



CNEN/SP

**ipen** Instituto de Pesquisas  
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO

# PRODUÇÃO DE PROLACTINA HUMANA AUTÊNTICA POR TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE

**LIGIA ELY MORGANTI FERREIRA DIAS**

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

Orientador:  
Dr. Paolo Bartolini

São Paulo  
1993

**PRODUÇÃO DE PROLACTINA HUMANA AUTÊNTICA POR  
TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE**

**LIGIA ELY MORGANTI FERREIRA DIAS**

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

**Orientador: Dr. Paolo Bartolini**



**São Paulo  
1993**

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao Dr. Paolo Bartolini pela orientação;*

*Aos colegas da Supervisão de Radioensaios pela participação e apoio na realização deste trabalho;*

*Ao Dr. Michael Smith, Dr. Peter Gout e à Dra. Daniela Toniolo pela colaboração, auxílio e por terem me cedido as dependências e recursos dos respectivos laboratórios;*

*Ao Dr. José Roberto Rogero pelo apoio;*

*Ao CNPq pela concessão de bolsa de doutorado;*

*À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.*

***Produção de Prolactina Humana Autêntica por Técnicas de DNA Recombinante***

**Ligia Ely Morganti Ferreira Dias**

**RESUMO**

No presente trabalho foi realizada a seleção para o cDNA de Prolactina humana (hPRL) de uma genoteca de cDNA hipofisário construída em fagos- $\lambda$ gt10 utilizando como sonda o cDNA de prolactina de rato e um oligonucleotídeo sintético. Após a obtenção e seqüenciamento do gene de hPRL, o mesmo foi utilizado para a construção de quatro vetores plasmídicos visando a expressão de hPRL em bactérias Escherichia coli transformadas:

- a) p $\beta$ 23hPRL2 - Este plasmídeo possui o gene da hPRL que codifica um peptídeo sinalizador com 23 aminoácidos, 5 a menos que os presentes no gene natural sob o controle do promotor PL de  $\lambda$ , o qual é induzido pela elevação da temperatura;
- b) pESP4hPRL2 - Neste vetor a expressão de hPRL é promovida pelo promotor lac, o qual é induzido pela presença de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG); não possui sequência-guia e, portanto, a proteína produzida é estocada no citoplasma bacteriano como Met-hPRL;
- c) p1813hPRL2 - É um plasmídeo de expressão que apresenta o promotor tac, também induzido pela presença de IPTG. Promove a produção no citoplasma bacteriano da proteína de fusão Met-Ala-Thr-Ser-6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL, que após purificação é digerida com fator Xa levando à obtenção de hPRL autêntica;

d) p3SN8hPRL2 - É um vetor construído com características similares ao p1813hPRL2, com a diferença de que o p3SN8hPRL2 contém a sequência guia da celulase de Cellulomonas fimi, a qual induz o transporte da proteína de fusão 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL para o espaço periplásmico das bactérias E. coli transformadas.

Os vetores plasmídicos p1813hPRL2 e p3SN8hPRL2 apresentaram em bactérias E. coli transformadas atividade imunológica de prolactina humana (~16,0 e ~0,5 µg hPRL/ml/A<sub>600nm</sub>, respectivamente, determinada por Radioimunoensaio) devida às proteínas de fusão. A proteína 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL foi purificada em resina Ni-NTA adsorvente de quelantes de metal, a qual possui alta afinidade pelos 6 resíduos histidina consecutivos com um rendimento de aproximadamente 90%, o que torna este processo de purificação extremamente interessante. Os outros quatro aminoácidos constituem o sítio de clivagem do fator X ativado, cuja ação proteolítica levou a obtenção de hPRL recombinante autêntica, um produto cuja obtenção ainda não foi descrita na literatura.

O correto processamento e qualidade do hormônio recombinante foi testado por Western blotting , SDS-PAGE e imunoensaio.

Os estudos nos quais foi analisado o comportamento imunológico da proteína de fusão demonstraram que esta preparação purificada é adequada para a preparação de traçador e para uso como padrão em Radioimunoensaios.

## ***Preparation of Authentic Human Prolactin by DNA Recombinant Techniques***

**Ligia Ely Morganti Ferreira Dias**

### **ABSTRACT**

In the present work the screening for the cDNA of human prolactin (hPRL) was carried out using rat prolactin cDNA and a synthetic oligonucleotide as probes in a pituitary library constructed by us in phage  $\lambda$ gt-10. After its obtention and sequencing, the hPRL cDNA was used for the construction of four plasmidic vectors which should express the human hormone in *E. coli*.

a) p $\beta$ 23hPRL2 - This plasmid includes the hPRL gene, codifying for a signal peptide with 23 aminoacids: 5 less than are present in the natural gene. The hPRL gene is under control of the  $\lambda$ P<sub>L</sub> promoter, which is induced by a temperature increase;

b) pESP4hPRL2 - In this vector the hPRL expression is regulated by the lac promoter which is induced by isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG); it does not have a signal peptide and, therefore, the formed protein is stored in the bacterial cytoplasm as Met-hPRL;

c) p1813hPRL - It is an expression plasmid including the tac promoter, also induced by IPTG. It produced in the cytoplasm the fusion protein Met-Ala-Thr-Ser-6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL that, after purification, was cleaved with factor Xa providing authentic hPRL;

d) p3SN8hPRL2 - It is a vector which has the same characteristics as the previous

one, but contains the signal peptide of the Cellulomonas fimi cellulase , which carries the fusion protein 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL into the bacterial periplasmic space.

The vectors p1813hPRL2 and p3SN8hPRL2 presented in transformed E. coli human prolactin activity (~16,0 and ~0,5 µghPRL/ml/A600 respectively, determined by RIA), due to the production of the fusion proteins. The protein (6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL) was purified on a Ni-NTA resin, a metal chelate adsorbent, having high affinity for the six consecutive histidine residues, with a yield of approximately 90%, which makes the process extremely interesting. The four aminoacids Ile-Glu-Gly-Arg constitute the cleavage site of activated factor X, whose proteolytic action led to recombinant authentic hPRL, a product whose obtainement was not yet described in the literature.

The corret processing and quality of the recombinant hormone was tested by Western blotting, SDS-PAGE and immunoassay.

Some preliminary studies were also carried out on the immunological behaviour of this fusion protein showing that this purified preparation is suitable for tracer and standard preparation in radioimmunoassay.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	3
ABSTRACT .....	5
INTRODUÇÃO.....	7
OBJETIVOS .....	16
MATERIAIS .....	17
MÉTODOS .....	24
1. Seleção do cDNA de hPRL na genoteca de cDNA hipofisário e subclonagem em vetor plasmídico .....	24
1.1. Seleção de cDNA hipofisário.....	24
1.2. Subclonagem em vetor plasmídico.....	26
2. Mutagênese sítio específica.....	27
3. Expressão de hPRL.....	30
3.1. Choque osmótico das bactérias .....	30
3.2. Condições de extração e renaturação de rec-hPRL de grânulos citoplasmáticos bacterianos: .....	31
4. Purificação da 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL.....	32
5. Análise da hPRL recombinante.....	33
5.1. Radioimunoensaio .....	33
5.2. SDS-PAGE .....	34
5.3. Western blotting.....	35
5.4. Dosagem de proteínas totais .....	35
6. Uso da 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL em RIE:.....	36
6.1. Uso como padrão:.....	36
6.2. Uso como traçador:.....	36
RESULTADOS .....	37
1. Seleção da genoteca de cDNA hipofisário para o cDNA de hPRL e subclonagem em vetor plasmídico .....	37
1.1. Seleção da genoteca de cDNA hipofisário .....	37
1.2. Subclonagem .....	37
2 Construção dos vetores plasmídicos de expressão.....	39



2.1. Organismo hospedeiro de expressão .....	39
2.2. p $\beta$ 23hPRL.....	39
2.2.1. Promotor .....	39
2.2.2. Peptídeo sinalizador.....	40
2.2.3. Construção do p $\beta$ 23hPRL.....	41
2.3. pESP4hPRL2.....	44
2.3.1. Promotor .....	44
2.3.2. Construção do pESP4hPRL2.....	45
2.4. p1813hPRL2 e p3SN8hPRL2.....	48
2.4.1. Promotor .....	48
2.4.2. Peptídeo sinalizador.....	48
2.4.3. Projeto de construção do p3SN8 hPRL2 e p1813hPRL2.....	48
3. Testes de expressão de rec-hPRL.....	53
3.1. Expressão com diferentes vetores plasmídicos.....	53
3.2. Otimização das condições de expressão de rec-hPRL.....	54
4. Purificação da 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL.....	58
5. Análise da 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL .....	60
5.1. Seqüenciamento do DNA.....	60
5.2. Análise imunológica .....	60
6. Uso da 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL no RIE .....	62
6.1. Marcação com <sup>125</sup> I.....	62
6.2. Uso como padrão.....	63
6.3. Uso como traçador.....	64
7. Digestão por protease específica fator Xa.....	66
 DISCUSSÃO.....	 68
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	 74

## INTRODUÇÃO

A Prolactina humana (hPRL) é um hormônio polipeptídico produzido pelo lobo anterior da hipófise, pela placenta (86), e por linfócitos (72). Possui peso molecular de 23.000 daltons e 199 aminoácidos com três pontes dissulfeto entre as cisteínas 4-11, 58-114 e 191-199 (12). A sequência de aminoácidos foi primeiramente descrita por Shome e Parlow (80) a partir de hPRL purificada de hipófises. Esta sequência foi revista por Cooke e cols. (12) quando foi clonado pela primeira vez o cDNA de hPRL e feito o sequenciamento dos seus nucleotídeos, obtendo-se também a sequência do peptídeo sinalizador da hPRL, o qual apresenta 28 aminoácidos.

hPrl derivada de hipófises e soro tem mostrado alto grau de heterogeneidade estrutural. Modificações pós traducionais da hPRL tem sido relatadas na literatura: agregação intramolecular ou com outras proteínas, glicosilação, clivagem proteolítica. Estas resultam em uma diversidade de tamanhos moleculares para este hormônio. Nem sempre se sabe de que modo estas alterações influenciam as atividades biológicas da PRL.

Trabalhos com cromatografia de exclusão molecular em amostras de soro e extratos hipofisários demonstraram a presença de formas de hPRL imunoreativas com pesos moleculares correspondentes a 23.000, 50.000 e >100.000 daltons (11, 18, 20, 85). O monômero é aquele correspondente a 23.000 daltons, enquanto a forma com peso molecular de aproximadamente 50.000 daltons é um dímero cujas unidades se encontram ligadas por ponte dissulfeto, como sugerem os estudos em que pela ação de agentes redutores ocorre uma quebra das pontes dissulfídicas da molécula, levando à obtenção de proteína com peso molecular igual ao monômero (4, 22, 61). A forma com PM >100.000 daltons seria uma molécula de hPRL ligada a imunoglobulinas e talvez também hPRL ligada a outras proteínas (45).

Formas clivadas do hormônio compostas por dois peptídeos de 8.000 e 16.000 daltons mantidos unidos por uma ponte dissulfeto estariam presentes no soro humano e em maior proporção em mulheres grávidas (81). Num estudo em que se produziu PRL de primatas em células de camundongo, o sítio de clivagem seria entre os aminoácidos 132 e 133 (leucina e isoleucina) (11).

Em 1984, Lewis e cols (49) demonstraram a presença de prolactina glicosilada (GPRL) em glândulas hipofisárias de carneiro, sendo que a unidade de carboidrato estaria ligada à asparagina<sup>31</sup> por uma N acetilglicosamina. A GPRL foi também encontrada em humanos na hipófise (28, 48), no soro (7, 29, 58) e em secreção de cultura de decidua (44). Por eletroforese em gel de poliacrilamida em

SDS, estimou-se um peso molecular de 25.000 daltons para a GPRL, diferenciando daquela com peso molecular de 23.000 daltons. A maioria dos autores relatam atividades biológicas reduzidas para a GPRL quando comparada com a PRL: menor atividade lactogênica em ensaio de radioreceptores em glândulas mamárias (28, 59, 73, 82) e em ensaio de crescimento de papo de pombos (49, 59, 82); menor atividade mitogênica em ensaio de linfócitos de ratos da linhagem Nb2 (59, 73, 92) e, em geral, menores atividades imunológicas (28, 48, 82). Segundo Brue e cols. (7) a porcentagem de GPRL presente no soro de indivíduos normais é da ordem de 24%; porcentagem esta que diminui em certas condições: gravidez, amamentação e prolactinomas (7, 29, 58).

A secreção de PRL varia sob diferentes condições fisiológicas: ela é regulada pelo hormônio hipotalâmico dopamina e por vários outros fatores liberadores de PRL. A hPRL é o único dos hormônios da hipófise que está sob a ação inibitória do hipotálamo, por ação da dopamina que age estimulando o receptor de lactotrofo D2 o qual inibe a adenilato ciclase, conseqüentemente inibindo a síntese e liberação da hPRL. Os fatores liberadores da PRL incluem o hormônio liberador da tireotrofina (TRH), o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e PHM-27, um peptídeo relacionado ao VIP (86). A síntese de PRL é também regulada por ação do estrogênio na expressão gênica da PRL. O promotor de PRL e a região "enhancer" distal, a qual contém um elemento responsivo ao estrogênio, são críticos para a expressão gênica da PRL. O receptor de estrogênio provavelmente age juntamente com o fator Pit-1 para regular a transcrição de PRL (16). O Pit 1 é um fator tecido específico que estimula a transcrição gênica do hGH, hPRL e hTSH (71).

As principais ações da PRL humana são o crescimento da glândula mamária em ação conjunta com estrogênios e a regulação da expressão de proteínas do leite (3, 27, 76).

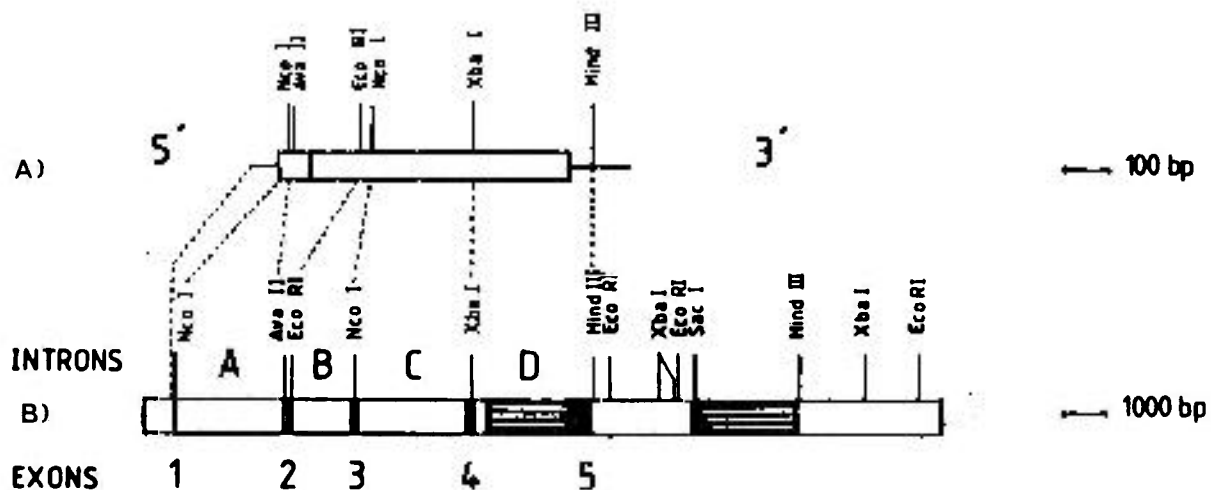
Estudos tem indicado que a PRL é também importante na manutenção da função imune, tendo sido demonstrada a presença de receptores de PRL em células do sistema imunológico: linfócitos T e B, monócitos e timócitos, estando associada a uma variedade de processos, entre eles crescimento celular, proliferação e diferenciação (9, 65, 72, 83). Foi também descrita a produção e secreção de hPRL por linfócitos T (39, 72).

Os níveis plasmáticos de hPRL são menores nos homens (média de 7 ng/ml) do que nas mulheres (média de 10-11 ng/ml) e nestas ocorrem pequenas variações durante o ciclo menstrual (21). A deficiência de hPRL ocorre raramente:

na necrose ou infartação da hipófise ou quando da administração de medicamentos como a bromocriptina (87). A hiperprolactinemia é um fator significativo em infertilidade feminina, estando presente em 30% dos casos de infertilidade em mulheres (62); em homens a hiperprolactinemia tem sido descrita como a causa de impotência, mesmo quando a elevação do nível hormonal é modesta (46). Os níveis de hPRL aumentam durante a gravidez e permanecem altos após o parto se a lactação se inicia (87), enquanto no líquido amniótico os níveis de hPRL são muito elevados no primeiro trimestre, baixando durante a evolução da gravidez (21).

Os genes dos hormônios de crescimento (GH), lactogênio placentário (PL) e prolactina pertencem a uma mesma família, o hGH e o hPL são compostos de 191 resíduos de aminoácidos e apresentam grande homologia: por volta de 85% das suas sequências. A hPRL é menos relacionada com as outras duas proteínas, apresentando 26% de homologia de aminoácidos com o hGH e 27% com o hPL. Os genes codificantes para estes 3 hormônios polipeptídicos são originários de um mesmo gene ancestral, por duplicação (12). Segundo Cooke e cols., a segregação cromossômica da PRL e do GH ocorreu há aproximadamente 392 milhões de anos quando houve a divergência entre peixes e tetrápodes, enquanto aquela do GH e do PL proveio de uma recombinação intracromossômica ocorrida há aproximadamente 10 milhões de anos. Enquanto em humanos os genes do GH e o PL foram localizados no cromossomo 17, a localização do gene da hPRL foi descrita no cromossomo 6 (68).

O gene da hPRL apresenta 5 exons e 4 introns, possuindo um total de aproximadamente 10Kb; o seu cDNA é composto de aproximadamente 900 nucleotídeos (90) (Figura 2).



**Figura 1:** Mapa de restrição do gene da hPRL (90). **A)** Alguns sítios de restrição do cDNA de hPRL; **B)** DNA genômico da hPRL, onde as porções pretas numeradas de 1 a 5 são os exons, as porções brancas (A a D) são os introns e as porções listradas correspondem às seqüências intermediárias repetitivas dispersas da família Alu.

No radioimunoensaio e nos outros tipos de imunoensaios em geral, a hPRL é usada para a preparação dos reagentes principais que são: antígeno marcado, padrão, anticorpos mono ou policlonais. Devido à sua importância para o diagnóstico de várias patologias, ela tornou-se um dos hormônios mais determinado na análise clínica. Foi visando a obtenção destes reagentes que, no laboratório da Supervisão de Radioensaios do IPEN onde já existe uma larga experiência na extração, purificação, caracterização, marcação com  $^{125}\text{I}$  e radioimunoensaio de hormônios hipofisários, foi completado o trabalho experimental de purificação da hPRL a partir de hipófises humanas (19).

A partir do primeiro trabalho de Goeddel e cols (24) em que pela primeira vez, nos laboratórios Genentech de São Francisco, E.U.A., foi sintetizado o hormônio de crescimento humano por engenharia genética, muitas outras tecnologias análogas, sempre baseadas em técnicas de DNA recombinantes foram desenvolvidas para a obtenção deste hormônio. As vantagens relacionadas com a padronização e utilização destas técnicas são enormes. Eis as principais:

1) Independência da utilização de órgãos humanos que, além de serem disponíveis em quantidade sempre limitada, envolvem problemas de caráter ético-moral, dependem de legislações específicas e apresentam riscos de contaminação por vírus, como por exemplo hepatitis B, doença de Creutzfeld e Jacob, AIDS, etc.

2) Disponibilidade ilimitada de material, sendo que a matéria-prima para a purificação serão os produtos de extração de bactérias transformadas, ou seja organismos com alta velocidade de reprodução (aproximadamente 20 minutos/geração) em cujo patrimônio genético terá sido introduzido o gene codificante da proteína de nosso interesse.

3) Facilidade de extração e purificação do hormônio de interesse a partir do extrato periplásmico de E.coli. Isto é enormemente importante para o caso da PRL no qual formas moleculares análogas, principalmente o hGH, presente na glândula pituitária em quantidade muito maior (de 50 a 100 vezes) dificultam muito a sua purificação.

4) Possibilidade de utilização do mesmo "know-how" já desenvolvido para a preparação do hGH pela mesma técnica de DNA recombinantes e, obviamente, possibilidade de aplicação da metodologia à preparação subsequente de outros hormônios.

Cooke e cols. (12) realizaram pela primeira vez a clonagem e amplificação em bactérias do cDNA de hPRL. O trabalho deste grupo, porém, não levou à expressão da proteína, sendo sua finalidade especialmente uma comparação evolucionária deste gene com aqueles de hGH e de hPL, enquanto Truong e cols. (90) isolaram e caracterizaram o DNA genômico de hPRL.

hPRL recombinante foi obtida por três grupos, dois dos quais a obtiveram como proteína de fusão. Gilbert e cols. (23) prepararam  $\beta$ -galactosidase-prolactina enquanto Hiraoka e cols. (30) obtiveram proteína A-sítio de clivagem da colagenase-PRL, obtendo a hPRL com mais quatro aminoácidos na porção N terminal. Paris e cols (70) obtiveram a Met-hPRL em corpos de inclusão citoplasmáticos de E. coli. Nenhum grupo, pelo que é de nosso conhecimento, obteve a hPRL recombinante autêntica, sem a metionina, no espaço periplásmico bacteriano.

