm 2,08^c$
2	$5,07 \pm 0,6^b$	$4,63 \pm 9,96^b$
3	$2,34 \pm 1,3^b$	$2,51 \pm 13,91^b$
4	$0,92 \pm 1,6^b$	$1,08 \pm 20,95^c$

^a Dados obtidos com CRS IFN- α 2a.

^b RSD, expresso como percentagem da média, $n = 3$.

^c RSD, expresso como percentagem da média, $n = 2$.

A Figura 36 apresenta cromatogramas por RP-HPLC de algumas amostras contendo IFN- α 2a. Podemos observar no cromatograma referente ao fluído (Fig. 36A), que na posição $t_R = 48$ minutos, o pico correspondente ao padrão de IFN- α 2a apresenta também outras isoformas, possivelmente formas oxidadas ou reduzidas, o pico observado na posição $t_R = 40$ minutos, provavelmente se trata de proteínas de *E. coli*, como as observadas na amostra “falsa”.

Na Figura 36B, observamos a análise do IFN- α 2a comercial Roferon A[®], um interferon recombinante produzido pela Roche, que também é de origem bacteriana, e apresenta um pico principal e bem definido com o $t_R = 48,2$ minutos, além de algumas outras isoformas menores, inclusive no t_R de aproximadamente 40 minutos. Possivelmente esse produto seja o IFN α autêntico, sem a metionina inicial, já que o fabricante descreve que o seu produto é composto por 165 aminoácidos.

Até onde sabemos não está descrito na literatura uma metodologia por RP-HPLC para analisar o IFN- α 2a em amostras impuras. O nosso grupo de pesquisa já desenvolveu metodologia similar para análises de outras proteínas como o hGH, hPRL, hTSH, hFSH e hLH (Dalmora, 1997; Soares, 2000; Oliveira, 2003; Loureiro, 2006; Almeida, 2012), tanto na forma pura ou na presença de proteínas contaminantes. Essa metodologia apresenta muitas vantagens, a principal delas é ser uma ferramenta que possibilita uma avaliação qualitativa e quantitativa do IFN- α 2a ainda nas etapas iniciais do processo produção.

Figura 34. Análise por RP-HPLC com a coluna C₄ Vydac. **A)** CRS IFN- α 2a, (10 μ g); **B)** Fluido periplásmico da cepa de *E. coli* W3110, não transformada, amostra “falsa” (100 μ L); **C)** Amostra “falsa” (100 μ L), com adição de 5 μ g de CRS IFN- α 2a.

Figura 35. Curva de calibração para o CRS IFN- α 2a determinada por RP-HPLC, relacionando a área do pico com a quantidade de amostra pura de proteína adicionada.

Figura 36. Exemplos de cromatogramas por RP-HPLC de amostras de IFN- α 2a. **A)** Análise de 100 μ l de fluído periplásmico de cepa de *E. coli* W3110 transformada com o vetor para expressão de IFN- α 2a. **B)** Análise de IFN- α 2a comercial (Roferon A[®]).

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho confirmamos a eficiência do promotor λP_L usado de forma constitutiva na expressão das cinco proteínas estudadas. Com exceção do IFN- $\alpha 2a$ desenvolvido durante esse estudo, as outras proteínas, hGH, hPRL e os antagonistas de prolactina G129R-hPRL e $\Delta 1-9$ G129R-hPRL já haviam sido produzidas no nosso laboratório (Oliveira, 1999; Soares, 2003; Soares, 2008, Heller, 2010).

O sistema de expressão utilizado foi o mesmo desenvolvido previamente em nosso laboratório, baseado em um cassete contendo o promotor λP_L e o gene que confere resistência a ampicilina. Esse cassete de expressão gerou a patente PI0406443-7 (depositado no INPI em Novembro de 2004). Em todas as construções foi utilizado o peptídeo sinalizador DsbA. Conseguimos dessa forma comparar a expressão periplásmica das diferentes proteínas utilizando exatamente o mesmo vetor, o que é pouco comum, principalmente com o uso do promotor λP_L (Valdez-Cruz, 2010).

Confirmamos nesse estudo os resultados já relatados em Soares e colaboradores (2008) que mostraram que a expressão satisfatória da hPRL, utilizando o promotor λP_L , só foi possível com ativação a 37 °C e sem a presença do repressor pRK248clts. Essa condição reduziu a provável degradação da hPRL que ocorre enquanto esse hormônio está presente no citoplasma bacteriano, aumentando assim os rendimentos de expressão. Com base nestes resultados resolvemos não utilizar o repressor pRK248clts neste trabalho

Além de expandirmos esse achado para outras proteínas, os nossos estudos sobre o momento apropriado de ativação em relação a fase de crescimento celular mostraram, de forma inequívoca, que a ativação iniciada quando as células atingem a densidade óptica máxima de crescimento é a mais apropriada para aumentar os rendimentos de expressão. Os estudos com a expressão do hGH e hPRL (Fig. 15), apresentaram aumentos na expressão de um fator de aproximadamente dois. De fato Soares e colaboradores (2003)

relataram que a ativação utilizando cultivo em *batch* em frascos sob agitação rotacional apresentaram maiores níveis de expressão do hGH quando a DO₆₀₀ de ativação era superior a 1,5. Na verdade não só a expressão aumentava como também a qualidade do hGH obtido também melhorava. Análises por HPLC de Fase Reversa apresentaram um pico de eluição mais bem definido e com o tempo de retenção (t_R) correto em relação ao padrão. Uma das descobertas com os nossos estudos é que a ativação acima de 1,5 é ainda melhor.