A expressão de proteínas eucarióticas produzidas em bactérias via secreção periplásmica oferece algumas vantagens sobre a expressão intracelular,

a seguir:

- a) A porção N terminal da molécula de proteína recombinante pode ser idêntica ao produto autêntico;
- b) A secreção de proteínas para o periplasma pode proteger o polipeptídeo da ação de muitas proteases (60)
- c) Foi demonstrado que a formação de pontes dissulfídicas em E. coli ocorre durante a secreção ou no ambiente periplásmico, obtendo-se desse modo a produção de proteínas com a correta conformação (26).

Além disso, foram descritas dificuldades de renaturação de proteínas recombinantes em corpos de inclusão citoplasmáticos, geralmente obtendo-se proteínas agregadas de alto peso molecular como resultado de interações intermoleculares entre as mesmas moléculas de hPRL ou com outras proteínas (53).

Xho II Xcm I  
 ACCGTGAGACTTCCAGATCTTCTCTGGTGAAGTGTGTTTCCTGCAACGATCACGAACATGAACATCAAAGGATCGCCATG 80  
 TGGCACTCTGAAGGTCTAGAAGAGACCACTTACACAAAGGACGTTGCTAGTGCTTGTACTTGTAGTTTCTAGCGGTAC  
 MetAsnIleLysGlySerProTrp  
 Pp MI/Ava II PflM I Fau I SfaN I  
 GAAAGGGTCCCTCCTGCTGCTGCTGGTGTCAAACCTGCTCCTGTGCCAGAGCGTGGCCCCCTTGCCCATCTGTCCCGGGC 160  
 CTTCCAGGGAGGACGACGACGACCACAGTTTGGACGAGGACACGGTCTCGACCGGGGAACGGGTAGACAGGGCCG  
 LysGlySerLeuLeuLeuLeuValSerAsnLeuLeuLeuCysGlnSerValAlaProLeuProIleCysProGly  
 Bce FI  
 Acc II  
 HinP1 I  
 Drd I  
 Hha I  
 BstE II  
 GGGCTGCCCGATGCCAGGTGACCCTTCGAGACCTGTTTGACCGCGCCGTCGTCTGTCCCACTACATCCATAACCTCTCC 240  
 CCCGACGGGCTACGGTCCACTGGGAAGCTCTGGACAACTGGCGCGGCAGCAGGACAGGGTGATGTAGGTATTGGAGAGG  
 GlyAlaAlaArgCysGlnValThrLeuArgAspLeuPheAspArgAlaValValLeuSerHisTyrIleHisAsnLeuSer  
 Acc I  
 Bst1107 I  
 Eae I  
 Gdi II  
 EcoRI  
 Hae I  
 NspB II  
 Pvu II  
 TCAGAAATGTTTCAGCGAATTCGATAAACGGTATACCCATGGCCGGGGTTTCATTACCAAGGCCATCAACAGCTGCCACAC 320  
 AGTCTTTACAAGTCGCTTAAGCTATTTGCCATATGGGTACCGGCCCCCAAGTAATGGTCCGGTAGTTGTCGACGGTGTG  
 SerGluMetPheSerGluPheAspLysArgTyrThrHisGlyArgGlyPheIleThrLysAlaIleAsnSerCysHisThr  
 Bbs I Bbv II  
 TTCTTCCCTTGCCACCCCGAAGACAAGGAGCAAGCCCAACAGATGAATCAAAAAGACTTCTGAGCCTGATAGTCAGCA 400  
 AAGAAGGGAACGGTGGGGGCTTCTGTTCTCGTTCGGGTGTCTACTTAGTTTTCTGAAAGACTCGGACTATCAGTCGT  
 SerSerLeuAlaThrProGluAspLysGluGlnAlaGlnGlnMetAsnGlnLysAspPheLeuSerLeuIleValSer



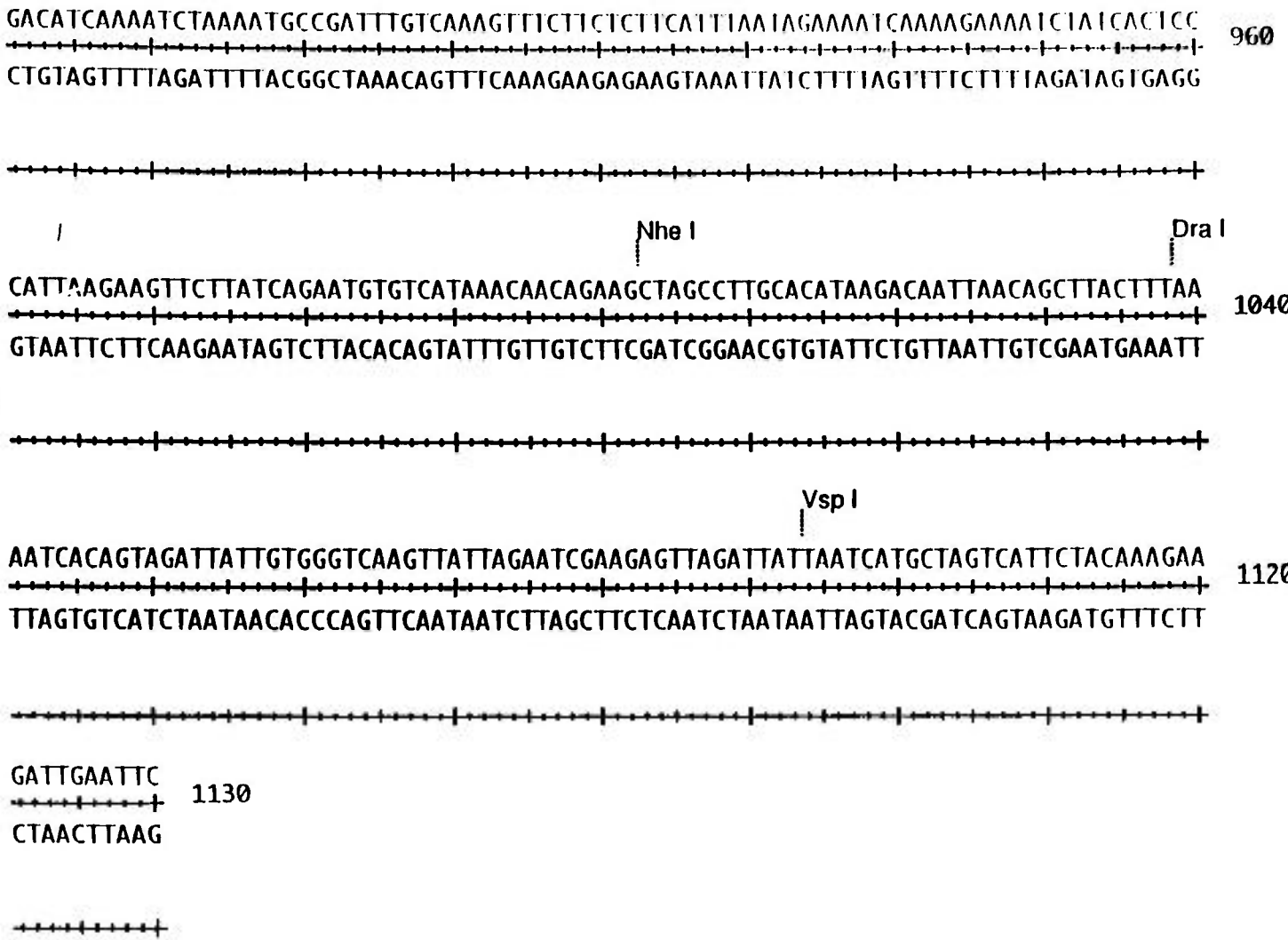


Figura 2: Mapa de restrição do cDNA de hPRL (90).

## OBJETIVOS

A Supervisão de Radioensaio (TBM) do IPEN tem como meta prioritária a produção de hormônios pituitários humanos recombinantes, projeto este também financiado pela IAEA-Viena que visa atingir a independência regional na produção de reagentes para Radioensaios, objetivo extremamente importante para a implantação de vários programas nacionais de saúde. Neste laboratório já foi preparado o hormônio de crescimento humano recombinante (2, 75), já está em andamento o trabalho visando a obtenção da tireotrofina recombinante (38) e estão também sendo obtidos os genes relativos à luteotrofina e foliculotropina mediante a seleção da genoteca preparada no mesmo laboratório.

O objetivo final do presente trabalho é a obtenção de uma cepa de E. coli contendo um vetor plasmídico de expressão que promova a síntese de hPRL com secreção do hormônio no espaço periplásmico. Desta forma seria assim obtido, pela primeira vez, o hormônio em sua forma madura, ou seja, sem metionina inicial, perfeitamente idêntico ao produto de extração hipofisária. É nossa meta ainda a purificação e caracterização físico-química e imunológica do hormônio obtido, especialmente para aplicações diagnósticas.

## MATERIAIS

### 1. Cepas bacterianas:

Foram usadas as seguintes cepas de E. coli:

a) *Cepas utilizadas na preparação de DNA fagemídico de fita simples contendo resíduos uracila:*

**CJ236:** dut1 ung1 thi-1 relA1/pCJ105(cam<sup>r</sup>R')

**RZ1032:** AS BW313 butZbd-279:TN10 supE44

b) *Cepa utilizada para titulação, seleção do cDNA de hPRL e amplificação do DNA viral de  $\lambda$  gt10:*

**C600-hfIA:** supE44 hsdR thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 hflA150 chr::Tn10(tet<sup>r</sup>)

c) *Cepa utilizada para expressão de hPRL no caso de plasmídeo contendo o promotor<sub>P<sub>L</sub></sub> de  $\lambda$  :*

**RRI (pRK248clts):** supE44 hsdS20(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub><sup>-</sup>) ara14 oriA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1

d) *Cepas utilizadas para testes de expressão de hPRL com os demais vetores plasmídicos:*

**CSH50:** thi ara (lac-pro) strA/F'(proAB lacI<sup>q</sup> lacZ<sup>-</sup> M15 $\Delta$  traD36)

**TG1:** supE hsd $\Delta$ 5 thi  $\Delta$ (lac-proAB) F'(traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ  $\Delta$ M15)

**XL1-Blue:** supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup> F'[ProAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ M15 $\Delta$ Tn10(tet<sup>r</sup>)]

**NM522:** supE thi (lac<sup>-</sup>proAB) (hsdMs-mcrB)5(r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>-</sup>McrBC<sup>-</sup>)F'lacI<sup>q</sup> (lacZ)M15proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>

**Le392:** supE44 supF58 hsdR514( $r_K^- m_K^+$ ) galK2 galT22 metB1 trpR55 lacY1 mcrA

**HB2151:** K12 ara  $\Delta$ lac-pro thi F'(proAB lacI<sup>q</sup>Z  $\Delta$ M15)

**HB101:** supE44 hsdS20( $r_B^- m_B^-$ ) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1

**JM101:** supE thi (lac-proAB) F'[ traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15]

**JM105:** supE endA sbcB15 hsdR4 rpsL thi $\Delta$ (lac-proAB) F'[traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15]

**MV1193:**  $\Delta$ (lac-proAB) rpsL thi endA spcB15 hsdR4  $\Delta$ (srl-recA) 306::Tn10(tet<sup>r</sup>) F'[traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15]

## 2. Vetores plasmídicos:

### *Plasmídeos Bluescript KS-/+ e SK+:*

Os pBluescript são fagemídeos que contém sítio de policlonagem dentro da região N terminal do gene lacZ. As denominações pBluescript SK e KS representam a orientação do sítio de policlonagem. As orientações (+) e (-) da região intergênica f1 permitem a obtenção de ambas as fitas simples de DNA com o auxílio de fago auxiliar. Os pBluescript contém gene que lhes confere resistência à ampicilina. Foram obtidos da Stratagene, La Jolla, CA, E.U.A.

### *Plasmídeo B-UC:*

O pB-UC foi derivado do pUC-19, do qual foi utilizado o gene que confere resistência à ampicilina, a origem da replicação e o sítio de policlonagem, no qual foi inserido o promotor P<sub>L</sub> de  $\lambda$  (5, 14).

### *Plasmídeo ESP4:*

O pESP4 é derivado do pEMBL 8(+) (17) do qual foi utilizado o gene que confere resistência à ampicilina, a região intergênica do fago f1, a origem da replicação e o promotor lac. O pESP4 possui 8 nucleotídeos entre a sequência Shine-Dalgarno (79) e o codon de iniciação. Este vetor foi gentilmente cedido pelo Dr. Denis Luck do Departamento de Biologia da Universidade de Oberlin, Oberlin,

OH, E.U.A. (52).

#### *Plasmídeos 3SN8 e 1813:*

Os plasmídeos 3SN8 e 1813 contêm a região intergênica do fago f1, o gene que lhes confere resistência à kanamicina, a origem da replicação e o promotor tac (6). O p3SN8 possui a sequência guia de uma celulase bacteriana (66). Ambos os plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Roger Graham da Universidade de British Columbia, Vancouver, BC, Canadá.

### **3. Genoteca de cDNA hipofisário:**

O cDNA de dupla fita complementar ao mRNA foi preparado previamente pelo método de Okayama, e col. (67), usando o sistema e protocolo de síntese de cDNA da Amersham Corporation (Arlington Heights, IL, E.U.A.) a partir de RNA poli-A<sup>+</sup> purificado de material hipofisário humano. A biblioteca de cDNA foi construída (1) usando Kit de clonagem de cDNA em  $\lambda$ gt10 da Amersham de acordo com o método de Hohn (34), apresentando o seguinte título:  $1,8 \times 10^8$  unidades formadoras de placa (ufp)/ml.

### **4. Enzimas de restrição e outras enzimas usadas em procedimento de Biologia Molecular:**

Foram usadas as enzimas de restrição Ava II, Xba I, Eco RI, Eco RV, Ava I, Hind III, Ppu MI, Bgl II e Nhe I; as enzimas T4DNA ligase, fosfatase alcalina (CIP), Fragmento de Klenow da DNA polimerase I e T4 polinucleotídeo kinase adquiridas da Pharmacia, Uppsala, Suécia ou da New England Biolabs, Beverly, MA, E.U.A.

### **5. Nucleotídeos marcados:**

Os nucleotídeos ( $\gamma^{32}\text{P}$ )dCTP e ( $\alpha^{32}\text{P}$ )dATP utilizados para marcação de DNA em procedimentos de hibridização e também ( $\alpha^{35}\text{S}$ )dATP utilizado no seqüenciamento foram adquiridos da Amersham International plc, Aylesbury, Buckinghamshire, Inglaterra.

### **6. Kits para marcação de DNA:**

Para a marcação com ( $\alpha^{32}\text{P}$ )dCTP do cDNA de rPRL foi utilizado o kit: "Primer extension" da Amersham Corporation, Arlington Heights, IL, E.U.A.

### **7. Kit para seqüenciamento de DNA:**

Nas operações de seqüenciamento de DNA foi utilizado o kit Sequenase da United States Biochemical Corporation (USB), Cleveland, OH, E.U.A.

### **8. Sistema de purificação de fragmentos de DNA:**

Na extração e purificação de bandas de DNA a partir de gel de agarose foi utilizado o Sephaglas Bandprep Kit da Pharmacia, Uppsala, Suécia.

### **9. Ni-NTA Agarose:**

Esta resina, para purificação de proteínas contendo resíduos de histidina consecutivos, foi adquirida da QIAGEN, Chatsworth, CA, E.U.A.

### **10. Fator X da coagulação ativado:**

Esta enzima proteolítica de origem bovina foi adquirida da Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha e da New England Biolabs, Beverly, MA, EUA.

### **11. Oligonucleotídeos sintéticos:**

O oligonucleotídeo sintético utilizado na seleção da genoteca de cDNA hipofisário e os oligonucleotídeos utilizados para a preparação do adaptador de fita dupla utilizados na construção do p $\beta$ 23hPRL foram gentilmente doados pela Dra. Daniela Toniolo, do Instituto de Genética Bioquímica e Evolucionística, Pavia, Itália, preparados em sintetizador da Applied Biosystems, modelo 380 A.

Os oligonucleotídeos utilizados para os procedimentos de mutagênese e seqüenciamento foram gentilmente fornecidos pelo Dr. Michael Smith, do Laboratório de Biotecnologia da Universidade de British Columbia, Canadá, preparados em sintetizador da Applied Biosystems modelo 380 B.

Os oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento do cDNA de hPRL no vetor pBluescript SK+ foram obtidos da Stratagene, La Jolla, E.U.A.

### **12. Reagentes usados na caracterização da rec-hPRL:**

hPRL hipofisária para radioiodação e antissoro anti-hPRL preparado em cobaios para uso no Western blotting foram doados pelo Dr. Alexander Bulatov do Instituto de Endocrinologia da Academia Nacional de Ciências, Moscou, Russia.

hPRL hipofisária para uso como padrão (hPRL-RP-1 AFP-2312C) e antissoro anti-hPRL, preparado em coelhos para uso no Radioimunoensaio (RIE)

(Anti-hPRL-3AFP-C11580) foram doados pelo "National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases" (NHPP-NIDDK), NIH, Rockville, MD, E.U.A.

Segundo anticorpo anti-IgG de coelho preparado em carneiro para separação no Radioimunoensaio (RIE) foi doado pelo Dr. Mauricio Vicili da firma TRILAB, São Paulo, Brasil.

### Meios de cultura e soluções tampão

#### Meio LB

Extrato de leveduras.....5,0 g  
Tryptona.....10,0 g  
NaCl.....10,0 g  
H<sub>2</sub>O destilada.....qsp 1000 ml

#### Meio YT

Extrato de leveduras.....5,0 g  
Tryptona.....8,0 g  
NaCl.....5,0 g  
H<sub>2</sub>O destilada.....qsp 1000 ml

#### Meio SB

Solução A:

Extrato de leveduras.....24,0 g  
Tryptona.....12,0 g  
Glicerol.....5,0 ml  
H<sub>2</sub>O destilada.....qsp 900 ml

Solução B:

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....1,7 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....15,3 g  
H<sub>2</sub>O destilada.....qsp 100 ml

As soluções A e B foram autoclavadas separadamente e misturadas esterilmente no momento do uso

### Meio TYM

Extrato de leveduras.....	1,0 g
Triptona.....	10,0 g
NaCl.....	5,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	2,4 g

### Agar LB

Agar.....	1,5 g
Meio LB.....	qsp 1000 ml

### Top Agar

Agar.....	7,5 g
Meio LB.....	qsp 1000 ml

### Solução SM

NaCl.....	5,84 g
Tris-base.....	1,21 g
MgSO <sub>4</sub> .....	1,20 g
Gelatina.....	0,20 g
H <sub>2</sub> O destilada.....	qsp 1000 ml

O pH foi ajustado para 7,5 com HCl

### Solução SSC 20 vezes concentrada

NaCl.....	175,0 g
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> (citrato de sódio).....	88,0 g
H <sub>2</sub> O.....	qsp 1000 ml

O pH foi ajustado para 7,0 com ácido cítrico quando necessário



**Soro artificial**

soroalbumina bovina.....4,0 g  
Gelatina.....1,0 g  
NaCl.....1,0 g  
 $\gamma$ -globulina humana.....0,5 g  
Tampão fosfato 0,05M, pH7,4.....qsp 100 ml

**Tampão de hibridização para filtros de nitrocelulose**

NaCl.....2,17 g  
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....345,0 mg  
 $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .....92,5 mg  
SDS.....400,0 mg  
tRNA de leveduras.....200,0  $\mu\text{g}$   
solução de Denhardt 2x concentrado (57) 4,0 ml  
 $\text{H}_2\text{O}$  destilada.....qsp 200 ml

## MÉTODOS

### 1. Seleção do cDNA de hPRL na genoteca de cDNA hipofisário e subclonagem em vetor plasmídico

#### 1.1. Seleção de cDNA hipofisário

Partindo de uma genoteca de cDNA hipofisário previamente preparada, na qual foi utilizado bacteriófago  $\lambda$ gt10 como vetor, foi realizada a seleção dos fagos contendo o cDNA de hPRL. A titulação da genoteca em placas de agar LB com top agar contendo células de *E. coli*, cepa C600 hflA, pré incubadas com a solução contendo os vírus forneceu o valor de  $1,8 \times 10^8$  unidades formadoras de placa/ml. Foi feita a seleção dos clones positivos para o cDNA de hPRL a partir de aproximadamente 500.000 fagos recombinantes em 10 placas de petri de 9 cm de diâmetro. Após transferência dos fagos para filtros de nitrocelulose, desnaturação do DNA usando-se NaOH, neutralização e fixação dos filtros por cozimento a 80°C em vácuo, a hibridização foi realizada com duas sondas:

A) Uma sonda contendo os 21 nucleotídeos complementares aos nucleotídeos 57-68 (Figura 2) do cDNA, preparada por síntese química e purificada de acordo com o método de Sawadogo e col. (78)

5' TGGCGATCCTTTGATGTTCAT 3'

foi utilizada de acordo com o seguinte protocolo: 200 ng desta sonda foram marcados com 200  $\mu$ Ci de ( $\gamma^{32}$ P)dATP utilizando 12 unidades da enzima T4 nucleotídeo kinase em 48  $\mu$ l de reação deixando-se a enzima agir por uma hora a 37°C. O DNA foi precipitado com a adição de 1,8  $\mu$ l (8,0  $\mu$ g) de esperma de salmão como carregador de DNA, 25  $\mu$ l de acetato de amônio 5M e 185 $\mu$ l de etanol, lavando-se o DNA com etanol a 70%, e secado. Foi realizada a pré-hibridização dos filtros com tampão de hibridização a 54°C por 3 horas, adicionando-se em seguida o produto da marcação ressuspenso em 400  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O e diluído em tampão de hibridização, efetuando-se a mesma a 54°C por 18 horas. Foram realizadas duas lavagens dos filtros com 6x SSC por 30 minutos a temperatura ambiente e uma lavagem a 54°C por dois minutos, expondo-se os filtros em seguida.

B) O cDNA da Prolactina de rato (rPRL) foi escolhido como segunda sonda para a seleção da genoteca, por apresentar alta homologia (~73%) com o cDNA de hPRL(12). O vetor plasmídico pBR322 contendo o inserto de cDNA de rPRL, doado pelo Dr. Joseph Martial da Universidade de Liège, Belgica (13) foi transformado em células competentes de *E. coli*, cepa HB101, preparadas pelo método de  $\text{CaCl}_2$  (10) e selecionadas pelo plaqueamento em agar LB contendo tetraciclina. Realizou-se a extração do DNA plasmídico, digestão com a enzima de restrição Eco RI e purificação da banda de aproximadamente 900 pares de bases (pb), correspondendo ao cDNA de hPRL, em agarose com baixa temperatura de fusão ("low melting"), cortando-se a banda de interesse com bisturi. A marcação do cDNA de rPRL ainda embebido em agarose foi feita por extensão do iniciador com fragmento de Klenow da DNA polimerase I em 50,0  $\mu\text{l}$ , seguindo-se o protocolo da Amersham que utiliza ( $\alpha^{32}\text{P}$ )dCTP como nucleotídeo marcado. Após a marcação, o DNA foi precipitado pela adição de 2  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{g}$ ) de tRNA de leveduras, 52  $\mu\text{l}$  de Acetato de amônio 5M e 260  $\mu\text{l}$  de etanol, centrifugando-se após 15 minutos a temperatura ambiente e ressuspendendo em 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Os filtros foram pré-hibridizados por 3 horas a 65°C com o tampão de hibridização e hibridizados por 18 horas, utilizando-se o tampão contendo a sonda marcada e fervida para denaturação do DNA. Foram realizadas duas lavagens dos filtros a 65°C com solução SSC 2x concentrada + 0,5% de SDS e duas vezes com solução SSC 0,2x concentrada + 0,5% de SDS, expondo-se os filtros a filmes radiográficos em seguida.

Os filmes radiográficos foram revelados após 24 horas de exposição em chasis contendo intensificadores a -80°C. Identificamos assim os halos positivos das placas originais, sendo retirados com pipeta pasteur e imersos em 500  $\mu\text{l}$  de tampão SM estéril contendo 10  $\mu\text{l}$  de clorofórmio.

As hibridizações com cada uma das sondas foram repetidas 3 vezes para purificação dos fagos isolados. Dos clones selecionados, fez-se a purificação do DNA fágico após lise confluyente em placas contendo agar LB + top agar e análise de restrição com as enzimas Eco RI e Xba I. Os vetores virais que foram confirmados mediante Southern blotting como contendo o cDNA de hPRL íntegro foram utilizados para posterior subclonagem em vetor plasmídico.

### ***Southern blotting*** (84).

Foi realizado um Southern blotting dos clones selecionados após digestão do DNA viral purificado com Eco RI e eletroforese em gel de agarose a 1,2% . O gel de agarose foi lavado com água destilada e a seguir foi colocado em uma solução de NaOH 0,5M e NaCl 1,5M, deixando-se 15 minutos sob agitação, repetindo-se esta última etapa. A solução de NaOH foi desprezada e lavou-se o gel com água destilada, deixando-se o mesmo por 15 minutos sob agitação em solução de acetato de amônio 1M, repetindo-se este procedimento. A transferência do DNA se fez para filtro de nitrocelulose cortado do mesmo tamanho do gel, molhado em H<sub>2</sub>O e equilibrado em acetato de amônio 1M. O gel foi colocado em uma placa de vidro, acima dele colocou-se o filtro de nitrocelulose, tomando-se cuidado para evitar bolhas de ar. Acima do filtro foram colocadas seis folhas de papel Whatman 3MM; uma espessura de 2 cm de papel de filtro cortado aproximadamente do mesmo tamanho do gel, uma placa de vidro e um peso por cima de tudo; deixando-se para transferência por 18 horas. Após a transferência o filtro foi secado ao ar e cozido a 80°C por uma hora em vácuo. A hibridização foi feita com a sonda de cDNA de hPRL de rato purificada e marcada como já descrito para a seleção da biblioteca de cDNA.

### **1.2. Subclonagem em vetor plasmídico**

A subclonagem foi realizada a partir da digestão do DNA extraído dos clones que apresentaram sinal positivo com ambas as sondas.

A genoteca de cDNA que havia sido previamente construída com adaptadores contendo o sítio de restrição da enzima Eco RI para facilitar a subclonagem dos genes selecionados, apresentou um problema no caso do gene de hPRL: a presença de um sítio de restrição para Eco RI nos nucleotídeos 256-261 (Figura 2), o que dificultou a subclonagem sem fragmentação deste gene. Com o objetivo de obtermos o inserto de cDNA íntegro, fizemos uma digestão parcial do DNA plasmídico, deixando a enzima agir por 10 minutos ao invés de uma hora, como usualmente. 20 ng de cDNA de hPRL de aproximadamente 900pb íntegro, purificado por eletroforese em agarose com baixa temperatura de fusão, foram utilizados para a reação de ligação com 100 ng do vetor pBluescript SK+ digeridos com Eco RI e defosforilados com a enzima fosfatase alcalina. Após a transformação das células competentes e seleção em agar LB contendo ampicilina (10µg/ml), observamos muitos clones resistentes, inclusive na placa de

controle, onde a ligação foi feita na ausência do inserto de cDNA de hPRL. Foi feita a minipreparação do DNA plasmídico de 18 das colônias, não sendo encontrado em nenhuma delas o inserto íntegro. Se utilizando também do procedimento de hibridização das colônias (57) e usando como sonda o cDNA de rPRL, foi encontrado 1 clone de bactérias contendo o inserto de cDNA de hPRL íntegro.

Outra tentativa feita simultaneamente foi a de ligação tríplice utilizando-se três pedaços de DNA purificados: fragmentos de ~250 e 650 pb do cDNA de hPRL digeridos com Eco RI e o vetor Bluescript SK+ digerido com a mesma enzima de restrição e defosforilado. Após a transformação de células competentes, nenhum clone contendo a seqüência íntegra foi encontrado.

O seqüenciamento parcial do inserto íntegro de cDNA clonado foi realizado pelo método de Sanger (77) utilizando o Kit Sequenase da USB e 2 iniciadores (oligonucleotídeos sintéticos) comerciais complementares à seqüência do pBluescript SK+ nas duas orientações, 5' e 3' com relação ao gene inserido.

## **2. Mutagênese sítio específica**

A mutagênese sítio específica é uma técnica utilizada para alterar seqüências específicas de nucleotídeos de segmentos de DNA clonados. No caso do procedimento por nós adotado (41) esta alteração é obtida utilizando-se um oligonucleotídeo sintético cuja seqüência contenha a mutação de interesse. DNA de fita simples é preparado a partir de fagemídeos que cresceram em cepas com genótipo dut-, ung- (RZ1032 ou CJ236) juntamente com o fago auxiliar (R408). Estas cepas são deficientes na enzima dUTPase (o produto do gene dut), resultando no aumento intracelular de dUTP, que compete pelo dTTP na incorporação ao DNA. O uracil assim incorporado não é retirado devido à deficiência de uracil glicosilase, produto do gene ung. O molde de DNA purificado contém resíduos uracil; este DNA é biologicamente ativo em cepas incapazes de remover os resíduos uracil. Após hibridização do oligonucleotídeo que contém a seqüência desejada ao DNA de fita simples contendo a seqüência original, o iniciador é estendido com o fragmento de Klenow da DNA polimerase I e as extremidades são ligadas com T4 DNA ligase. O DNA assim obtido é utilizado para transformação de cepas dut+, ung+ (ex JM101, HB2151). Nestas cepas o molde contendo resíduos uracil deve ter uma forte desvantagem em relação ao DNA que contém a mutação, pois o molde original é inativado biologicamente através da ação da uracil glicosilase.

### ***Preparação de DNA fagemídico de fita simples (DNAfs):***

A preparação do DNA fagemídico de fita simples foi realizada fazendo-se a transformação de cepas de E. coli contendo o episossomo F' e o genótipo dut-, ung- (RZ1032 ou CJ236) para uso no procedimento de mutagênese sítio específica.

Uma colônia de uma placa de agar LB com E. coli recém transformada com o fagemídeo original foi transferida para um tubo esteril contendo 1,5 ml de meio YT com o antibiótico adequado e deixou-se crescer sob agitação a 37°C até que a densidade óptica a 600 nm atingisse 0,2 u.o. (unidades ópticas). Adicionaram-se então 10 µl de um estoque de fago auxiliar R408 (com aproximadamente 10<sup>10</sup>ufp/ml). As culturas foram deixadas sob agitação a 37°C por 5-6 horas, decantando-se em seguida o material em microcentrífuga a 12000 rpm por 5 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo estéril e adicionaram-se 200 µl de uma solução de polietilenoglicol (PEG) 8000 a 20% e NaCl 2,5 M, agitando-se e deixando-se 15 minutos a temperatura ambiente. O tubo de microcentrífuga contendo o DNA fágico foi centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm. O pellet foi ressuspenso em 100 µl de TE, sendo extraído com 50 µl de fenol (pré-equilibrado com solução de Tris HCl pH 8,0). A fase aquosa foi transferida para outro tubo e adicionaram-se 9 µl de acetato de sódio 3M (pH 5,5) e 300 µl de etanol. Deixou-se 15 minutos a -20°C para a precipitação do DNA e o tubo foi centrifugado em microcentrífuga a 12000 rpm por 5 minutos, retirando-se o sobrenadante e lavando-se o precipitado com etanol a 70% e secando-se. O DNAfs foi então ressuspenso em 25 µl de TE, quantificado após eletroforese em gel de agarose a 0,6% e estocado a -20°C.

***Procedimento de Mutagênese sítio específica:***

O anelamento foi feito com 5  $\mu$ l (1pmol) de DNAs contendo resíduos uracila, 1  $\mu$ l do oligonucleotídeo fosforilado (5 pmoles), 1  $\mu$ l de tampão de anelamento e 3  $\mu$ l de água destilada; incubou-se a 55°C por 5 minutos e deixou-se esfriar a temperatura ambiente por 10 minutos. O molde de DNA foi copiado após a adição dos seguintes reagentes: 4  $\mu$ l de 2,5 mM de cada um dos 4 nucleotídeos em TE, 1  $\mu$ l de tampão de ligase 10 vezes concentrado, 1  $\mu$ l de ATP 10 mM, 2  $\mu$ l de água destilada, 1 unidade de DNA polimerase-Klenow e 1 unidade de T4 DNA ligase. A mistura de reação foi incubada por duas horas a temperatura ambiente sendo que 5  $\mu$ l desta mistura foram utilizados para a transformação de bactérias E. coli competentes (cepa dut+, ung+).

### 3. Expressão de hPRL

Testes de expressão de rec-hPRL foram feitos para os 4 vetores plasmídicos por nós construídos: p $\beta$ 23hPRL em E. coli, cepa RRI; pESP4hPRL2, p1813hPRL2 e p3SN8hPRL2 em HB2151. Para os vetores que apresentaram expressão significativa de rec-hPRL, foram realizados testes de otimização para obtermos as melhores condições de expressão da proteína desejada: com variações no tempo de ativação, temperatura, quantidade de agente ativador (IPTG), meios de cultura e cepas de E. coli recém transformadas, com 8, 18 e 25 dias de transformação.

#### A) p $\beta$ 23hPRL

A 20 ml de meio LB contendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml) foi adicionada 1 colônia de E. coli, cepa RRI, contendo o p $\beta$ 23hPRL2, deixando a 30°C sob agitação até que a absorbância a 280 nm atingisse 1,0; quando então a temperatura foi elevada para 42°C deixou-se ainda sob agitação por mais 10 horas para ativação do promotor P<sub>L</sub> de  $\lambda$ .

#### B) pESP4hPRL2, p1813hPRL2 e p3SN8hPRL2

A 3 ml de meio YT contendo o antibiótico adequado (100  $\mu$ g/ml de ampicilina para o pESP4hPRL2 e 30  $\mu$ g/ml de kanamicina para os outros dois vetores) adicionou-se uma colônia de E. coli cepa HB2151 com o vetor plasmídico de expressão; realizaram-se incubações de 8 horas, sob agitação a 37°C. A 20 ml de meio YT com IPTG 2mM e o antibiótico adequado se adicionaram 20  $\mu$ l da cultura anterior, ativando-se por 16 horas.

### 3.1. Choque osmótico das bactérias

O fluido periplásmico bacteriano foi obtido através de choque osmótico como descrito por Koshland e cols. (40) para as bactérias contendo plasmídeos com sequência guia. Após o período de ativação, mediu-se a densidade óptica a 600 nm e centrifugaram-se as bactérias a 7000 g por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em solução de sacarose a 20% em Tris HCl 10 mM, pH 7,5, calculando o volume a ser adicionado da seguinte forma:



$$\text{Vol. sol. de sacarose} = \frac{\text{U.O.} \times \text{vol. meio de cultura (ml)}}{100}$$

U.O. = unidade óptica

Logo após adicionou-se uma solução de EDTA 0,5M, pH 8,0, sendo seu volume = 1/30 do volume da solução de sacarose. As células foram deixadas em banho de gelo por 10 minutos, centrifugando-se em seguida por 10 minutos a 7000 g e desprezando-se o sobrenadante. H<sub>2</sub>O destilada gelada foi adicionada às bactérias utilizando-se o mesmo volume daquele utilizado para a solução de sacarose e novamente fez-se incubação de 10 minutos em gelo. A suspensão contendo as bactérias foi novamente centrifugada nas mesmas condições, recolhendo-se o sobrenadante.

### **3.2. Condições de extração e renaturação de rec-hPRL de grânulos citoplasmáticos bacterianos:**

Para a extração de rec-hPRL de grânulos citoplasmáticos, seguimos o procedimento de Luck e cols (53).

Após ativação as bactérias foram centrifugadas a 7000 g por 10 minutos e ressuspensas em 8 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 contendo ditiotretol (DTT) 10 mM e fluoreto de p-fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM e lisadas em sonicador. Os lisados foram centrifugados a 20000 g por 30 minutos a 4°C e os pellets contendo os corpos de inclusão suspensos em 1,6 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 contendo DTT 1 mM; PMSF 0,1 mM e 1% de deoxicolato de sódio, incubando-se uma hora a 37°C e centrifugando-se em seguida. Após lavagem com H<sub>2</sub>O, os pellets foram extraídos a 4°C com 200 µl de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 contendo 0,2% de N-lauril sarcosina por 18 horas. Para a renaturação da hPRL, 200 µl dos extratos foram diluídos com 400 µl de tampão borato de sódio 0,1 M pH 10 contendo 0,2 % de N-lauril sarcosina. As amostras foram incubadas por uma hora a 20°C em tubos de microcentrifuga com as tampas abertas para oxidação em atmosfera de alta umidade a fim de evitar evaporação. Ao final da incubação, as soluções foram neutralizadas com a adição de HCl 6N. Após ficar ao ar por 15 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos em microcentrifuga e os sobrenadantes foram estocados a -20°C.

#### **4. Purificação da 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL**

Está descrita no item 2.4.3.(Resultados) a construção dos vetores p3SN8hPRL2 e p1813hPRL2, os quais levam à síntese de uma proteína de fusão contendo 6 aminoácidos histidina, além do sítio de clivagem do fator Xa. O sistema de purificação aplicado por nós é baseado na afinidade seletiva de proteínas que contém 6 resíduos histidina consecutivos, por Ni<sup>2+</sup>-ácido nitriloacético imobilizado em agarose (resina Ni-NTA). Hochuli e cols. (31,32) demonstraram que estas proteínas se ligam seletivamente à resina e que as proteínas que não se ligam seletivamente podem ser eluídas sob condições relativamente estridentes. A proteína de interesse pode ser eluída ou por diminuição do pH ou por competição com o imidazol que se liga ao Ni-NTA e desloca a proteína de interesse. Baixos níveis de imidazol podem ser utilizados para eluir contaminantes que se ligam menos seletivamente à resina (37).

A purificação da 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL foi obtida do seguinte modo: O material obtido do choque osmótico ou de renaturação de corpos citoplasmáticos foi dializado contra tampão fosfato de sódio 50 mM pH 8,0 contendo 0,3 M de NaCl por 16 horas a fim de se eliminar traços de EDTA ou DTT. Ao material dializado foi adicionada a resina Ni-NTA agarose previamente equilibrada no mesmo tampão, em uma proporção de aproximadamente 8 mg de rec-6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL/ml de resina, incubando em agitador por duas horas a 4°C. Este material foi centrifugado a 5000 g por 2 minutos, eliminando-se o sobrenadante. A resina foi lavada com 5 vezes o seu volume de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0 com NaCl 0,3 M, repetindo-se este procedimento e sempre separando-se a resina por centrifugação. O mesmo processo foi repetido com tampão contendo 20 mM de imidazol e finalmente eluiu-se a rec-hPRL com 100 e 200mM de imidazol no mesmo tampão.

## 5. Análise da hPRL recombinante

A análise quantitativa de hPRL recombinante produzida pelas bactérias transformadas foi realizada por radioimunoensaio (RIE), enquanto que a análise qualitativa desta proteína se fez por SDS-PAGE e Western blotting.

### 5.1. Radioimunoensaio

A imunoatividade da hPRL foi dosada por RIE montado na TBM.

Curva padrão: A partir de uma solução padrão de hPRL (NIDDK) contendo 10 µg/ml, foram feitas diluições para a curva padrão nas seguintes concentrações : 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,2 e 3,1 ng hPRL/ml

Traçador: hPRL altamente purificada de origem hipofisária foi utilizada para a radioiodação pelo método de Cloramina T (35) e purificado em coluna de exclusão molecular Sephadex G100, obtendo-se <sup>125</sup>I-hPRL com atividades específicas da ordem de 14 a 38 µCi (518 - 1406 KBq)/µg de proteína. Nos ensaios foram colocados 20.000cpm de traçador por tubo.

Anti-soro: O antissoro anti-hPRL do NIDDK foi utilizado numa diluição fixa de 1:300.000, que já havia sido previamente estabelecida.

Controles de qualidade: Duas amostras de hPRL utilizadas como controles de qualidade (CQ) foram dosadas em 11 diferentes ensaios para a determinação da reprodutibilidade interensaio:

CQ1= 87,1 + 9,5 (CV= 10,9%)

CQ2= 28,2 + 3,6 (CV= 12,8%)

O protocolo de incubação utilizado para as determinações da hPRL foi o seguinte:

Amostras para determinação de:	Tampão de ensaio	Amostra	Traçador	Antissoro	Soro artif.
a)Lig. inesp.	170 µl	-	100 µl	-	30 µl
b)Lig. total	70 µl	-	100 µl	100 µl	30 µl
c)Curva padrão	40 µl	30 µl	100 µl	100 µl	30 µl
d)Desconhecidos	40 µl	30 µl	100 µl	100 µl	30 µl

Cada amostra foi dosada em duplicata. As incubações foram efetuadas a 4°C por 24 horas. Para a separação das frações livre e ligada foram utilizados 100 µl de segundo antissoro, anti IgG de coelho diluído 1:5; incubando-se por duas horas a 4°C. Logo após adicionaram-se 2 ml de H<sub>2</sub>O, centrifugado-se a 3000 g por 30 minutos e contando-se a radioatividade dos precipitados em contador de radiação  $\gamma$  (Auto-gamma, modelo Cobra da Packard, Meriden, CT, EUA).

A curva padrão foi traçada em gráfico log/logito (log da concentração da dose x logito das porcentagens de ligação). A reta de regressão linear foi calculada para cada curva padrão e, partindo-se do logito da porcentagem de ligação obtida para cada amostra, calculou-se a dose de hPRL presente nas amostras desconhecidas.

## 5.2. SDS-PAGE

Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% na presença de dodecil sulfato de sódio (42), sob condições não redutoras, foi realizada para a análise da rec-hPRL. Após a corrida eletroforética, o gel foi fixado e corado com "Coomassie Brilliant Blue G".

### **5.3. Western blotting**

#### ***Transferência***

Para a realização do Western blotting da hPRL recombinante, seguiu-se basicamente a técnica de Burnette (8), com menores modificações, utilizando-se antissoro anti-hPRL produzido em cobaias e  $^{125}\text{I}$ -Proteína A .