A literatura confirma que a resposta na expressão de proteína de interesse é fortemente influenciada pela fase de crescimento bacteriano na qual ocorre o aumento de temperatura (ativação do promotor) (Makrides, 1996; Babu, 2000; Babaeipour, 2013; Papaneophytou e Kontopidis, 2014; Rosano e Ceccarelli, 2014). Babu e colaboradores (2000) relataram um aumento na produção de interferon α utilizando a fase de crescimento estacionária.

A eficácia do uso da fase estacionária de crescimento pode ainda ser melhorada pelo emprego de estratégias de otimização do processo, as abordagens mais populares utilizadas são a utilização de diferentes promotores que regulam os níveis de expressão, diferentes meios de cultivo, códons raros e diferentes temperaturas de cultivo (Choi, 2006).

A *Escherichia coli* é um dos mais populares hospedeiros para a produção de proteínas recombinantes, contudo muitos genes podem não ser expressos de forma eficiente neste hospedeiro, isso é devido às características estruturais únicas e sutis da sequência do gene, a estabilidade e eficiência da tradução do RNA mensageiro (mRNA) (Srivastava, 2005). Algumas proteínas terapêuticas de origem heteróloga podem necessitar de manipulação na sua sequência de genes, pois, muitas proteínas humanas contêm códons que são raros, em *E. coli*, levando a uma expressão ineficiente neste hospedeiro (Choi, 2006).

Exemplos de códons raros em *E. coli* são: Arginina (AGG/ AGA/ CGA), Leucina (CUA) e Prolina (CCC), o uso destes códons pode diminuir significativamente a expressão e a qualidade da proteína sintetizada (Srivastava, 2005; Choi, 2006). Com base nestes relatos, resolvemos desenvolver também o IFN- α 2a com os códons otimizados seguindo o trabalho de Srivastava e colaboradores (2005).

A introdução dos vetores que expressam o IFN- α 2a (uma proteína de alto valor agregado e de importante aplicação terapêutica) foi interessante e valorizou

os nossos estudos sobre a influência da temperatura na expressão de proteínas heterólogas. Nesse trabalho realizamos um estudo adicional que foi estudar a expressão da mesma proteína (IFN- α 2a) utilizando dois cDNAs diferentes, um natural e o outro com os códons otimizados. Os vetores foram chamados de λP_L -DsbA-IFN α 2a e λP_L -DsbA-IFN α 2a cDNA-otimizado (Fig. 5 e 7 respectivamente).

Nos estudos com o promotor λP_L constitutivo, apesar da expressão ser teoricamente contínua, continuamos empregando o termo “ativação” para indicar o momento no qual a temperatura é elevada para o “início” da expressão. Embora em teoria esse termo “ativação” não faça muito sentido quando a expressão é constitutiva, na prática temperaturas mais baixas tendem a diminuir a ação do promotor λP_L como relatado por Valdez-Cruz e colaboradores (2010). Temperaturas de cultivo mais baixas também são importantes para preservar a estabilidade do vetor evitando as perdas por segregação (Menart, 2003).

Soares e colaboradores (2008) para demonstrar a estabilidade do vetor λP_L na expressão constitutiva da hPRL testaram o crescimento contínuo a 30 °C da cepa W3110 contendo o vetor de expressão λP_L -DsbA-hPRL por pelo menos 40 gerações, sem perda significativa da expressão. De fato a ausência do repressor pode levar à perda do plasmídeo (Caulcott e Rhodes, 1986). Por segurança e para minimizar as perdas por segregação do plasmídeo adotamos em nossos estudos como padrão inicial de crescimento bacteriano a temperatura de 30 °C com 100 μ g/mL de ampicilina no meio de cultura.

Nos nossos estudos com diferentes temperaturas de “ativação”, o que buscamos na realidade é uma condição de equilíbrio entre a taxa de expressão de proteína de interesse e a taxa de degradação decorrente da labilidade térmica dessa mesma proteína quando presente no citoplasma bacteriano de forma a obter a expressão máxima, como postulado por Lowman e Bina (1990).

Um dos pontos fracos de se utilizar promotores termo-induzidos é a necessidade de altas temperaturas para se iniciar o processo de indução durante a fermentação, o que pode levar ao estresse celular e consequentemente dar início a uma atividade proteolítica dentro do citoplasma bacteriano, por consequência levar a uma produtividade inaceitavelmente baixa (Menart, 2003, Valdez-Cruz, 2010). Valdez-Cruz e colaboradores (2010) relataram que o promotor λP_L quando submetido a uma des-repressão a temperaturas acima de

42 °C a propagação de células que perderam o plasmídeo é favorecida, pois esta temperatura favorece uma instabilidade do plasmídeo.

A primeira proteína testada em relação a sua expressão foi a prolactina humana. Comparando a quantidade de hPRL produzida nas diferentes temperaturas de “ativação” propostas aqui neste trabalho, demonstramos que a secreção periplásmica da hPRL, sob o controle do promotor λP_L de forma constitutiva, foi mais eficiente na temperatura de 35 °C, como pode ser observado na Tabela 2. Exemplos da determinação quantitativa e qualitativa por RP-HPLC da hPRL pode ser observada na Figura 16. Observamos também no Western Blotting da Figura 17 que em temperaturas superiores a 35 °C aumenta a degradação da proteína produzida e consequentemente uma diminuição na secreção da proteína no periplasma. Provavelmente esta diminuição é um resultado da labilidade térmica da hPRL e/ou do aumento da atividade de proteases no espaço periplásmico (Caulcott e Rhodes, 1986, Makrides, 1996), confirmamos portanto como relatado por Soares (2008), a prolactina quando presente no citoplasma é instável quando submetida a temperaturas mais elevadas.