A transferência das proteínas foi realizada por eletroeluição do seguinte modo: colocaram-se do polo + para o polo - 7 folhas de papel de filtro 3MM pré umedecido em tampão de transferência e em seguida o filtro de nitrocelulose, o gel e mais 7 folhas de papel 3MM pré umedecidas. A corrente foi fixada de acordo com a área do gel, calculando: Corrente aplicada (mA) = área (cm<sup>2</sup>) x 0,85. A transferência foi realizada em duas horas.

#### ***Incubação com antissoro e lavagens do filtro***

A folha de nitrocelulose foi tratada por uma hora com tampão fosfo-salino (PBS) contendo 5% de leite em pó desnatado e liofilizado (Molico) e incubada por 18 horas a temperatura ambiente com 20 ml de antissoro anti-hPRL diluído 1:100 em PBS + 5% de leite em pó. Após a incubação com o antissoro foram feitas 5 lavagens com 5% de leite em PBS. A incubação com  $^{125}\text{I}$ -Prot A foi realizada por uma hora com 20 ml de uma solução contendo 400.000 cpm/ml deste traçador em PBS com 5% de leite. Foram feitas 6 lavagens com PBS contendo 0,01% de Tween 20, colocando-se em seguida o filtro para exposição em chassis contendo filme radiográfico e intensificadores por aproximadamente 4 horas a -80°C, revelando-se o filme a seguir.

### **5.4. Dosagem de proteínas totais**

A dosagem de proteínas foi realizada por uma hora segundo o método de Lowry e cols (51), utilizando-se como padrão protéico a soroalbumina bovina fração V (SIGMA), sendo o intervalo de leitura de 15 a 500 µg de proteínas/ml.

## **6. Uso da 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL em RIE:**

### **6.1. Uso como padrão:**

A proteína recombinante 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL purificada foi utilizada como padrão em radioimunoensaio de hPRL nas seguintes concentrações: 67,2; 33,6; 16,8; 8,4 e 4,2 ng/ml em comparação com hPRL de origem hipofisária diluída como de rotina no nosso RIE (Ítem 5.1), a fim de verificarmos o paralelismo entre as duas curvas e conseqüentemente a sua possibilidade de utilização para esta finalidade.

### **6.2. Uso como traçador:**

A mesma preparação de rec-6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL utilizada no ítem anterior foi também utilizada para a marcação com  $^{125}\text{I}$  pelo método da Cloramina T (35). Amostras desconhecidas ( $n = 12$ ) em várias concentrações (de 5 a 300 ng/ml) foram determinadas por RIE utilizando padrão de hPRL de origem hipofisária a fim de estudarmos a correlação entre os valores obtidos com o uso dos dois traçadores:  $^{125}\text{I}$ -rec-6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL e  $^{125}\text{I}$ -pit hPRL.

## **RESULTADOS**

### **1. Seleção da genoteca de cDNA hipofisário para o cDNA de hPRL e subclonagem em vetor plasmídico**

#### **1.1. Seleção da genoteca de cDNA hipofisário**

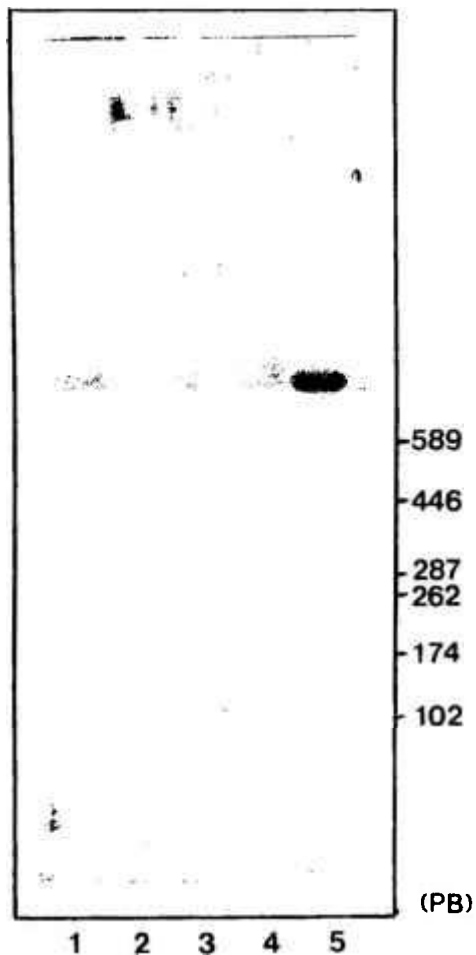
A hibridização da genoteca de cDNA utilizando como sonda o cDNA de rPRL forneceu 5 clones apresentando sinal positivo (n<sup>os</sup> 1, 2, 4, 5 e 17), enquanto quando foi utilizado como sonda o oligonucleotídeo complementar à seqüência inicial (5') do gene da hPRL forneceu 3 clones purificados (n<sup>os</sup> 4, 5 e 17), o que nos leva a acreditar que em dois dos clones estava ausente a porção 5' terminal do cDNA de hPRL complementar ao oligonucleotídeo sintético.

A enzima Eco RI digere o cDNA de hPRL em dois fragmentos de aproximadamente 250 e 650 pb. Na figura 3 podemos observar o resultado do procedimento de Southern blotting das amostras dos clones purificados após digestão com Eco RI e eletroforese, observando-se sinais positivos com pesos moleculares de aproximadamente 650 pb após hibridização com a sonda de cDNA de rPRL, sendo esta a confirmação esperada de que nestes vetores se encontra realmente o cDNA de hPRL. As bandas de aproximadamente 250 pb observadas não apresentaram sinais positivos, provavelmente por esta ser uma região de baixa homologia entre os cDNAs de rPRL e de hPRL.

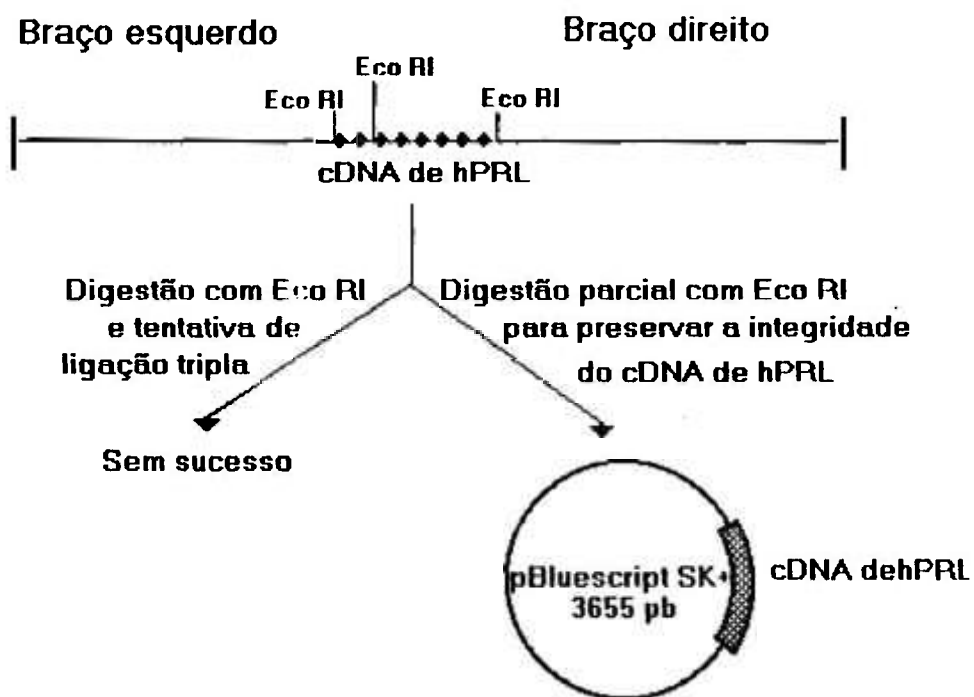
Os clones selecionados para a subclonagem posterior foram os de n<sup>os</sup> 5 e 17.

#### **1.2. Subclonagem**

A subclonagem do clone n<sup>o</sup>5 foi realizada com sucesso no pBluescript, obtendo-se o cDNA de hPRL íntegro mediante digestão parcial, como esquematizado na Figura 4. Isto foi comprovado por digestão com enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose a 1,2% . O seqüenciamento parcial deste gene foi realizado, permitindo a leitura dos nucleotídeos de 42 a 204 com um iniciador e dos nucleotídeos de 711 a 900 (Figura 2) com outro iniciador, presumindo-se íntegra, portanto, a região a ser traduzida.



**Figura 3:** Southern blotting dos clones selecionados. Eletroforese das amostras de DNA viral digeridas com Eco RI em agarose 1,2%:transferência para filtros de nitrocelulose e hibridização com sonda de cDNA de rPRL. As colunas de 1 a 5 correspondem aos clones 1; 2; 4; 5 e 17 respectivamente.



**Figura 4:** Esquema de subclonagem do cDNA de hPRL em pBluescript SK+



## 2 Construção dos vetores plasmídicos de expressão

### 2.1. Organismo hospedeiro de expressão

Decidiu-se pela utilização de *E. coli* como organismo de expressão, cujas tecnologias de fermentação, extração e mainuseio em geral são mais conhecidas e, especialmente mais econômicas que outros tipos de culturas. Sua eficiência de expressão é considerada uma das mais altas.

### 2.2. p $\beta$ 23hPRL

O p $\beta$ 23hPRL foi derivado do pB-UC que possui promotor P<sub>L</sub> de fago  $\lambda$ , sendo induzido pela elevação de temperatura e possui resistência à ampicilina.

#### 2.2.1. Promotor

O promotor P<sub>L</sub> de bacteriófago  $\lambda$  (5) foi escolhido por ser um promotor forte, regulável pela temperatura e que pode, portanto, ser controlado.

Em nosso caso, utilizamos o plasmídio pB-UC, que possui o promotor P<sub>L</sub> de  $\lambda$ , o qual é reprimido pela proteína cI<sub>ts</sub>, produzida por um gene presente em outro plasmídio, o pRK248cI<sub>ts</sub>, na cepa RRI (recA<sup>+</sup>) e deve agir em trans em P<sub>L</sub> quando a temperatura for de 30°C e ser inativada, desreprimindo o promotor, quando a temperatura for de 42°C (14). Uma alternativa interessante à inativação térmica do repressor cI (e conseqüente desrepressão do promotor) é a inativação química através da mitomicina C ou do ácido nalidíxico. Esta pode ser realizada na cepa AR120 (63) que carrega os genes cI e da proteína reguladora N integrados ao cromossoma e na qual os compostos acima mencionados induzem a inativação, mediada pela proteína Rec A, do repressor cI a 37°C. Para esta finalidade não podem ser usadas as mesmas células hospedeiras RRI porque carregam, em forma plasmídica ou lisogênica, a mutação termosensível cI<sub>ts</sub>, juntamente com uma segunda mutação no repressor que lhes confere resistência à inativação pela proteína RecA (50, 63).

A região de ligação ao ribossomo em procaríotes é caracterizada pela seqüência Shine-Dalgarno (SD) AGGA, (79) que, se presume, interaja com uma

seqüência complementar na região 3' terminal do RNA 16S ribossomal.

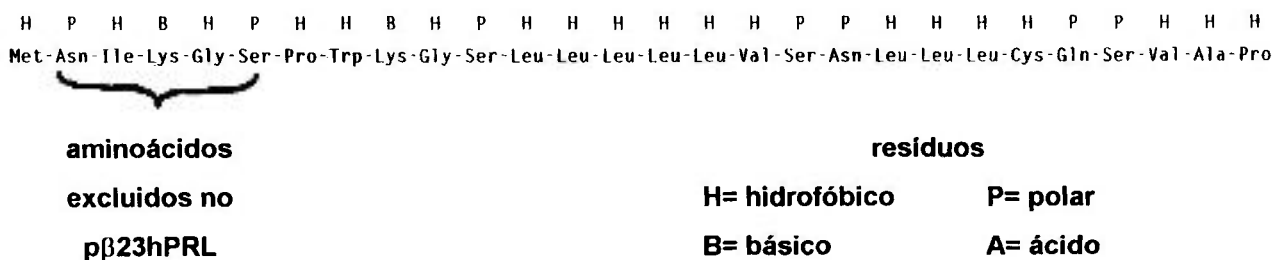
A distância entre a região SD e o codon de iniciação da tradução, como também a composição de nucleotídeos nesta região, afeta a eficiência de tradução (89, 91). Dalboge e cols. (15) obtiveram um alto nível de expressão de hGH em E. coli com uma distância entre SD e codon de iniciação (ATG) de 6 a 15 nucleotídeos e uma alta porcentagem de nucleotídeos A e T. Neste vetor de expressão, foram colocados 10 nucleotídeos entre SD e ATG:

SD  
5' AGGAGGAATTCAATATG 3'

### 2.2.2. Peptídeo sinalizador

A E. coli possui a membrana citoplasmática e a membrana externa ou parede, que são separadas pelo espaço periplásmico. As proteínas que apresentam seqüência sinalizadora, após a síntese no citoplasma, são transportadas através da membrana interna até o espaço periplásmico bacteriano, onde sob a ação de proteases específicas, as proteínas são clivadas, perdendo o seu peptídeo sinalizador. Segundo Gray e cols. (26), este transporte e o ambiente periplásmico possuem um papel importante na formação correta de pontes dissulfídicas de proteínas recombinantes.

Em nosso projeto de construção do vetor pβ23hPRL, optamos pela obtenção no espaço periplásmico de hPRL natural, sem a metionina inicial. Utilizamos para isso um peptídeo sinalizador com 23 aminoácidos, 5 a menos que os 28 presentes na pré-hPRL, com base em considerações teóricas relativas à natureza físico-química dos mesmos aminoácidos (Figura 5).



**Figura 5:** Peptídeo sinalizador da hPRL

O funcionamento de peptídeos sinalizadores humanos tem sido comprovado em procariotes, obtendo-se o processamento correto das proteínas eucarióticas (26), porém a média do número de aminoácidos presentes nos peptídeos sinalizadores é menor nas bactérias do que em humanos (88).

### 2.2.3. Construção do p $\beta$ 23hPRL

O vetor p $\beta$ 23hPRL foi obtido através de três etapas esquematizadas na Figura 6.

A) A primeira etapa foi a preparação de um adaptador de fita dupla contendo os primeiros 14 nucleotídeos da seqüência codificante do peptídeo sinalizador alternativo de 23 aminoácidos (ver item anterior) que incluiu na extremidade 3' um sítio Ppu MI:



O anelamento das duas fitas de DNA foi realizado seguindo-se o método de Lathe e cols. (43) e a dupla fita de DNA foi tratada com kinase e ATP para fosforilação, o que facilita a ligação entre terminais de DNA.

B) A segunda etapa foi a digestão do pB-UC, já contendo o promotor PL de  $\lambda$  e o SD, com Hind III e purificação com fenol/clorofórmio a fim de eliminar a enzima e tratamento com fragmento de Klenow da DNA polimerase I, para formação de extremidades não proeminentes da dupla fita de DNA. Após extração com fenol/clorofórmio e precipitação, foi realizada a digestão com Eco RI, a defosforilação do DNA com fosfatase alcalina e a purificação do DNA em gel de agarose. O DNA pB-UC assim tratado reagiu com o adaptador contendo as extremidades compatíveis (não proeminentes e Eco RI) e o produto de ligação (p $\alpha$ 23) foi usado para transformação de células competentes.

A análise de restrição foi realizada com a enzima Ava II que no vetor correto ( $p\alpha 23$ ) forneceu 3 fragmentos de DNA (222 + 923 + 1395 pb), enquanto o vetor original pB-UC, se religado, forneceria somente 2 fragmentos (222 + 2291 pb). Realizou-se ainda digestão com as enzimas Bgl II + Eco RI e Bgl II + Ava II que forneceram, respectivamente, fragmentos de 266 + 2274 pb e 222 + 288 + 635 + 1395 pb. Estas últimas digestões foram realizadas para termos certeza da correta orientação do adaptador no vetor  $p\alpha 23$ . Pelas digestões realizadas, concluímos que foi obtida a construção desejada.

C) A terceira etapa foi a junção do  $p\alpha 23$ , digerido com Ppu MI e purificado, ao fragmento de 686pb do gene de hPRL contido entre dois sítios Ppu MI (clonado no pBluescript SK+), que não possui os primeiros nucleotídeos da sua porção inicial, ligação com a enzima T4 DNA ligase e transformação de células competentes RRI. Através de análise de restrição foram identificados os clones com as seqüências corretas.

A digestão com Ava II forneceu fragmentos de 222 + 686 + 923 + 1395 pb para os clones contendo o DNA desejado ( $p\beta 23hPRL$ ). Obviamente o fragmento do gene de hPRL incluído entre dois sítios Ppu MI poderia ter entrado de maneira correta ou invertida. A orientação correta foi confirmada com a enzima de restrição Bgl II que forneceria os fragmentos de 778 + 2448 pb no caso da correta inserção e de 484 + 2742 pb no caso de inserção invertida do gene de hPRL. Reconfirmou-se ainda com a enzima Eco RI, que forneceria os fragmentos de 193 + 3033 pb no caso de orientação correta e de 537 + 2690 pb no caso de orientação invertida.

O produto desta ligação foi denominado  $p\beta 23hPRL$ .

D) Após a construção do vetor de expressão, foi realizado o seqüenciamento total do gene de hPRL pelo método de Sanger (77), confirmando as nossas expectativas da seqüência correta.

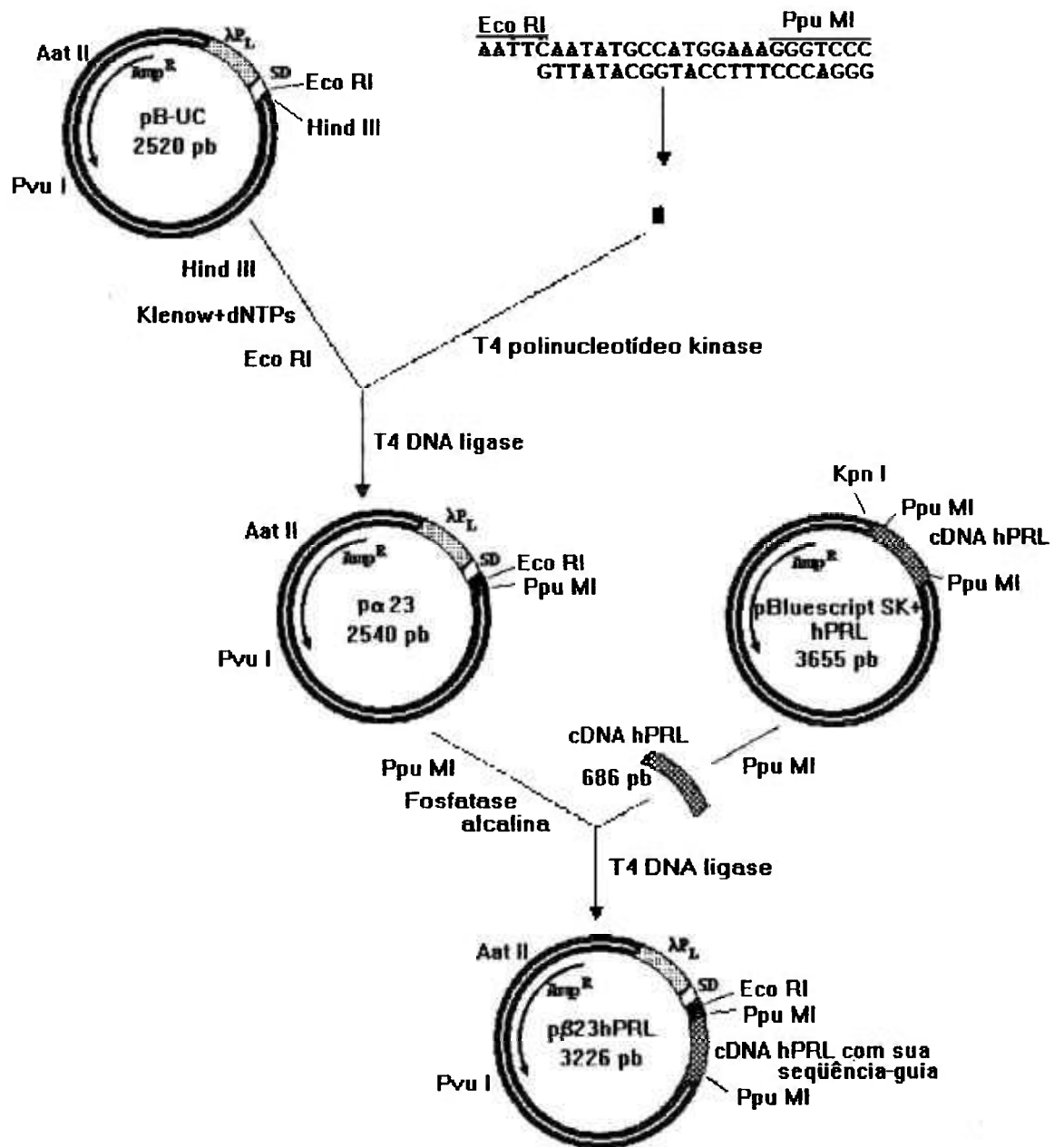


Figura 6: Construção do plasmídeo β23hPRL

## 2.3. pESP4hPRL2

O vetor pESP4 foi o plasmídeo utilizado pelo grupo do Dr. Michael Smith do Laboratório de Biotecnologia da Universidade de British Columbia, Vancouver, Canadá para a expressão da PRL bovina (bPRL) (52) e que é ainda utilizado para os estudos de relação estrutura-função deste hormônio (53, 54, 55, 56), tendo sido gentilmente cedido por este grupo. O pESP4hPRL2 foi construído sem seqüência guia ("leader sequence"), assim sendo, a proteína sem peptídeo sinalizador seria expressa e estocada no citoplasma como Met-hPRL.

### 2.3.1. Promotor

O pESP4 é derivado do pEMBL (17), possuindo o promotor lac. Os genes lac, dentre os quais está a  $\beta$ -galactosidase, são também controlados por um tipo de regulação negativa, ou seja, eles são transcritos a menos que inativados pela proteína reguladora. O repressor previne a transcrição por ligação com uma seqüência de DNA denominada operador, cujo sítio está localizado entre o promotor e o gene da  $\beta$ -galactosidase, impedindo a RNA polimerase de iniciar a transcrição. Quando o indutor  $\beta$ -galactosídeo está presente, ele se liga ao repressor para formar um complexo repressor-indutor, modificando a conformação da proteína repressora de uma maneira que impede a sua ligação ao DNA. O promotor lac é ativado pela presença de isopropyl  $\beta$ -D tiogalactopiranosídeo (IPTG) por apresentar analogia estrutural com um  $\beta$ -galactopiranosídeo (47)

O número de nucleotídeos entre a região SD e o ATG nesta construção é de 8 nucleotídeos com alta porcentagem de nucleotídeos A e T:

SD

5'AGGAATTCTATTATG 3'

### 2.3.2. Construção do pESP4hPRL2

A construção do pESP4hPRL2 se fez em três etapas demonstradas na Figura 7:

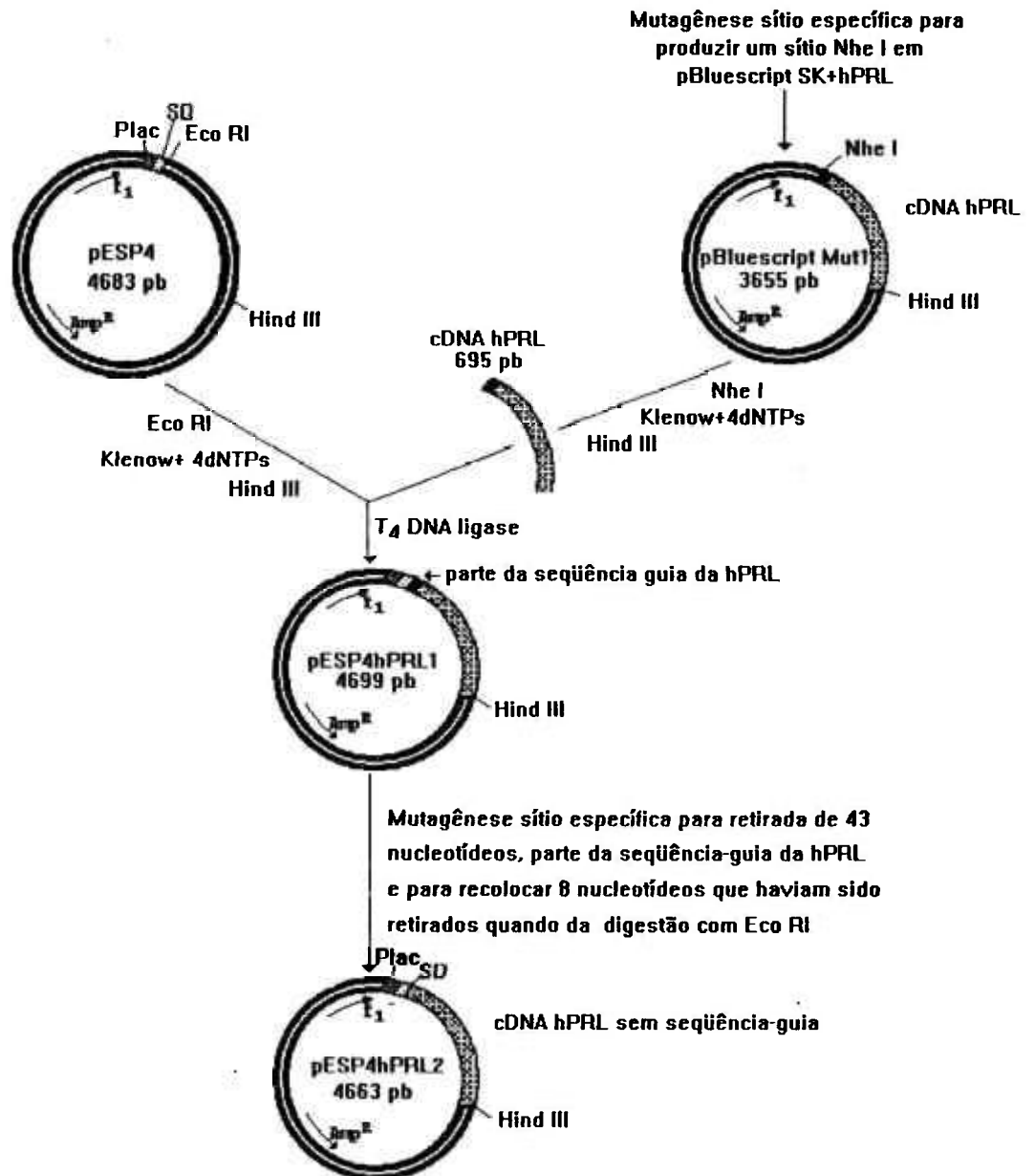


Figura 7: Construção do plasmídeo ESP4hPRL2

A) Mutação específica no cDNA de hPRL clonado no vetor pBluescript SK+ a fim de produzir um sítio Nhe I. Foi sintetizado um oligonucleotídeo de 25 bases a ser utilizado na mutagênese a fim de trocar a seqüência GCTGGT dos nucleotídeos de -35 a -40 (calculados a partir do primeiro codon da "proteína madura") do cDNA de hPRL, os quais fazem parte da seqüência guia, pelo sítio de restrição da enzima NheI: GCTAGC. O oligonucleotídeo usado foi o seguinte:

5' GCAGGTTTGAC**GCTAGC**AGCAGCAG 3'

O produto desta mutação se denominou pBluescriptMut1. O DNA plasmídico das bactérias transformantes foi testado por digestão com Nhe I + Hind III para termos confirmação da aquisição do sítio para Nhe I. No caso da aquisição deste sítio por mutagênese, esta digestão nos forneceria três fragmentos (100 + 692 + 2863 pb), enquanto na ausência deste, seriam somente obtidos dois fragmentos (100 + 3555 pb)

B) A segunda etapa de construção foi a digestão do DNA plasmídico de pBluescriptMut1 com NheI, purificação, tratamento do DNA com fragmento de Klenow, juntamente com os quatro nucleotídeos para a formação de extremidade não proeminente, extração com fenol/clorofórmio e precipitação do DNA. Ressuspendeu-se o DNA em TE e foi feita digestão com Hind III, purificando-se o fragmento de 695 pb, no qual está contido o gene da hPRL (dos nucleotídeos 102 a 797 calculados a partir do início da transcrição - Figura 2) e feita a reação de ligação com o vetor pESP4 já tratado com Eco RI/Klenow/Hind III efetuando-se a transformação de células competentes de *E. coli*, cepa JM 101. O plasmídeo resultante desta ligação foi denominado pESP4hPRL1.

A análise no vetor pESP4hPRL1 foi realizada por digestão com as enzimas de restrição Eco RI + Bgl II e forneceu os fragmentos de 154 + 319 + 4226 pb. No caso que o vetor pESP4 (Eco RI / Klenow / Hind III) tivesse se fechado sem aquisição do fragmento de cDNA de hPRL, não haveriam sítios de restrição para as enzimas Eco RI ou Bgl II.

C) Realizou-se novamente mutagênese sítio específica em pESP4hPRL1 desta vez para a retirada dos 43 nucleotídeos na região 5' do gene da hPRL, parte da seqüência guia desta proteína e também para repor os 8 nucleotídeos (região SD-ATG) que foram retirados quando da digestão do pESP4 com Eco RI (ver no item B). O produto desta mutagênese se denominou pESP4hPRL2. Para a



realização desta mutagênese foi sintetizado um oligonucleotídeo sintético de 59 bases. Os nucleotídeos evidenciados são os 8 repostos pela mutagênese::

5' GCAGCCCCGCCGGGACAGATGGGCAAC**CATAATAG**AATTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG 3'

Para uma primeira seleção dos clones contendo a mutação desejada foi realizada digestão com a enzima Eco RI, obtendo-se no caso do vetor correto (pESP4hPRL2) fragmentos de 123 + 4540 pb e no caso da mutação não ter ocorrido, de 154 + 4509 pb.

D) Foi realizado o seqüenciamento total do gene da hPRL, sendo confirmada a mutagênese correta.

## 2.4. p1813hPRL2 e p3SN8hPRL2

### 2.4.1. Promotor

O promotor utilizado nos plasmídeos p1813 e p3SN8 é o tac, um híbrido dos promotores trp e lac (6), sendo reprimido pelo repressor de lac e desreprimido pela presença de IPTG. A distância entre SD e ATG é de 9 nucleotídeos para os dois vetores:

SD

5' AGGAGATATATCCATG 3'

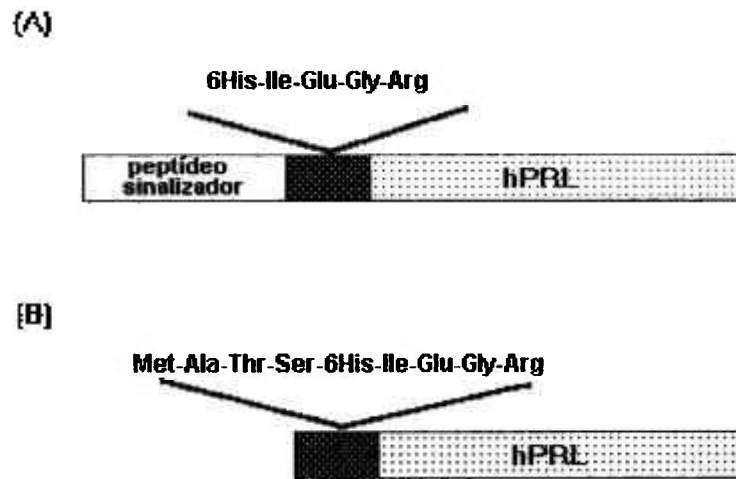
### 2.4.2. Peptídeo sinalizador

No p3SN8 já havia sido introduzida a seqüência guia da celulase bacteriana de Cellulomonas fimi pelo grupo do Dr Roger Graham (66) e portanto, uma proteína expressa neste promotor seria secretada. O p1813 não apresenta seqüência guia e portanto deve levar à expressão citoplasmática da proteína.

### 2.4.3. Projeto de construção do p3SN8 hPRL2 e p1813hPRL2

Com o intuito de facilitar a purificação posterior da proteína expressa, foram adicionados codons para a produção de uma proteína de fusão com 6 aminoácidos histidina e os aminoácidos Ile-Glu-Gly-Arg na porção amino-terminal da hPRL madura. As seis histidinas serão utilizadas para posterior purificação da proteína de fusão por cromatografia de afinidade com Ni-NTA, e os outros 4 aminoácidos constituem o sítio de clivagem do fator X da coagulação, ativado (Xa), para a obtenção da hPRL autêntica.

As proteínas de fusão obtidas em bactérias contendo os vetores p3SN8hPRL2 e p1813hPRL2 estão esquematizadas na Figura 8.



**Figura 8:** Proteínas de fusão obtidas no citoplasma de *E. coli* HB2151:  
 A) Proteína produzida por p3SN8hPRL2 e processada "in vivo" com secreção periplásmica;  
 B) Proteína produzida por p1813hPRL2 e estocada como grânulos de inclusão citoplasmáticos.

O pBluescriptMut1, obtido através de mutagênese sítio específica do gene de hPRL clonado em pBluescript SK+, como já descrito no item 2.3.2. (Resultados), foi também utilizado para posterior clonagem deste gene nos vetores p3SN8 e p1813. As etapas realizadas foram semelhantes para os dois vetores de expressão p1813hPRL2 e p3SN8hPRL2 e são apresentadas respectivamente nas Figuras 9 e 10.

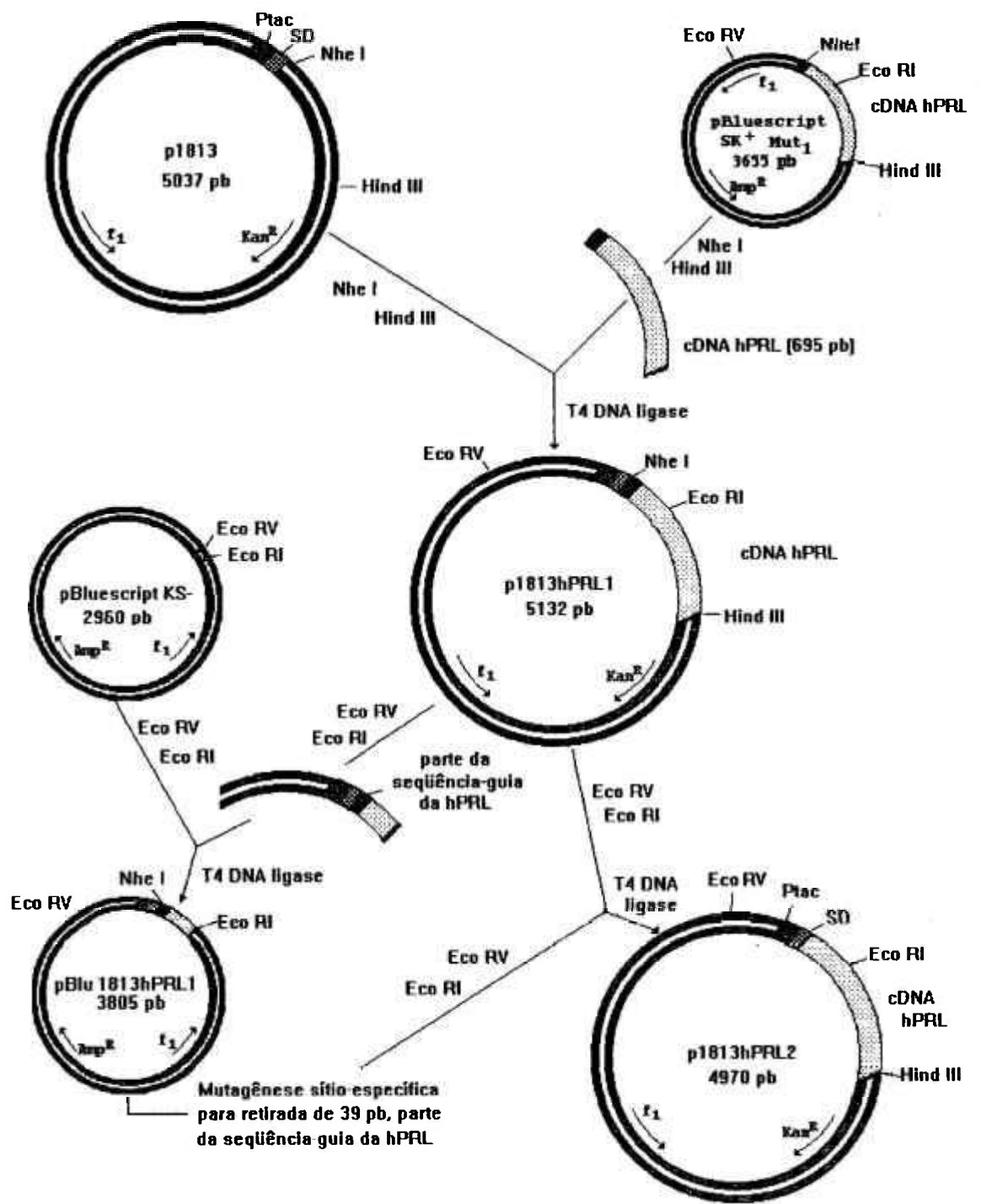


Figura 9 : Construção do plasmídeo 1813hPRL2

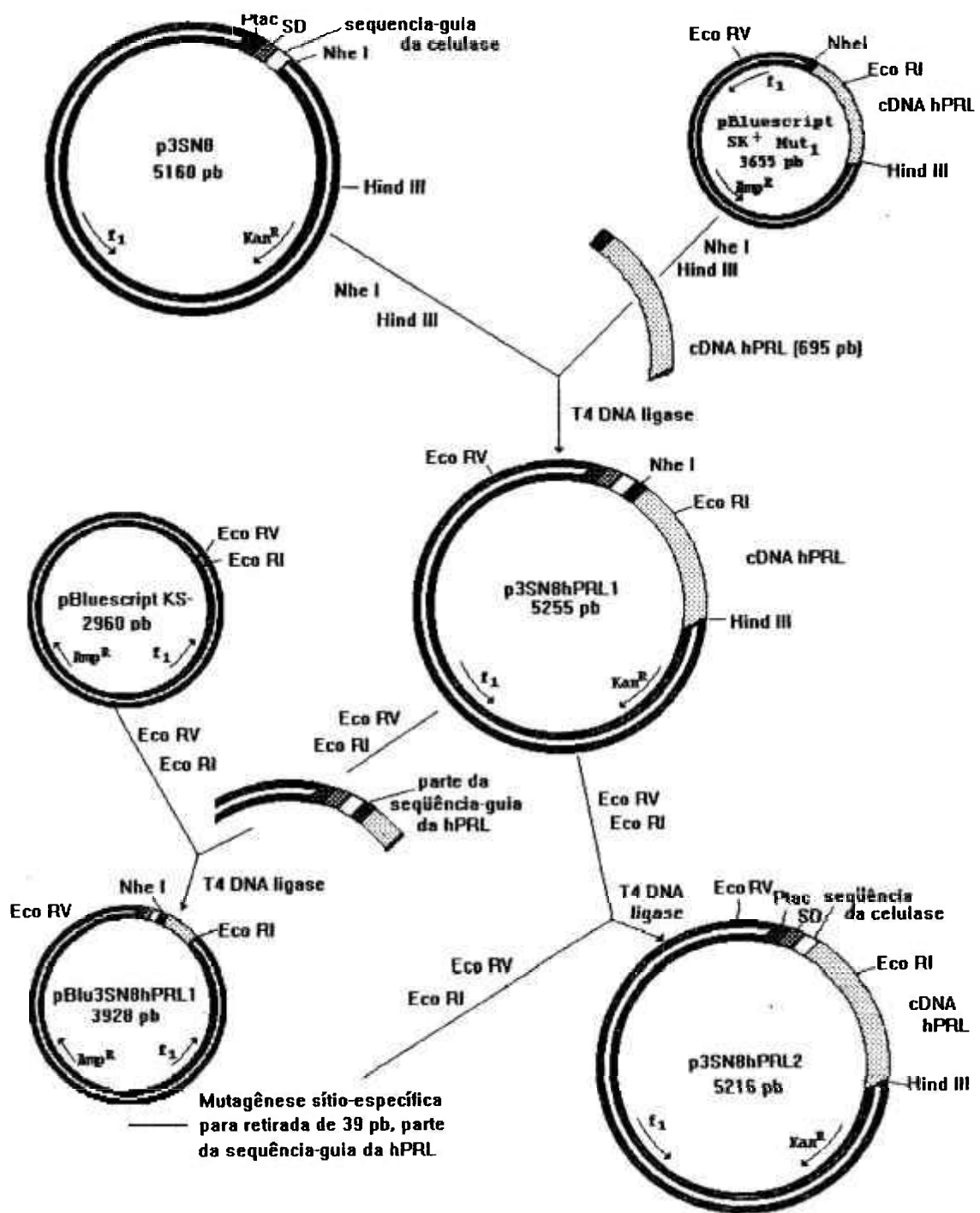


Figura 10: Construção do plasmídeo 3SN8hPRL2

A) Realizou-se digestão dos plasmídeos p3SN8 e p1813 com as enzimas de restrição Nhe I e Hind III, purificação do vetor aberto e utilização para ligação ao fragmento de 695 pb do gene de hPRL obtido do pBluescriptMut1 pela digestão com as mesmas enzimas de restrição e subsequente purificação. Após a transformação de células de E. coli competentes foram purificados os plasmídeos respectivamente denominados p3SN8hPRL1 e p1813hPRL1, confirmando a obtenção da estrutura correta mediante mapa de restrição utilizando as enzimas Nhe I + Hind III. Nos clones corretos foram obtidos dois fragmentos: 695 + 4560 pb (no p3SN8hPRL1) e 695 + 4437 pb (no p1813hPRL1).