Lowman & Bina (1990) descrevem em seu trabalho que os níveis da proteína heteróloga acumulada podem ser o resultado do equilíbrio entre a taxa de síntese proteica e a taxa de degradação. Observamos que para a prolactina humana recombinante produzida neste estudo esse equilíbrio poderia ser particularmente a favor da temperatura de 35 °C.

Comparando os nossos dados com os de Soares e colaboradores (2008), a nova condição de cultivo resultou em um aumento da expressão de 63%, $1,46 \pm 0,8\%$ $\mu\text{ghPRL/mL/DO}_{600}$ (na temperatura de 35 °C) obtido nesse estudo contra $0,92 \pm 0,1\%$ $\mu\text{g hPRL/mL/DO}_{600}$ (na temperatura de 37 °C) obtido no estudo de 2008. A principal diferença entre os dois estudos é o aumento da densidade óptica de “ativação”, o que parece ter colaborado a favor da expressão a 35 °C.

Assim como feito para a prolactina humana seguimos o estudo, só que desta vez, estudando a influência da temperatura de cultivo com as cepas produtoras dos antagonistas de prolactina o G129R-hPRL e o $\Delta 1-9$ G129R-hPRL. Podemos verificar no gráfico da Figura 18 que temperaturas abaixo de 37 °C mostraram um resultado satisfatório na secreção do antagonista G129R-hPRL, não havendo uma diferença estatisticamente significativa quando comparadas as

temperaturas de 30, 32, 35 e 37 °C, mas podemos observar que a temperatura de 42 °C também é altamente desfavorável para a produção do antagonista G129R-hPRL assim como para a prolactina. O antagonista Δ 1-9 G129R-hPRL mostrou um comportamento similar ao da prolactina humana, onde podemos observar que o melhor nível de secreção obtido foi com a temperatura de 35 °C, contudo esta proteína mostrou-se ser ainda mais instável quando comparamos com a prolactina humana, pois podemos observar no gráfico da Figura 19 que na temperatura de 37 °C a produtividade cai drasticamente de aproximadamente 0,8 para 0,3 μ ghPRL/mL/DO₆₀₀ (redução de 62,5%) enquanto que no caso da hPRL foi de 1,46 para 0,8 μ ghPRL/mL/DO₆₀₀ (redução de 42,3%) fato este não observado na temperatura de 37 °C para a prolactina.

Continuando a mesma linha de estudo seguimos para o teste de produtividade com diferentes temperaturas para o hormônio do crescimento humano, o hGH. Diferentemente dos dados obtidos com o estudo de temperaturas para a hPRL, mostrados na Tabela 2 e os antagonistas (Fig. 18 e 19), verificamos na Figura 22 que o hormônio do crescimento humano apresenta uma maior estabilidade em relação a temperatura, não sendo facilmente degradado em temperaturas mais elevadas, fato este já esperado, pois como relatado por Soares e colaboradores (2008) foi possível realizar uma produção desta proteína utilizando o sistema com o repressor pRK248clts (com “ativação” a 42 °C). Contudo podemos observar que mesmo esta proteína sendo mais estável em temperaturas mais elevadas o melhor resultado de secreção da proteína foi com 37 °C com aproximadamente 1,8 μ ghPRL/mL/DO₆₀₀. Curiosamente, no trabalho de Soares e colaboradores (2008), foi estudada a expressão do hGH no vetor sem o repressor, porém mantendo a “ativação” a 42 °C, e a expressão foi de 1,6 μ ghGH/mL/DO₆₀₀, sugerindo que naquele estudo mesmo a 42 °C o repressor não havia sido totalmente inativado, o que pode ter resultado a expressão menor 1,31 μ ghGH/mL/DO₆₀₀.

Para estudar a expressão do IFN- α 2a foi necessário desenvolver uma metodologia baseado no HPLC de fase reversa, essa metodologia baseada na alta hidrofobicidade da molécula de IFN- α 2a em comparação com as proteínas de *E. coli* foi similar a aquelas desenvolvidas em nosso laboratório para a hPRL (Soares, 2002) e hGH (Dalmora, 1997).

Uma resolução adequada entre as proteínas constituintes do fluído periplásmico e o IFN- α 2a foi obtido utilizando uma coluna C₄ Vydac em um pH neutro e com *steps* de acetonitrila (Fig 34 e Tabela 1). Essa técnica possibilitou a visualização pela primeira vez do extrato bruto do interferon α 2a e interferon α 2a cDNA-otimizado (Fig. 25 e 26). Essa metodologia será uma importante ferramenta para futuros estudos na comparação da hidrofobicidade do interferon glicosilado com o não glicosilado, com moléculas obtidas de outras preparações ou com algumas variantes como o IFN- α 2b, interferon com metionina adicional e ainda para analisar presença de isoformas oxidadas, reduzidas, etc. Ghazaly e colaboradores (2013) descrevem em seu trabalho uma quantificação de interferon α 2a peguilado (PEG₂₀-IFN- α 2a) utilizando uma coluna nucleosil C₈ por RP-HPLC, neste trabalho eles utilizaram o padrão CRS IFN- α 2a que não é peguilado para produzirem uma preparação *in-house* de referência para analisarem o produto peguilado.

Uma vez padronizado o método por RP-HPLC para a análise do padrão CRS IFN- α 2a seguimos para a análise dos fluídos periplásmicos obtidos a partir de diferentes temperaturas de cultivo das cepas produtoras de IFN- α 2a e IFN- α 2a cDNA-otimizado. Os resultados referentes a esses estudos podem ser observados nas Figuras 27 e 28. A expressão do IFN- α 2a foi maior quando realizada em temperaturas mais amenas, como 30 e 32 °C, não havendo diferença significativa entre estas duas temperaturas, contudo quando comparamos com temperaturas mais altas, como 37 °C observamos uma perda significativa na expressão da proteína, aproximadamente de 65 %.

Já a cepa produtora do IFN- α 2a cDNA-otimizado apresentou uma melhora gradativa quando a produção foi realizada com temperaturas mais baixas. Podemos observar no gráfico da Figura 28 que quanto menor a temperatura maior a produtividade. Assim como observado para o IFN- α 2a o IFN- α 2a cDNA-otimizado apresenta uma diferença significativa quando comparada a temperatura de 30 com 37 °C, aproximadamente de 73 %.

A modificação da sequência de códons raros em *Escherichia coli* na sequência do gene do interferon resultou em 58,78 % de diferença quando comparado com a sequência nativa desta proteína (Fig. 8). Esta modificação na estrutura da sequência de aminoácidos do interferon resultou em um aumento de

aproximadamente 10 % na expressão da proteína, como pode ser observado no gráfico da Figura 29.

Portanto, no nosso estudo o IFN- α 2a se mostrou bem sensível à temperatura de cultivo, e a temperatura de 30 °C se mostrou a mais apropriada para expressar essa proteína em bactérias *E. coli*. Outro trabalho que relata a síntese do IFN- α *consensus* em corpos de inclusão também utiliza a temperatura de 30 °C para expressar essa proteína (Neves, 2004).

Na literatura temos relatos da síntese do IFN- α com o uso do promotor λP_L na presença do repressor e com ativação realizada a 42 °C, em todos os casos a expressão é sempre no citoplasma, portanto com formação de corpos de inclusão, nesses casos provavelmente os corpos de inclusão servem de proteção contra as proteases minimizando os efeitos deletérios dessas proteases na degradação do IFN (Babu, 2000; Srivastava, 2005).

Padronizamos também uma nova técnica de purificação para essa proteína produzida em nosso laboratório. A purificação do interferon foi realizada seguindo técnicas cromatográficas descritas por Srivastava e colaboradores (2005) com modificações, e ocorreu em duas etapas, onde primeiro utilizamos uma coluna cromatográfica contendo resina de troca iônica, Resource Q, na qual o fluído periplásmico obtido do choque osmótico foi aplicado. A fração contendo a maior porcentagem do produto foi selecionada e utilizada na segunda etapa de purificação que foi realizada com o auxílio de coluna de Exclusão Molecular de Alta Eficiência (HPSEC). A partir dessa segunda etapa de purificação obtivemos o interferon com um alto grau de pureza (Fig. 33).

6 CONCLUSÕES

- O uso do promotor λP_L de forma constitutiva mostrou ser eficiente na expressão das cinco proteínas estudadas.
- A expressão da proteína de interesse é fortemente influenciada pela fase de crescimento na qual ocorre a ativação do promotor. A produtividade específica conseguida neste trabalho foi obtida através da ativação do promotor quando o hospedeiro atingiu a fase estacionária de crescimento.
- As otimizações realizadas possibilitaram melhora significativa nos níveis de expressão das proteínas estudadas.
- Os nossos estudos abrem a perspectiva da aplicação dessa metodologia para expressão de outras proteínas, e também mostra que em cada caso é necessário um estudo particular buscando otimizar as melhores condições de expressão
- Foram construídos com sucesso os vetores para a expressão do IFN α -2a e IFN α -2a cDNA-otimizado.
- Foi desenvolvida a metodologia de análise por RP-HPLC para o IFN α -2a que possibilita a análise de produto puro ou presente no extrato bruto de fluído periplásmico.
- Obtivemos a caracterização do IFN α -2a por RP-HPLC, SDS-PAGE e Western Blotting em comparação com o padrão CRS.
- A diferença de 58,78% dos códons no gene do IFN α -2a otimizado quando comparado com o IFN α -2a mostrou um aumento de aproximadamente 10% na produtividade específica.