B) Para a realização de mutagênese sítio específica visando a deleção de 39 pb (parte da seqüência guia da hPRL) preparamos de DNA de fita simples (fsDNA) do p3SN8hPRL1 e p1813hPRL1, nas cepas RZ1032 e CJ236 (dut-, ung-), não obtendo sucesso em nenhuma das duas. Como procedimento alternativo, fragmentos de 968 pb do p3SN8hPRL1 e de 845 pb do p1813hPRL1 digeridos com as enzimas de restrição Eco RI e Eco RV e purificados foram inseridos em pBluescript KS-, denominando-se respectivamente pBlu3SN8hPRL1 e pBlu1813hPRL1. A análise de restrição foi realizada com as enzimas Eco RI + Eco RV, obtendo-se fragmentos de 968 + 2960 pb (no p3SN8hPRL2) e de 845 + 2960 pb (no p1813hPRL2). Nestes vetores foi possível obter o DNAs e, conseqüentemente, a mutagênese sítio específica na cepa RZ1032, utilizando-se o seguinte oligonucleotídeo sintético de 42 bases como molde:

5' CACCATCACATCGAAGGTAGGTTGCCCATCTGTCCCGGCGGG 3'

C) Após a confirmação da obtenção da mutagênese correta através do seqüenciamento, os fragmentos de 929 pb do pBlu3SN8hPRL1 e de 806 pb do pBlu1813hPRL1 digeridos com Eco RI e Eco RV e purificados foram reclonados nos respectivos vetores de expressão p3SN8hPRL1 e p1813hPRL1, digeridos com as mesmas enzimas e purificados; a ligação com T4 DNA ligase levou à obtenção dos vetores de expressão para hPRL denominados p1813hPRL2 e p3SN8hPRL2 que foram utilizados para a transformação de células E. coli competentes, cepa HB2151. Uma primeira análise da correta mutagênese foi a digestão dos vetores com Nhe I. Nos transformantes mutantes não foi obtida digestão, enquanto naqueles originais seria obtida linearização do plasmídeo.

### 3. Testes de expressão de rec-hPRL

#### 3.1. Expressão com diferentes vetores plasmídicos

Após ativação com IPTG ou mediante elevação de temperatura, a expressão de rec-hPRL foi detectada por RIE no choque osmótico para as bactérias contendo plasmídeo com seqüência guia ou por extração e renaturação de grânulos citoplasmáticos bacterianos para aquelas bactérias contendo plasmídeos sem seqüência guia.

Na Tabela 1 pode-se observar o resultado das determinações realizadas por radioimunoensaio. A expressão de rec-hPRL obtida foi apresentada em  $\mu\text{g}$  de hPRL imunorreativa por mililitros de meio de cultura contendo células bacterianas com densidade óptica = 1,0 ( $A_{600\text{nm}}$ ). Como se pode verificar, os plasmídeos 3SN8hPRL2 e 1813hPRL2. apresentam uma expressão considerável de rec-hPRL. A grande diferença de expressão de hPRL entre estes dois vetores pode ser explicada com base na literatura (60). Como já amplamente descrito, a produção de proteínas recombinantes estocadas no citoplasma é normalmente bem mais elevada do que a produção das mesmas com secreção para o espaço periplásmico.

**Tabela 1: Produção de hPRL nos diversos vetores plasmídicos.**

PLASMÍDEO	$\mu\text{g hPRL/ml/A}_{600}$
p $\beta$ 23hPRL	$<3 \times 10^{-5}$
pESP4hPRL2	0,0007
p3SN8hPRL2	0,41
p1813hPRL2	16,7

### 3.2. Otimização das condições de expressão de rec-hPRL

Foram realizados testes de produção de rec-hPRL por diferentes cepas de Escherichia coli transformadas com os plasmídeos 3SN8hPRL2 e 1813hPRL2, sendo o primeiro plasmídeo estudado mais extensivamente por levar a um produto considerado mais interessante. As soluções de choque osmótico obtidas com 11 diferentes cepas de E. coli transformadas com o p3SN8hPRL2 foram dosadas por RIE e os níveis de hPRL obtidos podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 2: Produção de hPRL em diferentes cepas de E. coli transformadas com o p3SN8hPRL2. Tempo de ativação: 16 horas; IPTG: 2mM; temperatura: 37°C; meio de cultura: YT.**

Cepas de <u>E. coli</u>	D.O. obtida após 15 horas de ativação	$\mu\text{g hPRL/ml/A}_{600}$
01. HB2151	3,54	0,41
02. DH5 $\alpha$	0,62	<0,01
03. JM101	2,23	0,23
04. RV308	1,43	0,20
05. NM522	0,68	<0,01
06. MV1193	2,38	0,40
07. HB2154	2,91	0,30
08. CSH50	4,14	0,62
09. Le392	2,27	0,41
10. JM105	2,48	0,37
11. TGI	1,38	<0,01



A cepa HB 2151 foi escolhida para a produção de rec-hPRL pois apresentou produção razoável de hPRL, sendo que em testes posteriores manteve o mesmo nível de produção de proteína recombinante ( $\bar{X}=0,491\pm0,065$   $\mu\text{g/ml/A600}$ ). O mesmo não ocorreu com as cepas MV1193 ( $\bar{X}=0,418\pm0,309$   $\mu\text{g/ml/A600}$ ), CSH50 ( $\bar{X}=0,327\pm0,230$   $\mu\text{g/ml/A600}$ ) e Le392 ( $\bar{X}=0,309\pm0,253$   $\mu\text{g/ml/A600}$ ), nas quais se observaram grandes alterações e/ou queda na produção de rec-hPRL quando para os testes de expressão se utilizaram cepas transformadas com 8, 18 e 25 dias.

As tabelas 3, 4, 5 e 6 apresentam os testes realizados com variações, respectivamente, no tempo de ativação, concentração de IPTG, meios de cultura e temperatura utilizados durante a ativação de células de E. coli, cepa HB2151 contendo o p3SN8hPRL2.

As condições escolhidas para a expressão de rec-hPRL foram as seguintes: ativação de 16 horas com agitação, a 37°C em meio YT contendo 30  $\mu\text{g/ml}$  de kanamicina e IPTG 2mM. Na Tabela 4 podemos observar que na presença de 4mM do agente ativador IPTG a expressão de rec-hPRL se apresentou 10,4% mais elevada do que na presença de 2mM de IPTG. Não julgamos necessário, no entanto, utilizar a maior concentração de IPTG por este ser um reagente de custo bastante elevado.

Em testes similares nos quais se utilizou o p1813hPRL2, a cepa de E. coli escolhida como hospedeira para expressão de rec-hPRL foi também a HB2151 e as condições de ativação selecionadas para expressão de rec-hPRL foram as mesmas já citadas para o p3SN8hPRL2, tendo sido o comportamento dos dois vetores relativamente análogos (dados não apresentados).

**Tabela 3: Produção de rec-hPRL em *E. coli*, cepa HB2151 transformada com o p3SN8hPRL2, com diferentes tempos de ativação. IPTG: 2mM; temperatura: 37°C; meio de cultura: YT.**

Tempo de Ativação (horas)	Densidade Óptica	µg hPRL/ml/A <sub>600</sub>
10	0,759	0,034
13	2,260	0,068
16	3,490	0,472

**Tabela 4: Produção de rec-hPRL em *E. coli*, cepa HB2151, transformada com o p3SN8hPRL2 e ativada com diferentes concentrações de IPTG. Tempo de ativação: 16 horas; temperatura: 37°C; meio de cultura: YT**

Concentração de IPTG (mM)	Densidade Óptica	µg hPRL/ml/A <sub>600</sub>
0	3,133	<0,01
1	3,295	0,345
2	3,487	0,472
4	3,586	0,521

**Tabela 5: Produção de rec-hPRL em *E. coli*, cepa HB2151, transformada com o p3SN8hPRL2 em diferentes meios de cultura. Tempo de ativação: 16 horas; IPTG: 2 mM; temperatura: 37°C.**

Meio de Cultura	Densidade Óptica	µg hPRL/ml/A <sub>600</sub>
YT	3,487	0,472
LB	5,175	<0,01
SB	14,300	0,030

**Tabela 6: Produção de rec-hPRL em *E. coli*, cepa HB2151 transformada com o p3SN8hPRL2, com diferentes temperaturas de ativação. Tempo de ativação: 16 horas; IPTG: 2mM; meio de cultura: YT .**

Temperatura (°C)	Densidade Óptica	µg hPRL/ml/A <sub>600</sub>
30	5,462	0,179
37	3,487	0,472

#### 4. Purificação da 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL

Na tabela 7, podem ser observadas as etapas de purificação da 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL obtida por choque osmótico de bactérias transformadas com o p3SN8hPRL2 e realizada por cromatografia de afinidade em Ni-NTA agarose. Pode-se verificar que 98,3% da rec-hPRL imunoreativa foi retida na resina e que 88,5% da proteína recombinante foi recuperada praticamente pura. A concentração ótima de imidazol para a eluição da proteína de interesse foi 100 mM. Os valores de atividade específica maiores do que 100% poderiam estar relacionados com uma menor pureza ou perda de imunorreatividade por parte do padrão de hPRL utilizado (NIDDK).

**Tabela 7: Purificação de 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL em amostras de choque osmótico.**

	Volume (ml)	Imidazol (mM)	hPRL por RIE ( $\mu$ g)	Proteínas totais( $\mu$ g)	Atividade específica *
P <sub>1</sub>	2,75	-	64,6	6474,6	0,0101
P <sub>2</sub>	2,75	-	1,1	3773,0	0,0003
P <sub>3</sub>	1,00	50	4,7	502,0	0,009
P <sub>4</sub>	1,00	50	2,0	100,3	0,020
P <sub>5</sub>	0,50	100	52,0	33,0	1,57
P <sub>6</sub>	0,50	100	5,2	3,7	1,40
P <sub>7</sub>	0,50	200	<0,01	indetectável	-
P <sub>8</sub>	0,50	200	<0,01	indetectável	-

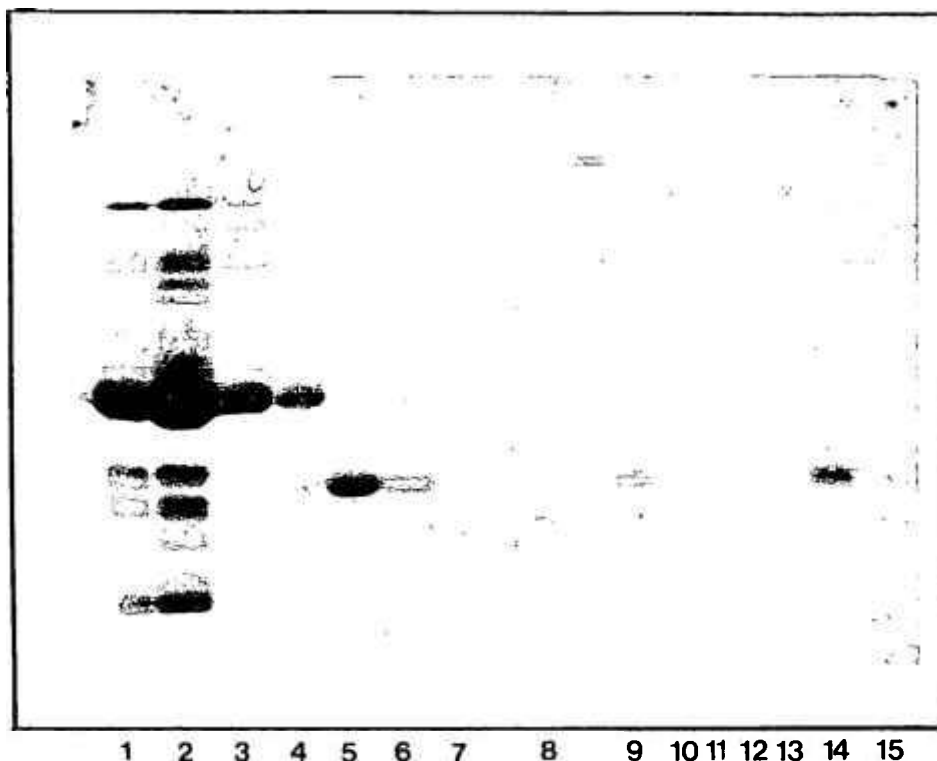
\* -  $\mu$ g de hPRL /  $\mu$ g de proteínas

P<sub>1</sub> = material obtido de choque osmótico após diálise em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0 com 300 mM de NaCl

P<sub>2</sub> = P<sub>1</sub> após incubação com a resina NI-NTA

P<sub>3</sub> a P<sub>8</sub> = frações eluidas da resina

A Figura 11 apresenta o SDS-PAGE realizado nas amostras obtidas de choque osmótico sem agente redutor, antes e após a purificação em Ni-NTA agarose.



**Figura 11:** SDS-PAGE a 12%, sem redutor, de rec-hPRL nas fases de purificação.

**Colunas 1 a 7:** Amostras obtidas de bactérias transformadas com o p3SN8hPRL2

Coluna 1: Choque osmótico (2,10  $\mu\text{g}$  rec-hPRL, dosado por RIE);

Coluna 2: Sobrenadante do choque osmótico após incubação com a resina Ni-NTA agarose (0,05 $\mu\text{g}$  rec-hPRL);

Coluna 3: Fração eluída com 40 mM de imidazol (1,06  $\mu\text{g}$  rec-hPRL);

Coluna 4: Fração eluída novamente com 40 mM de imidazol (2,11  $\mu\text{g}$  rec-hPRL);

Coluna 5: Fração eluída com 100 mM de imidazol (3,74  $\mu\text{g}$  rec-hPRL);

Coluna 6: Fração eluída com 200 mM de imidazol (2,40  $\mu\text{g}$  rec-hPRL);

Coluna 7: Fração eluída com 300 mM de imidazol (0,64  $\mu\text{g}$  rec-hPRL)

**Coluna 8:** hPRL hipofisária purificada (3,00  $\mu\text{g}$ )

**Colunas 9 a 15:** Amostras obtidas de bactérias transformadas com o p1813hPRL2

Coluna 9: Solução de renaturação de grânulos citoplasmáticos (1,85  $\mu\text{g}$  rec-hPRL);

Coluna 10: Solução de renaturação de grânulos citoplasmáticos após incubação com a resina (0,04  $\mu\text{g}$  rec-hPRL);

Coluna 11: Fração eluída com 40 mM de imidazol (0,03  $\mu\text{g}$  rec-hPRL);

Coluna 12: Fração eluída com 100 mM de imidazol (0,43  $\mu\text{g}$  rec-hPRL);

Coluna 13: Fração eluída com 200 mM de imidazol (2,69  $\mu\text{g}$  rec-hPRL);

Coluna 14: Fração eluída com 300 mM de imidazol (1,78  $\mu\text{g}$  rec-hPRL);

Coluna 15: Fração eluída com 400 mM de imidazol (0,50  $\mu\text{g}$  rec-hPRL).

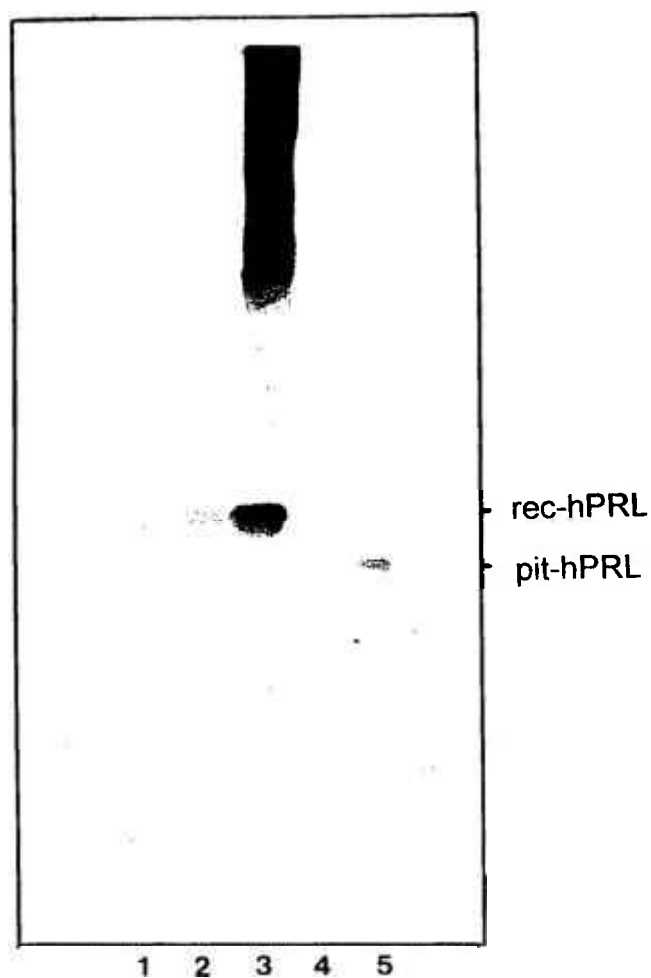
## **5. Análise da 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL**

### **5.1. Seqüenciamento do DNA**

A análise do gene de hPRL foi realizada por seqüenciamento dos seus nucleotídeos pelo método de Sanger (77) nos vetores construídos por nós: p $\beta$ 23hPRL e pESP4hPRL2, confirmando a seqüência de nucleotídeos já descrita por Cooke e cols. (12) para o gene da prolactina humana. No caso dos vetores plasmídicos p3SN8hPRL2 e p1813hPRL2, o seqüenciamento foi parcial, dos nucleotídeos 1 ao 256 (região incluída no fragmento Eco RV-Eco RI), sendo realizado após cada procedimento de mutagênese sítio específica e também confirmando a seqüência já descrita na literatura. No caso de utilização de procedimento de mutagênese sítio específica é importante a reconfirmação da seqüência correta pois em alguns casos são descritas mutações não desejadas devidas a erros introduzidos pela enzima fragmento de Klenow da T4 polimerase I. Levando em consideração que a região entre os sítios Eco RI a Hind III (nucleotídeos 257 a 797) do gene da hPRL utilizado no p3SN8hPRL2 e no p1813hPRL2 é a mesma utilizada no vetor pESP4hPRL2, já sequenciado e não submetida a novo procedimento de mutagênese sítio específica, consideramos correta a seqüência do gene da hPRL para todos os quatro vetores por nós construídos.

### **5.2. Análise imunológica**

A análise imunológica da rec-hPRL produzida em bactérias recombinantes foi realizada por radioimunoensaio (descrita também no item 6 - Resultados) e por Western blotting. A Figura 12 apresenta o resultado do Western blotting realizado com a rec-hPRL obtida das bactérias transformadas com o p3SN8hPRL2 e p1813hPRL2 nas quais foi realizado choque osmótico e renaturação de grânulos citoplasmáticos. Juntamente foi analisado um padrão de hPRL de origem hipofisária. Nas amostras obtidas através de choque osmótico, observamos banda única de 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL imunorreativa, enquanto naquelas amostras obtidas pela renaturação de grânulos citoplasmáticos, se observam também bandas imunorreativas com alto peso molecular. Estas bandas são, ao nosso ver, resultado de formação incorreta de pontes dissulfídicas intermoleculares de rec-hPRL ou de rec-hPRL com outras proteínas bacterianas, ou ainda, de desagregação incompleta de corpos de inclusão.



**Figura 12:** Western blotting das amostras de rec-hPRL após eletroforese em SDS-PAGE a 12% sem redução após transferência para filtro de nitrocelulose e revelação com anticorpo anti-hPRL e  $^{125}\text{I}$ -proteína A. **Coluna 1:** Choque osmótico obtido de bactérias transformadas com o p1813hPRL2 (275 ng de rec-hPRL dosado por RIE); **Coluna 2:** Choque osmótico obtido de bactérias transformadas com o p3SN8hPRL2 (418 ng de rec-hPRL); **Coluna 3:** Solução de renaturação de corpos citoplasmáticos obtidos de bactérias transformadas com o p1813hPRL2 (1651,0 ng de rec-hPRL); **Coluna 4:** Solução de renaturação de corpos citoplasmáticos obtida de bactérias transformadas com o p3SN8hPRL2 (32,5 ng de rec-hPRL); **Coluna 5:** hPRL purificada de origem hipofisária (1000 ng de pit-hPRL).