- O uso de temperaturas mais baixas pode influenciar positivamente na expressão das proteínas, principalmente se as mesmas tendem a ser mais termo-lábeis, como no caso da hPRL e do IFN- α 2a.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AGGARWAL, R. S. What's fueling the biotech engine-2012 to 2013. **Nat Biotechnol**, v.32, n.1, p.32-9, 2014.
- 2 ALATZOGLOU, K. S.; WEBB, E. A.; LE TISSIER, P.; DATTANI, M. T. Isolated growth hormone deficiency (GHD) in childhood and adolescence: recent advances. **Endocr Rev**, v.35, n.3, p.376-432, 2014.
- 3 ALBA, M.; FINTINI, D.; SALVATORI, R. Effects of recombinant mouse growth hormone treatment on growth and body composition in GHRH knock out mice. **Growth Horm IGF Res**, v.15, n.4, p.275-82, 2005.
- 4 ALCAMI, A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. **Nat Rev Immunol**, v.3, n.1, p.36-50, 2003.
- 5 ALMEIDA, B. E.; OLIVEIRA, J. E.; DAMIANI, R.; DALMORA, S. L.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. Qualitative and quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein hormones in the presence of a large excess of human serum albumin. **J Pharm Biomed Anal**, v.63, p.160-4, 2012.
- 6 BABAEIPOUR, V.; SHOJAOSADATI, S. A.; MAGHSOUDI, N. Maximizing Production of Human Interferon-gamma in HCDC of Recombinant E. coli. **Iran J Pharm Res**, v.12, n.3, p.563-72, 2013.
- 7 BABU, K. R.; SWAMINATHAN, S.; MARTEN, S.; KHANNA, N.; RINAS, U. Production of interferon-alpha in high cell density cultures of recombinant Escherichia coli and its single step purification from refolded inclusion body proteins. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.53, n.6, p.655-60, 2000.
- 8 BANEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Curr Opin Biotechnol**, v.10, n.5, p.411-21, 1999.
- 9 BARON, S. Collected Papers on Endogenous Interferon Deficiencies - Introduction. **J Interferon Res**, p.1-1, 1992.
- 10 BEN-JONATHAN, N.; MERSHON, J. L.; ALLEN, D. L.; STEINMETZ, R. W. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. **Endocr Rev**, v.17, n.6, p.639-69, 1996.

- 11 BERNARD, V.; YOUNG, J.; CHANSON, P.; BINART, N. New insights in prolactin: pathological implications. **Nat Rev Endocrinol**, v.11, n.5, p.265-275, 2015.
- 12 BERNICHTEIN, S.; JEAY, S.; VAUDRY, R.; KELLY, P. A.; GOFFIN, V. New homologous bioassays for human lactogens show that agonism or antagonism of various analogs is a function of assay sensitivity. **Endocrine**, v.20, n.1-2, p.177-189, 2003.
- 13 BOLE-FEYSOT, C.; GOFFIN, V.; EDERY, M.; BINART, N.; KELLY, P. A. Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. **Endocr Rev**, v.19, n.3, p.225-268, 1998.
- 14 BOWEN, B.; STEINBERG, J.; LAEMMLI, U. K.; WEINTRAUB, H. The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. **Nucleic Acids Res**, v.8, n.1, p.1-20, 1980.
- 15 CAULCOTT, C.; RHODES, M. Temperature-induced synthesis of recombinant proteins. **Trends in Biotechnol**, v.4, n.6, p.142-146, 1986.
- 16 CHEN, S. S.; CHEN, K. K.; LIN, A. T. L.; CHANG, Y. H.; WU, H. H.; CHANG, L. S. The correlation between pretreatment serum hormone levels and treatment outcome for patients with prostatic cancer and bony metastasis. **Bju International**, v.89, n.7, p.710-713, 2002.
- 17 CHEN, T. J.; KUO, C. B.; TSAI, K. F.; LIU, J. W.; CHEN, D. Y.; WALKER, A. M. Development of recombinant human prolactin receptor antagonists by molecular mimicry of the phosphorylated hormone. **Endocrinology**, v.139, n.2, p.609-616, 1998.
- 18 CHEN, W. Y.; CHEN, N. Y.; YUN, J.; WIGHT, D. C.; WANG, X. Z.; WAGNER, T. E.; KOPCHICK, J. J. Amino-Acid-Residues in the 3rd Alpha-Helix of Growth-Hormone Involved in Growth-Promoting Activity. **Mol Endocrinol**, v.9, n.3, p.292-302, 1995.
- 19 CHEN, W. Y.; RAMAMOORTHY, P.; CHEN, N. Y.; STICCA, R.; WAGNER, T. E. A human prolactin antagonist, hPRL-G129R, inhibits breast cancer cell proliferation through induction of apoptosis. **Clin Cancer Res**, v.5, n.11, p.3583-3593, 1999.
- 20 CHOI, J.; KEUM, K.; LEE, S. Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli. **Cheml Eng Sci**, v.61, n.3, p.876-885, 2006.
- 21 DALMORA, S.; OLIVEIRA, J. E.; AFFONSO, R.; GIMBO, E.; RIBELA, M. T.; BARTOLINI, P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **J Chromatogr A**, v.782, n.2, p.199-210, 1997.

- 22 DAS, P.; MEYER, L.; SEYFERT, H. M.; BROCKMANN, G.; SCHWERIN, M. Structure of the growth hormone-encoding gene and its promoter in mice. **Gene**, v.169, n.2, p.209-13, 1996.
- 23 EL GHAZALY, M.; MEAGER, A.; ZIKRY, H.; EBAED, M.; SHAKER, S.; MUELLER, F.; ROHDE, J. Quantification of a pegylated interferon-alpha2a product by a customised and validated reverse phase-high performance liquid chromatography method. **J Pharm Biomed Anal**, v.84, p.48-52, 2013.
- 24 FELD, J. J.; HOOFNAGLE, J. H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. **Nature**, v.436, n.7053, p.967-972, 2005.
- 25 FERRARIS, J.; BERNICHTEIN, S.; PISERA, D.; GOFFIN, V. Use of prolactin receptor antagonist to better understand prolactin regulation of pituitary homeostasis. **Neuroendocrinology**, v.98, n.3, p.171-9, 2013.
- 26 FREEMAN, M. E.; KANYICKSKA, B.; LERANT, A.; NAGY, G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiol Rev**, v.80, n.4, p.1523-631, 2000.
- 27 FUH, G.; CUNNINGHAM, B. C.; FUKUNAGA, R.; NAGATA, S.; GOEDEL, D. V.; WELLS, J. A. Rational Design of Potent Antagonists to the Human Growth-Hormone Receptor. **Science**, v.256, n.5064, p.1677-1680, 1992.
- 28 GINSBURG, E.; VONDERHAAR, B. K. Prolactin Synthesis and Secretion by Human Breast-Cancer Cells. **Cancer Res**, v.55, n.12, p.2591-2595, 1995.
- 29 GOFFIN, V.; BERNICHTEIN, S.; TOURAINE, P.; KELLY, P. A. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. **Endocr Rev**, v.26, n.3, p.400-422, 2005.
- 30 GOFFIN, V.; BINART, N.; TOURAINE, P.; KELLY, P. A. Prolactin: The new biology of an old hormone. **Annu Rev Physiol**, v.64, p.47-67, 2002.
- 31 GOFFIN, V.; STRUMAN, I.; MAINFROID, V.; KINET, S.; MARTIAL, J. A. Evidence for a 2nd Receptor-Binding Site on Human Prolactin. **J Biol Chem**, v.269, n.51, p.32598-32606, 1994.
- 32 HELLER, S. R.; GOULART, H. R.; ARTHUSO, F. S.; OLIVEIRA, T. L.; BARTOLINI, P.; SOARES, C. R. Synthesis, purification and characterization of recombinant glycosylated human prolactin (G-hPRL) secreted by cycloheximide-treated CHO cells. **J Biotechnol**, v.145, n.4, p.334-40, 2010.
- 33 IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. Regulation of type I interferon responses. **Nat Rev Immunol**, v.14, n.1, p.36-49, 2014.

- 34 JOMAIN, J. B.; TALLET, E.; BROUTIN, I.; HOOS, S.; VAN AGTHOVEN, J.; DUCRUIX, A.; KELLY, P. A.; KRAGELUND, B. B.; ENGLAND, P.; GOFFIN, V. Structural and thermodynamic bases for the design of pure prolactin receptor antagonists: X-ray structure of Del1-9-G129R-hPRL. **J Biol Chem**, v.282, n.45, p.33118-31, 2007.
- 35 KLAUS, W.; GSELL, B.; LABHARDT, A. M.; WIPF, B.; SENN, H. The three-dimensional high resolution structure of human interferon alpha-2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. **J Mol Biol**, v.274, n.4, p.661-675, 1997.
- 36 KOSHLAND, D.; BOTSTEIN, D. Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. **Cell**, v.20, n.3, p.749-60, 1980.
- 37 KOTENKO, S. V.; GALLAGHER, G.; BAURIN, V. V.; LEWIS-ANTES, A.; SHEN, M.; SHAH, N. K.; LANGER, J. A.; SHEIKH, F.; DICKENSHEETS, H.; DONNELLY, R. P. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nat Immunol**, v.4, n.1, p.69-77, 2003.
- 38 LI, M.; LIU, X.; ZHOU, Y.; SU, S. B. Interferon-lambdas: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. **J Leukoc Biol**, v.86, n.1, p.23-32, 2009.
- 39 LIBERMAN, B.; CUKIER, A. **Fisiologia e Fisiopatologia do Hormônio de Crescimento**: Lemos Editorial. 2004. 419 p.
- 40 LLOVERA, M.; PICHARD, C.; BERNICHTEIN, S.; JEAY, S.; TOURAINE, P.; KELLY, P. A.; GOFFIN, V. Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit hPRL-activated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. **Oncogene**, v.19, n.41, p.4695-4705, 2000.
- 41 LOUREIRO, R. F.; DE OLIVEIRA, J. E.; TORJESSEN, P. A.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. Analysis of intact human follicle-stimulating hormone preparations by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr A**, v.1136, n.1, p.10-8, 2006.
- 42 LOWMAN, H. B.; BINA, M. Temperature-mediated regulation and downstream inducible selection for controlling gene expression from the bacteriophage lambda pL promoter. **Gene**, v.96, n.1, p.133-6, 1990.
- 43 MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. **Microbiol Rev**, v.60, n.3, p.512-38, 1996.
- 44 MENART, V.; FONDA, I.; KENIG, M.; POREKAR, V. G. Increased in vitro cytotoxicity of TNF-alpha analog LK-805 is based on the interaction with cell surface heparan sulfate proteoglycan. **Ann N Y Acad Sci**, v.973, p.194-206, 2003.