## **6. Uso da 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL no RIE**

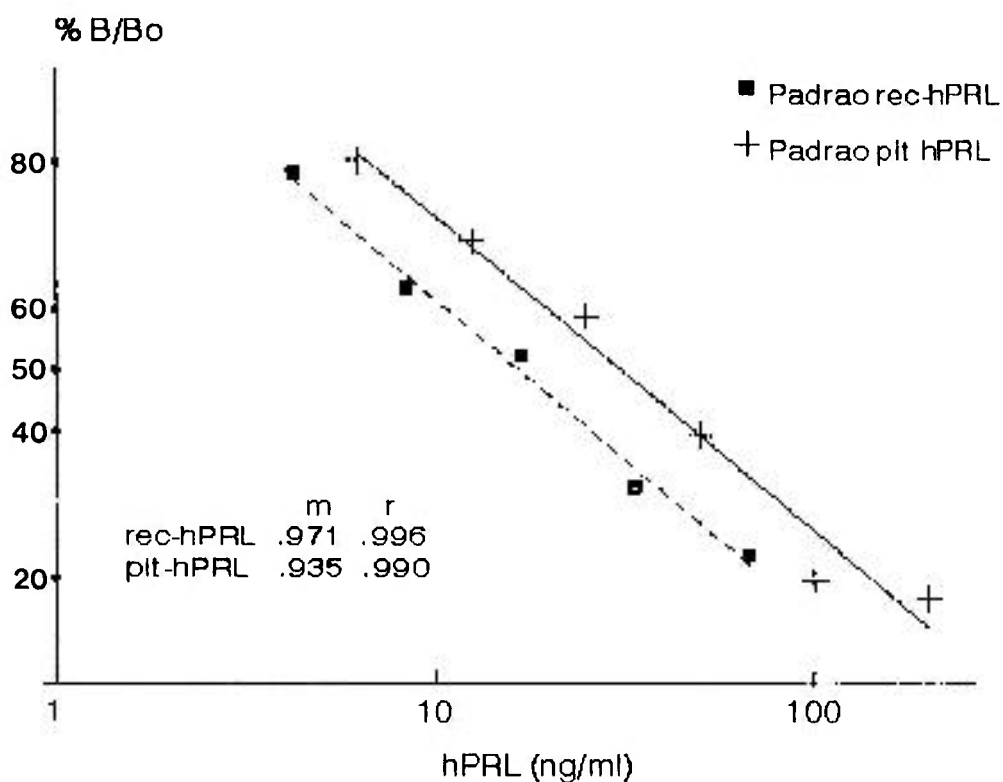
### **6.1. Marcação com $^{125}\text{I}$**

A 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL foi marcada com  $^{125}\text{I}$  fornecendo um traçador cuja radioatividade específica foi de  $5,6 \mu\text{Ci}$  ( $207,2 \text{ KBq}$ )/ $\mu\text{g}$ , enquanto a prolactina pituitária radioiodada apresentou um valor de  $14,0 \mu\text{Ci}$  ( $518,0 \text{ KBq}$ )/ $\mu\text{g}$ . Os coeficientes de distribuição molecular (Kd) foram de  $0,472 \pm 0,006$  ( $n = 6$ ) e de  $0,496$  respectivamente para o produto pituitário e recombinante. Isto indicaria um raio molecular menor para a  $^{125}\text{I}$ -Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL. Outras determinações deveriam porém ser realizadas para se obter um valor confiável de raio molecular.



## 6.2. Uso como padrão

Quando a hPRL de origem hipofisária foi usada juntamente com a 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL como padrão em um sistema de RIE utilizando-se como traçador a  $^{125}\text{I}$ -hPRL altamente purificada de origem hipofisária, as curvas (logito %B/B0 x log dose) apresentaram paralelismo significativo ( $p = 0,05$ ): as inclinações das curvas padrão foram de 0,935 para hPRL de origem hipofisária e de 0,971 para a 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL. As curvas obtidas são apresentadas na Figura 13.



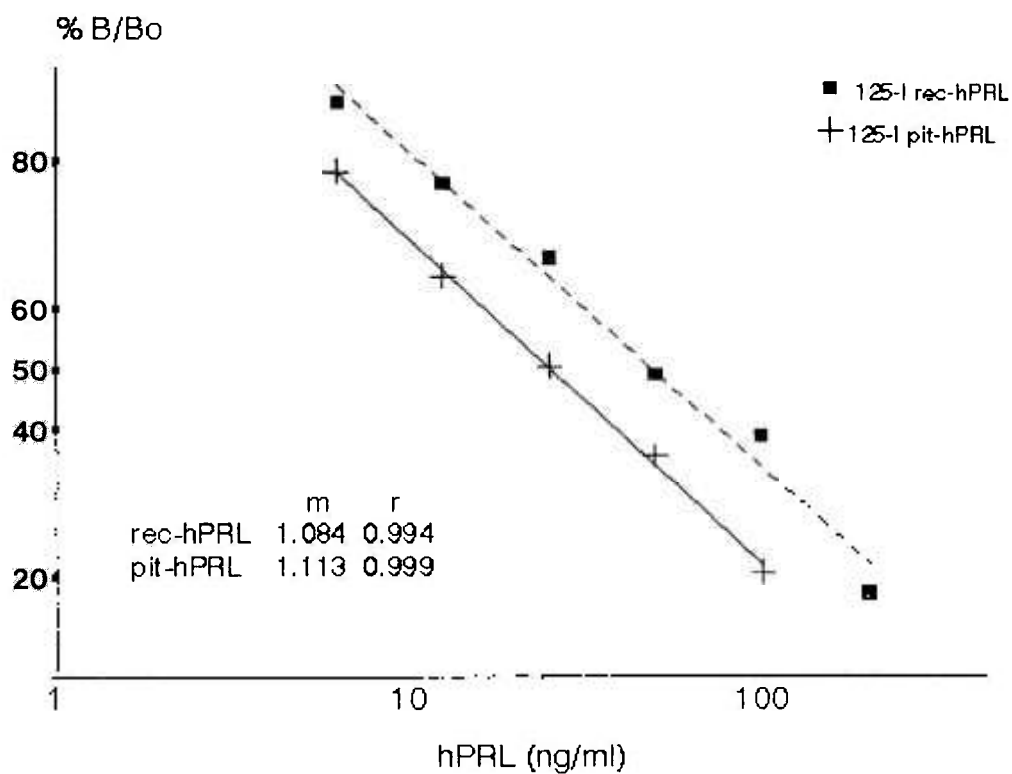
m = Inclinação da reta

r = coeficiente de correlação

**Figura 13:** Curvas padrão de pit-hPRL NIDDK e rec-hPRL dosadas com o traçador  $^{125}\text{I}$  pit hPRL.

### 6.3. Uso como traçador

Quando usamos  $^{125}\text{I}$ -6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL como traçador em comparação com  $^{125}\text{I}$  pit hPRL no mesmo sistema de RIE que utiliza pit hPRL como padrão, as inclinações obtidas foram de 1,113 para  $^{125}\text{I}$  pit hPRL e de 1,087 para a  $^{125}\text{I}$  6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL, sendo as curvas significativamente paralelas ( $p = 0,05$ ) (Figura 14).

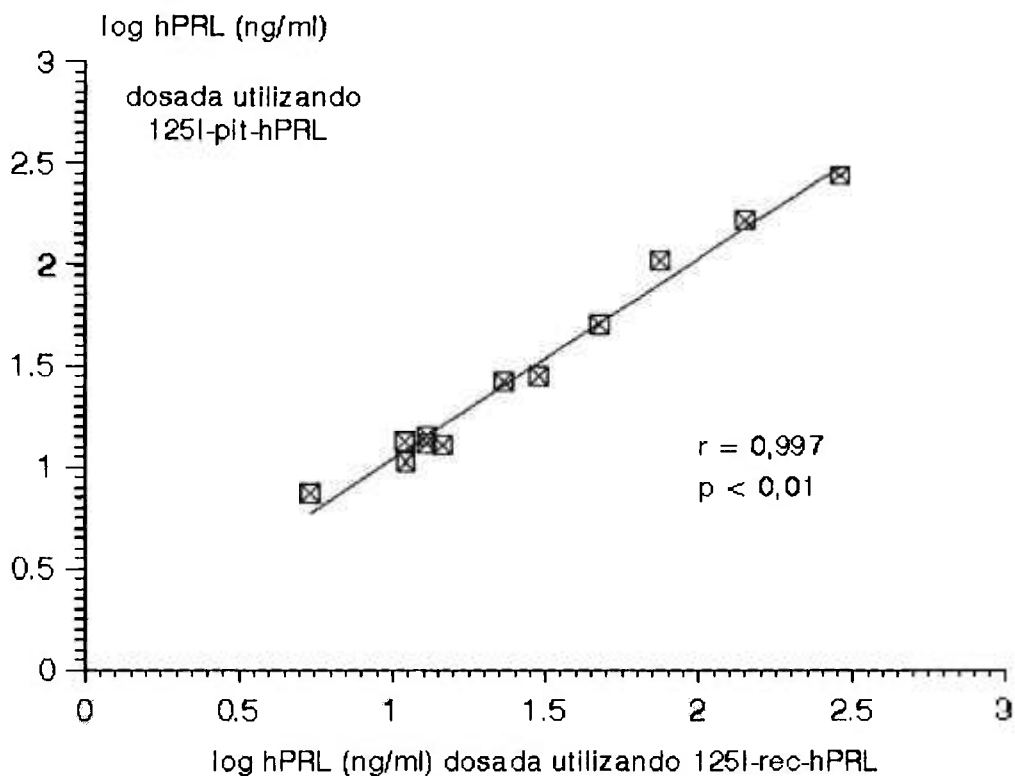


m = inclinação da reta

r = coeficiente de correlação

**Figura 14:** Curvas obtidas utilizando-se os traçadores  $^{125}\text{I}$  rec-hPRL e  $^{125}\text{I}$  pit hPRL e o padrão pit hPRL (NIDDK)

A análise de regressão linear realizada dosando hPRL em amostras desconhecidas, utilizando-se em comparação os dois diferentes traçadores, apresentou os seguintes parâmetros: inclinação da reta = 0,993, o que indica ausência de "bias"; coeficiente de correlação = 0,997, sendo a correlação entre os valores obtidos com os dois traçadores altamente significativa ( $p < 0,01$ ) (Figura 15).



**Figura 15:** Comparação entre valores de hPRL obtidos com os traçadores  $^{125}\text{I}$  rec-hPRL e  $^{125}\text{I}$  pit hPRL

Isto indica que o produto recombinante obtido poderia, obviamente dependendo de mais testes posteriores, ser usado não somente como preparação padrão para imunoenaios em geral, mas também como reagente para marcação com  $^{125}\text{I}$  a ser utilizado em radioensaio.

## 7. Digestão por protease específica fator Xa.

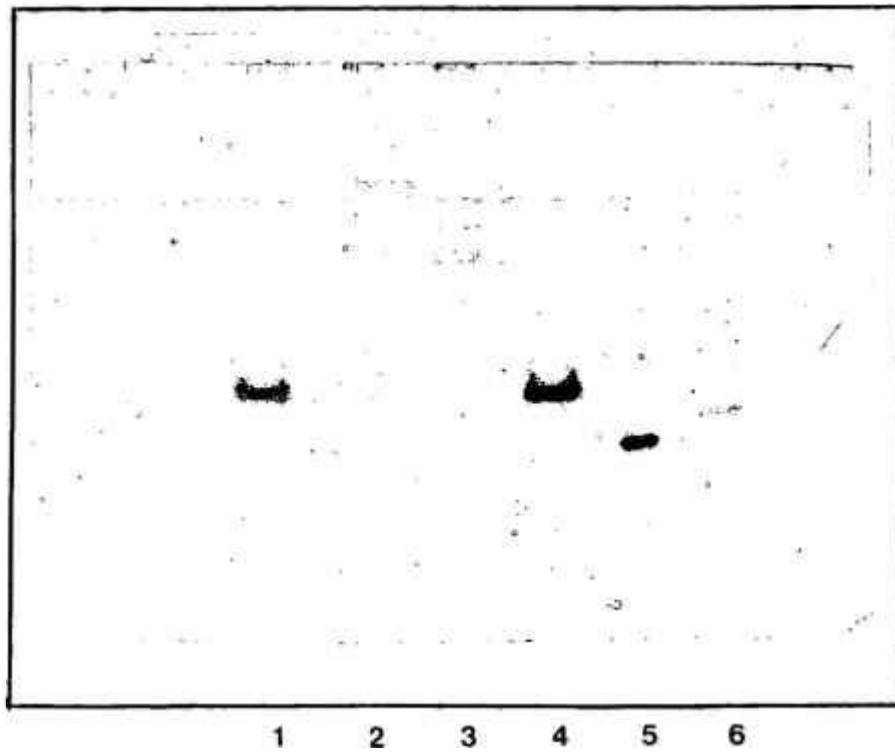
A enzima fator X ativada foi utilizada para digestão de proteínas recombinantes produzidas em bactérias com os dois vetores p1813hPRL2 e p3SN8hPRL2 e purificadas.

Foram realizados experimentos em tampão Tris HCl 50 mM, pH 8,0 com  $\text{CaCl}_2$  1 mM, NaCl 100 mM, com uma relação ponderal de substrato : enzima (da firma New England Biolabs) de 10:1; 20:1, tempo de reação de 12, 24 e 48 horas e temperaturas de 0, 23, 30 e 37°C, não obtendo-se nenhum resultado indicativo de clivagem nas proteínas de fusão.

Digestões análogas foram realizadas com as mesmas rec-hPRL após denaturação por hidrocloreto de guanidina 6M, seguida de diálise no mesmo tampão acima citado, também não obtendo-se nenhum resultado positivo.

A análise foi realizada, juntamente com hPRL de origem hipofisária, por SDS - PAGE a 12% e Western blotting utilizando-se antissoro anti-hPRL ou então corando-se o gel por "Coomassie Brilliant Blue G".

Somente utilizando o fator Xa da firma Boehringer, com uma relação ponderal substrato : enzima de 3,33:1 e temperatura ambiente por 24 horas, conseguimos uma digestão da nossa proteína de fusão (6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL) de aproximadamente 50% (Figura 16).



**Figura 16:** SDS-PAGE a 12%, sem redutor, de amostras de rec-hPRL obtidas de bactérias transformadas com o p3SN8hPRL2 e digeridas com fator Xa da Boehringer.

Coluna 1: rec-hPRL (10,0  $\mu$ g) digerida com 0,5  $\mu$ g de Xa;

Coluna 2: rec-hPRL (10,0  $\mu$ g) digerida com 1,5  $\mu$ g de Xa;

Coluna 3: rec-hPRL (10,0  $\mu$ g) digerida com 3,0  $\mu$ g de Xa

Coluna 4: rec-hPRL (10,0  $\mu$ g);

Coluna 5: hormônio de crescimento humano hipofisário purificado (4,0  $\mu$ g);

Coluna 6: hPRL hipofisária purificada (2,0  $\mu$ g).

## DISCUSSÃO

Foi obtida prolactina humana recombinante, em sua forma autêntica, em *E. coli*. Pelo que é de nosso conhecimento ainda não foi descrita na literatura a obtenção deste hormônio em bactérias. Como já mencionado anteriormente, a secreção periplásmica é particularmente interessante, sendo que oferece o ambiente mais favorável á correta formação de estrutura terciária e das pontes dissulfídicas intramoleculares. Em uma recentíssima apresentação na 75<sup>o</sup> Reunião da Sociedade Americana de Endocrinologia, realizada em Las Vegas, de 9 a 12 de junho de 1993 (74), foi descrita a obtenção e caracterização de hPRL em células de mamífero pela firma Genzyme (Framingham, MA, EUA), dados porém que não foram publicados.

O nosso produto foi obtido após inúmeras dificuldades encontradas para a digestão da proteína de fusão 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL, possivelmente devidas a impedimento estérico: de fato, a digestão da nossa proteína de fusão ainda está em fase de estudo para sua otimização. Dificuldades análogas foram encontradas também por Hiraoka e cols. (30) que prepararam uma proteína de fusão de três componentes: proteína A, um peptídeo com dois sítios específicos para colagenase e hPRL. Quando esta proteína de fusão purificada foi submetida a digestão com colagenase, somente um dos sítios foi clivado, exatamente aquele mais distante (4 aminoácidos) da Leucina amino-terminal da hPRL, tendo os autores postulado a hipótese de que o outro sítio não foi digerido por impedimento estérico.

A análise e comparação que podemos realizar entre as quatro diferentes construções é também extremamente interessante. Lembramos que uma delas, o vetor p $\beta$ 23-hPRL, utiliza uma sequência guia incompleta da PRL humana; o p3SN8hPRL2 utiliza a sequência guia de uma celulase bacteriana e os vetores p1813hPRL-2 e pESP4hPRL2 não utilizaram sequência guia, seus produtos estando portanto destinados ao citoplasma. Estas duas últimas construções porém tem uma diferença fundamental: enquanto o p1813hPRL2 deveria levar á obtenção de Met-Ala-Thr-Ser-6His-Ile-glu-Gly-Arg-hPRL, o pESP4hPRL2 deveria levar simplesmente á Met-hPRL.

Considerando que, somente p3SN8hPRL2 e p1813hPRL2 levam a uma produção significativa de imunoreatividade prolactínica, seria muito fácil afirmar que somente as formas que apresentam pelo menos um decapeptídeo N-terminal são estáveis, seja no citoplasma como no periplasma. Assim a mesma razão que

dificulta a digestão pelo fator Xa para obtenção de prolactina autêntica, seria também a razão positiva neste caso, que nos permitiu extrair das bactérias uma forma íntegra de prolactina humana, fato raramente descrito na literatura.

Esta hipótese parece porém um pouco simplória e deveria ser demonstrada mediante outros estudos e comparações. Contra sua validade depõe por exemplo o fato que met-PRL bovina foi obtida em boa quantidade no citoplasma por Luck e cols. (52), usando o vetor pESP4 e que hGH, uma molécula que apresenta 26% de homologia com hPRL é facilmente obtida no espaço periplásmico em sua forma madura mediante construções extremamente variadas. A maior labilidade da molécula de hPRL em comparação com o hGH é bastante conhecida; ao mesmo tempo é difícil acreditar que a simples adição de um decaptídeo confira grande resistência proteolítica a toda uma estrutura de 199 aminoácidos.

Embora não tenha sido completamente esclarecido, parece que mudanças mínimas das regiões 5' terminais de genes naturais ou clonados em *E. coli* possuem efeitos pronunciados na eficiência de tradução, possivelmente devido à estrutura secundária do mRNA nas imediações da sequência Shine-Dalgarno (SD), codon de iniciação (ATG) e codons amino-terminais. Esta hipótese seria adequada para explicar a ausência ou baixa produção de hPRL em vetores que já foram utilizados na expressão de outras proteínas (52) se apresentando bastante eficientes. No caso do vetor pESP4 já utilizado para expressão de bPRL (prolactina bovina) em *E. coli* os autores trocaram 5 dos 7 primeiros codons do cDNA de bPRL, juntamente com a realização de alterações na região SD-ATG, deste modo elevando de 70 a 100 vezes a expressão da proteína recombinante em relação ao vetor sem modificações (pEBP3).

No caso dos vetores p1813hPRL2 e p3SN8hPRL2 em que a região SD-ATG-codons iniciais eram comprovadamente funcionais, a expressão das proteínas de fusão nas bactérias transformadas foi bastante eficiente ( $\sim 17 \mu\text{g/ml}/A_{600\text{nm}}$  correspondendo a  $\sim 5,5\%$  das proteínas bacterianas e  $\sim 0,5 \mu\text{g/ml}/A_{600\text{nm}}$ , correspondendo a  $\sim 1\%$  das proteínas periplasmáticas bacterianas, respectivamente)

Lembramos outrossim, como dado também positivo do presente trabalho, o alto rendimento em Met-Ala-Thr-Ser-6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL obtido com p1813hPRL2. É verdade que a obtenção de um produto insolúvel em formas de inclusão citoplasmática não leva diretamente à forma ideal do hormônio, mas o rendimento de expressão, que é aproximadamente 40 vezes maior quando comparado com a secreção periplásmica do mesmo produto, pode abrir um bom caminho produtivo. Seria suficiente aprimorar uma técnica apropriada de

dissolução e renaturação destes grânulos.

Meta fundamental do presente trabalho foi também a utilização de hPRL recombinante para a preparação de reagentes para o radioimunoensaio ou para imunoensaio em geral. Podemos afirmar que este objetivo foi alcançado, mesmo com a utilização de 6His-Ile-Glu-Arg-hPRL. Sua possibilidade de utilização como preparação padrão é confirmada pelo experimento apresentado na Figura 13 e, à luz das considerações anteriores, este composto deveria possuir uma estabilidade bem maior que as preparações utilizadas normalmente. Sua calibração definitiva deverá ser realizada através de um estudo intra-laboratorial contra o padrão internacional de hPRL da Organização Mundial de Saúde (3º Padrão Internacional WHO - 84/500 de 1988).

Também sua aptidão à radioiodação foi estudada e confirmada através de marcação. Os resultados obtidos nos ofereceram a possibilidade de utilizar, desde já, uma fonte inesgotável e valiosíssima de um produto puro, "radioiodination grade": as preparações atualmente usadas para esta finalidade, todas importadas, apresentaram de fato um custo exorbitante. O estudo realizado e apresentado na fig. 15 confirma que a  $^{125}\text{I}$ -6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL funciona perfeitamente no radioimunoensaio para a determinação de prolactina em amostras desconhecidas. Isto deverá ser confirmado com outros estudos e através de uma melhor estatística, assim como deveremos investigar melhor a razão pela qual as duas curvas paralelas das Figuras 13 e 14 não são coincidentes. Não foi possível ainda realizar estudos análogos com a hPRL autêntica obtida após digestão com fator Xa da Boehringer, mas esta é obviamente uma das metas prioritárias para o futuro imediato.

Uma última aplicação ligada à preparação de reagentes para imunoensaios e "Western" blotting" é a utilização de 6His-Ile-Glu-Gly-Arg-hPRL para produção de anticorpos anti-hPRL em coelhos, atualmente já em andamento no laboratório. Estas são também aplicações do produto recombinante de grande interesse (69), pois anticorpos policlonais anti-hPRL são de difícil obtenção, apresentam dificilmente altos títulos e constante de afinidade e, conseqüentemente, possuem também um custo exorbitante. Parece de fato confirmado (Dr. A. Bulatov, comunicação pessoal) que sua obtenção, difícil em geral, é mais difícil ainda em coelhos que em cobaias onde há obviamente a limitação apresentada pela baixa quantidade de soro aproveitável. Todas estas considerações nos levaram a pensar que talvez as dificuldades na obtenção de antissoro anti-hPRL sejam devidas especialmente à instabilidade e baixa resistência proteolítica da prolactina humana, logo após sua injeção no animal. Neste caso a utilização da nossa



molécula mais estável, poderia apresentar uma certa vantagem.