- 45 NEVES, F. O.; HO, P. L.; RAW, I.; PEREIRA, C. A.; MOREIRA, C.; NASCIMENTO, A. L. Overexpression of a synthetic gene encoding human alpha interferon in Escherichia coli. **Protein Expr Purif**, v.35, n.2, p.353-9, 2004.
- 46 OLIVEIRA, J. E.; DE MENDONCA, F.; PERONI, C. N.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. Determination of Chinese hamster ovary cell-derived recombinant thyrotropin by reversed-phase liquid chromatography. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v.787, n.2, p.345-55, 2003.
- 47 OLIVEIRA, J. E.; SOARES, C. R. J.; PERONI, C. N.; GIMBO, E.; CAMARGO, I. M. C.; MORGANTI, L.; BELLINI, M. H.; AFFONSO, R.; ARKATEN, R. R.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M. T. C. P. High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in Escherichia coli periplasmic space. **J Chromatogr A**, v.852, n.2, p.441-450, 1999.
- 48 ORMANDY, C. J.; CAMUS, A.; BARRA, J.; DAMOTTE, D.; LUCAS, B.; BUTEAU, H.; EDERY, M.; BROUSSE, N.; BABINET, C.; BINART, N.; KELLY, P. A. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. **Genes Dev**, v.11, n.2, p.167-78, 1997.
- 49 PAPANEOPHYTOU, C. P.; KONTOPIDIS, G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in Escherichia coli: a general review. **Protein Expr Purif**, v.94, p.22-32, 2014.
- 50 PESTKA, S. The Human Interferons - from Protein-Purification and Sequence to Cloning and Expression in Bacteria - before, between, and Beyond. **Arch Biochem Biophys**, v.221, n.1, p.1-37, 1983.
- 51 PESTKA, S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. **J Biol Chem**, v.282, n.28, p.20047-51, 2007.
- 52 PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunol Rev**, v.202, p.8-32, 2004.
- 53 PFEFFER, L. M.; DINARELLO, C. A.; HERBERMAN, R. B.; WILLIAMS, B. R. G.; BORDEN, E. C.; BORDENS, R.; WALTER, M. R.; NAGABHUSHAN, T. L.; TROTTA, P. P.; PESTKA, S. Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. **Cancer Res**, v.58, n.12, p.2489-2499, 1998.
- 54 PRICE, A. E.; LOGVINENKO, K. B.; HIGGINS, E. A.; COLE, E. S.; RICHARDS, S. M. Studies on the microheterogeneity and in vitro activity of glycosylated and nonglycosylated recombinant human prolactin separated using a novel purification process. **Endocrinology**, v.136, n.11, p.4827-33, 1995.
- 55 PROKUNINA-OLSSON, L.; MUCHMORE, B.; TANG, W.; PFEIFFER, R. M.; PARK, H.; DICKENSHEETS, H.; HERGOTT, D.; PORTER-GILL, P.;

- MUMY, A.; KOHAAR, I.; CHEN, S.; BRAND, N.; TARWAY, M.; LIU, L.; SHEIKH, F.; ASTEMBORSKI, J.; BONKOVSKY, H. L.; EDLIN, B. R.; HOWELL, C. D.; MORGAN, T. R.; THOMAS, D. L.; REHERMANN, B.; DONNELLY, R. P.; O'BRIEN, T. R. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. **Nat Genet**, v.45, n.2, p.164-71, 2013.
- 56 REYNOLDS, C.; MONTONE, K. T.; POWELL, C. M.; TOMASZEWSKI, J. E.; CLEVINGER, C. V. Expression of prolactin and its receptor in human breast carcinoma. **Endocrinology**, v.138, n.12, p.5555-5560, 1997.
- 57 RICHARDS, S. M.; GARMAN, R. D.; KEYES, L.; KAVANAGH, B.; MCPHERSON, J. M. Prolactin is an antagonist of TGF-beta activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomas. **Cell Immunol**, v.184, n.2, p.85-91, 1998.
- 58 RIGGIN, R. M.; SHAAR, C. J.; DORULLA, G. K.; LEFEBER, D. S.; MINER, D. J. High-performance size-exclusion chromatographic determination of the potency of biosynthetic human growth hormone products. **J Chromatogr**, v.435, n.2, p.307-18, 1988.
- 59 ROBINSON, M.; LILLEY, R.; LITTLE, S.; EMTAGE, J. S.; YARRANTON, G.; STEPHENS, P.; MILLICAN, A.; EATON, M.; HUMPHREYS, G. Codon usage can affect efficiency of translation of genes in Escherichia coli. **Nucleic Acids Res**, v.12, n.17, p.6663-71, 1984.
- 60 RODBARD, D. Statistical Estimation of the Minimal Detectable Concentration ("Sensitivity") for Radioligand Assays. **Anal Biochem**, v. 90, p.1-12, 1978.
- 61 RODRIGUES GOULART, H.; ARTHUSO F, S.; CAPONE, M. V.; OLIVEIRA, T. L.; BARTOLINI, P.; SOARES, C. R. Enhancement of human prolactin synthesis by sodium butyrate addition to serum-free CHO cell culture. **J Biomed Biotechnol**, v.2010, p.405872, 2010.
- 62 ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Front Microbiol**, v.5, p.172, 2014.
- 63 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v.1, 2 ed, p.6.36-6.44, 1989.
- 64 SCHNEIDER, W. M.; CHEVILLOTTE, M. D.; RICE, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. **Annu Rev Immunol**, v.32, p.513-45, 2014.
- 65 SHELIKOFF, M.; SINSKEY, A. J.; STEPHANOPOULOS, G. The effect of protein synthesis inhibitors on the glycosylation site occupancy of

- recombinant human prolactin. **Cytotechnology**, v.15, n.1-3, p.195-208, 1994.
- 66 SHEPPARD, P.; KINDSVOGEL, W.; XU, W.; HENDERSON, K.; SCHLUTSMEYER, S.; WHITMORE, T.E.; KUESTNER, R.; GARRIGUES, U.; BIRKS, C.; RORABACK, J.; OSTRANDER, C.; DONG, D.; SHIN, J.; PRESNELL, S.; FOX, B.; HALDEMAN, B.; COOPER, E.; TAFT, D.; GILBERT, T.; GRANT, F.J.; TACKETT, M.; KRIVAN, W.; MCKNIGHT, G.; CLEGG, C.; FOSTER, D.; KLUCHER, K.M. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. **Nat Immunol**, v. 4, n. 1, p. 63-68, 2003.
 - 67 SINHA, Y. N. Structural Variants of Prolactin - Occurrence and Physiological Significance. **Endocr Rev**, v.16, n.3, p.354-369, 1995.
 - 68 SOARES, C. R.; CAMARGO, I. M.; MORGANTI, L.; GIMBO, E.; EZEQUIEL DE OLIVEIRA, J.; LEGOUX, R.; FERRARA, P.; BARTOLINI, P. Reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of prolactin in bacterial extracts and in its purified form. **J Chromatogr A**, v.955, n.2, p.229-36, 2002.
 - 69 SOARES, C. R.; UEDA, E. K.; OLIVEIRA, T. L.; GOMIDE, F. I.; HELLER, S. R.; BARTOLINI, P. Distinct human prolactin (hPRL) and growth hormone (hGH) behavior under bacteriophage lambda PL promoter control: temperature plays a major role in protein yields. **J Biotechnol**, v.133, n.1, p.27-35, 2008.
 - 70 SOARES, C. R. J.; GOMIDE, F. I. C.; UEDA, E. K. M.; BARTOLINI, P. Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the lambda P-L promoter: use of HPLC for product quantification. **Protein Eng**, v.16, n.12, p.1131-1138, 2003.
 - 71 SOARES, C. R. J.; MORGANTI, L.; MILOUX, B.; LUPKER, J. H.; FERRARA, P.; BARTOLINI, P. High-level synthesis of human prolactin in Chinese-hamster ovary cells. **Biotechnol Appl Biochem**, v.32, p.127-135, 2000.
 - 72 SRIVASTAVA, P.; BHATTACHARAYA, P.; PANDEY, G.; MUKHERJEE, K. J. Overexpression and purification of recombinant human interferon alpha2b in Escherichia coli. **Protein Expr Purif**, v.41, n.2, p.313-22, 2005.
 - 73 SUZUKI, M. F.; ARTHUSO, F. S.; OLIVEIRA, J. E.; OLIVEIRA, N. A. J.; GOULART, H. R.; CAPONE, M. V. N.; RIBELA, M. T. C. P.; BARTOLINI, P.; SOARES, C. R. J. Expression, purification, and characterization of authentic mouse prolactin obtained in Escherichia coli periplasmic space. **Biotechnol Appl Biochem**, v.59, n.3, p.178-185, 2012.
 - 74 THITINAN, S.; MCCONVILLE, J. T. Interferon alpha delivery systems for the treatment of hepatitis C. **Int J Pharm**, v.369, n.1-2, p.121-135, 2009.

- 75 TRITOS, N. A.; MANTZOROS, C. S. Recombinant human growth hormone: Old and novel uses. **Am J Med**, v.105, n.1, p.44-57, 1998.
- 76 VALDEZ-CRUZ, N. A.; CASPETA, L.; PEREZ, N. O.; RAMIREZ, O. T.; TRUJILLO-ROLDAN, M. A. Production of recombinant proteins in E. coli by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. **Microb Cell Fact**, v.9, p.18, 2010.
- 77 VAN WEZEL, A. L. Cultivation of Anchorage-Dependent Cells and Their Applications. **J. Chem. Tech. Biotech**, v.32, n.1, p.318-323, 1982.
- 78 WALKER, A. M. Phosphorylated and Nonphosphorylated Prolactin Isoforms. **Trends Endocrinol Metab**, v.5, n.5, p.195-200, 1994.
- 79 WALKER, A. M. Unmodified and phosphorylated prolactin and gamma delta T cell development and function. **Lupus**, v.10, n.10, p.735-41, 2001.
- 80 WALKER, A. M. S179D prolactin: antagonistic agony! **Mol Cell Endocrinol**, v.276, n.1-2, p.1-9, 2007.
- 81 WOODY, M.A.; WELNIAK, R.; SUN, Z.G.; TIAN, M.; HENRY, S.; RICHARDS, A. RIZIUDDIN, D.L.; MURPHY, W.J. Prolactin exerts hematopoietic growth-promoting effects in vivo and partially counteracts myelosuppression by azidothymidine. **Exp Hematol**, v.27, n.5, p. 811-816, 1999.
- 82 XU, J.; SUN, D.; JIANG, J.; DENG, L.; ZHANG, Y.; YU, H.; BAHL, D.; LANGENHEIM, J. F.; CHEN, W. Y.; FUCHS, S. Y.; FRANK, S. J. The role of prolactin receptor in GH signaling in breast cancer cells. **Mol Endocrinol**, v.27, n.2, p.266-79, 2013.
- 83 XU, X. L.; WU, W.; WILLIAMS, V.; KHONG, A.; CHEN, Y. H.; DENG, C. H.; WALKER, A. M. Opposite effects of unmodified prolactin and a molecular mimic of phosphorylated prolactin on morphology and the expression of prostate specific genes in the normal rat prostate. **Prostate**, v.54, n.1, p.25-33, 2003.