A seleção da genoteca para o cDNA de hPRL foi realizada mediante técnicas convencionais e proporcionou um resultado positivo dentro de um tempo relativamente breve, mesmo tendo-se repetido o processo de hibridização com as duas sondas por um total de seis vezes. Quando foi subclonado o cDNA "full length" de hPRL em vetor plasmídico, surgiu um problema não considerado anteriormente: a existência de um sítio de restrição Eco RI no interior do cDNA que, sendo necessário utilizar a mesma enzima para separar o vetor viral, levaria necessariamente à fragmentação do nosso gene em dois segmentos de 250 e 650 pb. Um problema análogo, surgido na construção de um dos vetores de expressão para hGH quando por digestão com Hind III, foi resolvido na época mediante ligação tríplice, uma reação altamente improvável e de êxito difícil. Desta vez a ligação tríplice foi também tentada, porém sem êxito. A única reação que levou a um resultado positivo foi uma digestão parcial com Eco RI com tempo de incubação extremamente diminuído: 10 minutos ao invés de uma hora. Consideramos a padronização destas condições de digestão parcial também um resultado positivo e original deste trabalho e que já foi utilizado em outras oportunidades. Se trata de fato de uma alternativa simples e econômica para a solução de um problema que, de outra forma, acarretaria um longo trabalho alternativo.

O desenvolvimento do presente trabalho também necessitou da introdução de uma técnica moderna, já estabelecida, utilizada, porém pela primeira vez em nossos trabalhos: a mutagênese sítio-específica. Tivemos a oportunidade de aprendê-la no laboratório do grupo canadense que já em 1985 padronizou essa técnica de tão ampla e útil aplicação em trabalho de DNA recombinante. Os resultados obtidos nas três oportunidades em que tivemos que utilizá-la foram amplamente positivos, sua aplicação rápida e prática e o sequenciamento realizado na nova fita "mutada" de DNA confirmou praticamente a ausência de erros devidos à ação da DNA polimerase.

Durante o trabalho de construção dos vetores p3SN8hPRL2 e p1813hPRL2, quando foi aplicada a mutagênese sítio-específica para retirar os 39 pb, parte da sequência guia do hPRL, enfrentamos outro problema: os vetores baseados em p3SN8 e p1813, por alguma razão não produziam a fita simples necessária. Houve aqui também a realização de uma construção alternativa que levou, através de duas etapas adicionais, à utilização do vetor pBluescript KS+ nas mesmas cepas RZ1032 e CJ236 e que se demonstrou eficaz para este propósito.

em relação às técnicas tradicionais de purificação de hPRL a partir de hipófises (33,36), técnicas estas bastante trabalhosas e nas quais geralmente se obtém baixos rendimentos de hormônio puro. Poucas técnicas de purificação podem alcançar 90% de pureza numa única etapa, como foi claramente confirmado pelos resultados obtidos com SDS-PAGE (Figura 11) e com a técnica ainda mais sensível de Western Blot (Figura 12).

Em conclusão podemos afirmar que foi obtida pela primeira vez prolactina humana recombinante autêntica no espaço periplásmico bacteriano. A proteína de fusão com um extra decapeptídeo na porção N-terminal já se mostrou perfeitamente utilizável na preparação de reagentes para imunoensaio: traçador, antígeno padrão e, possivelmente, anticorpos.

Talvez algumas das maiores utilidades deste trabalho estejam relacionadas com o aprimoramento de um grande número de técnicas e com o desenvolvimento de idéias que já foram e serão extremamente úteis também na preparação de outras proteínas recombinantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

1. BARTOLINI, P.; DIAS, L.M.F.; MURATA, Y. Produção de hormônio de crescimento humano por técnicas de DNA-recombinante. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. Univ. São Paulo*, **45**:241-3, 1990.
2. BARTOLINI, P.; MORGANTI, L.E.; MURATA, Y.; RIBELA, M.T.C.P.; SCHWARZ, I.; BELLINI, M.H. ; SOARES, C.R.J. Utilization of DNA recombinant techniques for the preparation of radioimmunoassay reagents for pituitary hormones. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY ed. "Developments in Radioimmunoassay and Related Procedures" IAEA, Viena, 1992. p.197-204.
3. BAYAT-SAMARDI, M. & HOUEBINE, L.M. Effect of various protein kinase inhibitors on the induction of milk protein gene expression by prolactin. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **92**:127-34, 1993.
4. BENEVISTE, R.; HELMAN, J.D.; ORTH, D.N.; McKENNA, T.J.; NICHOLSON, W.E.; RABINOWITZ, D. Circulation of big human prolactin: conversion to small human prolactin by reduction of disulphide bridges. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **48**:883-6, 1979.

---

### \*DE ACÔRDO COM

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas : NB-66. In.— Normas ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro, 1978. p13-20  
SERIAL sources for BIOSIS data base. Philadelphia, BIOSIS, 1990

5. BERNARD, H.U. & HELINSKI, D.R. Use of the  $\lambda$  phage promoter  $P_L$  to promote gene expression in hybrid plasmid cloning vehicles. *Methods Enzymol.*, **68**:482-92, 1979.
6. BOER, H.A., COMSTOCK, L.J.; VASSER, M. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Biochemistry*, **80**:21-5, 1983.
7. BRUE, T.; CARUSO, E.; MORANGE, I.; HOFFMANN, T.; EVRIN, M.; GUNZ, G.; BENKIRANE, N.; JAQUET, P. Immunoradiometric analysis of circulating human glycosylated and nonglycosylated prolactin forms: spontaneous and stimulated secretions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **75**:1338-44, 1992.
8. BURNETTE, W.N. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal. Biochem.*, **112**:195-203, 1981.
9. CLEVINGER, C.V.; RUSSEL, D.H.; APPASAMY, P.M.; PRYSTOWSKY, M.B. Regulation of interleukin 2-driven T-lymphocyte proliferation by prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**:6460-4, 1990.

10. COHEN, S.N.; CHANG, A.C.Y.; HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**:2110-4, 1972.
  
11. COLE, E.S.; NICHOLS, E.H.; LAUZIÈRE, K.; EDMUNDS, T.; McPHERSON, J.M. Characterization of the microheterogeneity of recombinant primate prolactin: Implications for posttranslational modifications of the hormone in vivo. *Endocrinology*, **129**:2639-46, 1991.
  
12. COOKE, N.E.; COIT, D.; SHINE, J.; BAXTER, J.D.; MARTIAL, J.A. Human Prolactin - cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J. Biol. Chem.*, **256**:4007-16, 1981.
  
13. COOKE, N.E.; COIT, D.; WEINER, R. I.; BAXTER, J.D.; MARTIAL, J.A. Structure of cloned DNA complementary to rat Prolactin messenger RNA. *J Biol Chem.*, **255**:6502-10, 1980.
  
14. CROWL, R.; SEAMANS, C.; LOMEDICO, P.; McANDREW, S. Versatile expression vectors for high-level synthesis of cloned gene products in Escherichia coli. *Gene*, **38**:31-8, 1985.

15. DALBOGE, H.; CARLSEN, S.; JENSEN, E.B.; CHRISTENSEN, T; DAHL, H.-H.M. Expression of recombinant growth hormone in Escherichia coli: effect of the region between the Shine-Dalgarno sequence and the ATG-initiation codon. *DNA*, 7:399-405, 1988.
  
16. DAY, R.N. & MAURER, R.A. The distal enhancer region of the rat prolactin gene contains elements conferring response to multiple hormones. *Mol. Endocrinol.*, 3:3-9, 1989.
  
17. DENTE, L.; CESARENI, G.; CORTESE, R. pEMBL: A new family of single stranded plasmids. *Nucleic Acids Res.*, 11:1645-55, 1983.
  
18. FARKOUH, N.H.; PACKER, M.G.; FRANTZ, A.G. Large molecular size prolactin with reduced receptor activity in human serum: high proportion in basal state and reduction after thyrotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48:1026-32, 1979.
  
19. FERREIRA DIAS, L.E.M. *Miniextração e purificação da prolactina humana para preparação de reagentes usados em radioimunoensaio*. São Paulo, 1989. 107p (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

20. FONSECA, M.E.; OCHOA, R.; MORÁN, C.; ZÁRATE, A. Variations in the molecular forms of prolactin during the menstrual cycle, pregnancy and lactation. *J. Endocrinol. Invest.*, **144**:907-12, 1991.
21. FRIESEN, H. & HWANG, P. Human prolactin. *Annu. Rev. Med.*, **24**:251-70, 1973.
22. GARNIER, P.E.; AUBERT, M.L.; KAPLAN, S.L.; GRUMBACH, M.M. Heterogeneity of pituitary and plasma prolactin in man: Decreased affinity of "big" prolactin in a radioreceptor assay and evidence for its secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **47**:1273-81, 1978.
23. GILBERT, M.S.; LOWRY, P.J.; CASTRO, M.G.; WOODS, R.J.; SAVVA, D. Expression and partial purification of human prolactin in E.coli. *Int. J. Biochem.*, **23**:107-14, 1991.
24. GOEDEL, D.V.; HEYNEKER, H.L.; HOZUMI, T.; ARENTZEN, R.; ITAKURA, K.; YANSURA, D.G.; ROSS, M.J.; MIOZZARI, G.; CREA, R.; SEEBURG, P.H. Direct expression in E.coli of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*, **281**:544-8, 1979.

25. GOUT, P.W.; BEER, C.T.; NOBLE, R.L. Prolactin stimulated growth of cell cultures established from malignant Nb rat lymphomas. *Cancer. Res.*, **40**:2433-6, 1980.
26. GRAY, G.L.; BALDRIDGE, J.S.; McKEOWN, K.S.; HEYNEKER, H.L.; CHANG, C.N. Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in E. coli: natural and bacterial signal peptides are interchangeable. *Gene*, **39**:247-54, 1985.
27. GUYETTE, W.A.; MATUSIK, R.J.; ROSE, J.M. Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. *Cell*, **17**:1013-23, 1979.
28. HARO, L.S.; LEE, D.W.; SINGH, R.N.P.; BEE, G.; MARKOFF, E.; LEWIS, U.J. Glycosylated human prolactin: alterations in glycosylation pattern modify affinity for lactogen receptor and values in prolactin radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **17**:379-83, 1990.
29. HASHIM, J.A.; ASTON, R.; BUTLER, J.; McGREGOR, A.M.; SMITH, C. R.; NORMAN, M. The proportion of glycosylated prolactin in serum is decreased in hyperprolactinemic states. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **71**:111-5, 1990.



30. HIRAOKA, Y.; NOMATA, Y.; MATSUO, K.; TSUBOTA, N.; TANABE, K.; FUKASAWA, T. Efficient production of biologically active human prolactin in *E.coli* *Mol. Cell. Endocrinol.*, **81**:147-54, 1991.
31. HOCHULI, E.; DÖBELL, H.; SCHACHER, A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr.*, **411**:177-84, 1987.
32. HOCHULI, E.; BANNWARTH, W.; DOBELI, H.; GENTZ, R. STUBER, D. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Biotechnology*, **6**:1321-5, 1988.
33. HODGKINSON, S.C. & LOWRY, P.J. Hydrophobic interaction chromatography and anion exchange chromatography in the presence of acetonitrile *Biochem. J.*, **199**:619-27, 1981.
34. HOHN, B. In vitro packaging of lambda and cosmid DNA. *Methods Enzymol.*, **68**:299-308, 1980.
35. HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, **194**:495-6, 1962.

36. HWANG, P; GUYDA, H.; FRIESEN, H. Purification of human prolactin. *Methods Enzymol.*, **37**:389-402, 1975.
37. JANKNECHT, R.; MARTYNOFF, G.; LOU, J.; HIPSKIND, R.A.; NORDHEIM, A.; STUNNENBERG, H.G. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**:8972-6, 1991.
38. JOSHI, L.; SZKUDLINSKI, M.W.; THOTAKURA, N.R.; MURATA, Y. A TSH-HCG-BETA carboxy terminus extension peptide (CTEP) chimera is fully biologically active and prolongs the plasma half-life of TSH. In: ANNUAL MEETING OF THE ENDOCRINE SOCIETY, 75, Las Vegas, USA., 1993. *Proceedings*. p.82.
39. JURCOVICOVÁ, J.; DAY, R.N.; MACLEOD, R.M. Expression of prolactin in rat lymphocytes. *Prog. NeuroEndocrinImmunol.*, **5**:256-63, 1992.
40. KOSHLAND, D. & BOTSTEIN D. Secretion of  $\beta$ -lactamase requires the carboxi end of the protein. *Cell.*, **20**:749-60, 1980.
41. KUNKEL, T.A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**:488-92, 1985.

42. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, **227**: 680-5, 1970.
43. LATHE, R.; KIENY, M.P.; SKORY, S.; LECOCQ, J.P. Linker tailing: unphosphorylated linker oligonucleotides for joining DNA termini. *DNA*, **3**:173-82, 1984.
44. LEE, D.W. & MARKOFF, E. Synthesis and release of glycosylated prolactin by human decidua in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **62**:990-4, 1986.
45. LEITE, V.; COSBY, H.; SOBRINHOO, L.G., FRESNOZA, A. ; SANTOS, M.A.; FRIESEN, H.G. Characterization of big big prolactin in patients with hiperprolactinemia. *Clin. Endocrinol.*, **37**:365-72, 1992.
46. LEONARD, M.P. Hyperprolactinemia and impotence: why, when and how to investigate. *J. Urol.*, **142**:992-4, 1989.
47. LEWIN, B. A panoply of operons: the lactose paradigm and others In: GENES IV, Cambridge, USA, Cell Press., 1990 p.240-63.
48. LEWIS, U. J.; SINGH, R.N.P.; SINHA, Y.N.; VANDERLAAN, W.P. Glycosyled human prolactin. *Endocrinology*, **116**:359-63, 1985.

49. LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; LEWIS, L.J.; SEAVEY, B.K.; SINHA, Y.N. Glycosylated ovine prolactin. *Biochemistry*, **81**:385-9, 1984.
50. LITTLE, J.W. & MOUNT, D.W. The SOS regulatory system of Escherichia coli. *Cell*, **29**:11-22., 1982.
51. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-75, 1951.
52. LUCK, D.N.; NGSEE, J.K.; ROTTMAN, F.M.; SMITH, M. Synthesis of bovine prolactin in E. coli. *DNA*, **5**:21-8, 1986.
53. LUCK, D.N.; GOUT, P.W.; SUTHERLAND, E.R.; FOX, K.; HUYER, M.; SMITH, M. Analysis of disulphide bridge function in recombinant bovine prolactin using site-specific mutagenesis and renaturation under mild alkaline conditions: a crucial role for the central disulphide bridge in the mitogenic activity of the hormone. *Protein. Eng.*, **5**:559-67, 1992.
54. LUCK, D.N.; GOUT, P.W.; BEER, C.T.; SMITH, M. Bioactive recombinant methionyl bovine prolactin: Structure-function studies using site specific mutagenesis. *Mol. Endocrinol.*, **3**:822-31, 1989.

55. LUCK, D.N.; GOUT, P.W.; KELSAY, K.; ATKINSON, T.; BEER, C.T.; SMITH, M. Recombinant methionyl bovine prolactin: Loss of bioactivity after single amino acid deletions from putative helical regions. *Mol. Endocrinol.*, 4:1011-6, 1990.
56. LUCK, D.N.; HUYER, M.; GOUT, P.W.; BEER, C.T.; SMITH, M. Single amino acid substitutions in recombinant bovine prolactin that markedly reduce its mitogenic activity in Nb2 cell cultures. *Mol. Endocrinol.*, 5:1880-6, 1991.
57. MANIATIS, T; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. *Molecular cloning-A laboratory manual* 2nd. ed. New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; p.1.90-1.104, B-15.
58. MARKOFF, E.; LEE, D.W.; HOLLINGSWORTH, D.R. Glycosylated and nonglycosylated prolactin in serum during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67:519-23, 1988.
59. MARKOFF, E. ; SIGEL, M.B.; LACOUR, M.; SEAVEY, B.K.; FRIESEN, H.G.; LEWIS, U.J. Glycosylation selectively alters the biological activity of prolactin. *Endocrinology*, 123:1303-6, 1988.
60. MARSTON, F. A. O. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in E.coli. *Biochem J.*, 240:1-12, 1986.

61. MEURIS, S.; SVOBODA, M.; CHRISTOFLE, J.; ROBYN, C. Cleaving of disulfide bridges and apparent molecular weight of human prolactin variants as revealed by immunoperoxidase electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **143**:163-9, 1984.
62. MOLTICH, M.G. Pregnancy and the hyperprolactinemic woman. *N. Engl. J. Med.*, **312**:1364-70, 1985.
63. MOTT, J.E.; GRANT, R.A. HO, Y.; PLATT, T. Maximising gene expression from plasmid vectors containing the  $\lambda p_L$  promoter: Strategies for overproducing  $\rho$  transcription termination factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**:88-92, 1985.
64. NAGAI, Y. & THOGERSEN, H.C. Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, **153**:461-81, 1987.
65. O'NEAL, K.D.; SCHWARZ, L.A.; YU-LEE, L. Prolactin receptor gene expression in lymphoid cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **82**:127-35, 1991.
66. O'NEILL, G.; GOH, S.H.; WARREN, R.A.J.; KILBURN, D.G.; MILLER, R.C. Structure of the gene encoding the exoglucanase of *Cellulomonas fimi*. *Gene.*, **44**:325-30, 1986.

67. OKAYAMA, H. & BERG, P. High efficiency cloning of full length cDNA. *Mol. Cell. Biol.*, **2**:161-70, 1982.
68. OWERBACH, D.; RUTTER, W.J.; COOKE, N.E.; MARTIAL, J.A.; SHOWS, T.B. The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science*, **212**:815-6, 1981.
69. PARIS, N.; ROBERT, R.; MERCIER, L. Monoclonal antibodies against methionyl recombinant human prolactin. *Hybridoma*, **12**:107-13, 1993
70. PARIS, N.; RENTIER-DELRUE, F.; DEFONTAINE, A.; GOFFIN, V.; LEBRUN, J.J.; MERCIER, L.; MARTIAL, J.A. Bacterial production and purification of recombinant human prolactin. *Biotechnol Appl Biochem.*, **12**:436-49, 1990.
71. PEERS, B.; VOZ, M.L.; MONGET, P.; MATHY-HARTERT, M.; BERWAER, M.; BELAYEW, A.; MARTIAL, J.A. Regulatory elements controlling pituitary specific expression of the human prolactin gene. *Mol. Cell. Biol.*, **10**:4690-700, 1990.
72. PELLEGRINI, I.; LEBRUN, J.J.; ALI, S.; KELLY, P. Expression of prolactin and its receptor in human lymphoid cells. *Mol. Endocrinol.*, **6**:1023-31, 1992.

73. PELLEGRINI, I.; GUNZ, G.; RONIN, C.; FENOUILLET, E.; PEYRAT, J-T.; DELORI, P.; JAQUET, P. Polymorfism of prolactin secreted in human prolactinoma cells: Immunological, receptor binding and biological properties of the glycosylated and nonglycosylated forms. *Endocrinology*, **122**:2667-74, 1988.
74. PRICE, A.E.; LOGVINENKO, K.B.; McTEAGUE, J.M.; RICHARDS, S.M. Structural and functional characterization of recombinant human prolactin produced in mammalian cell culture. In: ANNUAL MEETING OF THE ENDOCRINE SOCIETY, 75, Las Vegas, USA., 1993. *Proceedings*. p.160.
75. RIBELA, M.T.C.P.; MURATA, Y.; MORGANTI, L.; TONIOLO, D.; BARTOLINI, P. The use of recombinant human growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. *J. Immunol. Methods*, **159**:269-74, 1993.
76. ROSEN, J.M.; RODGERS, J.R.; COUCH, C.H.; BISBER, C.A.; DAVID-IOUYE, Y.; CAMPBELL, S.M.; YU-LEE, L.Y. Multihormonal regulation of milk protein gene expression. *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA.*, **478**:63-76, 1986.
77. SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSTON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**:5463-7, 1977.



78. SAWADOGO, M.; VAN DYKE, M.W. A rapid method for the purification of deprotected oligodeoxynucleotides. *Nucleic. Acids. Res.*, **19**:674, 1991.
78. SHINE, J. & DALGARNO, L. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature*, **254**:34-8, 1975.
79. SHINE, J. & DALGARNO, L. Determination of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature*, **254**:34-8, 1975.
80. SHOME, B. & PARLOW, A.F. Human pituitary prolactin (hPRL): The entire amino acid sequence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **45**:1112-5, 1977.
81. SINHA, Y.N.; GILLIGAN, T.A. ; LEE, D.W.; HOLLINGSWORTH, D.; MARKOFF, E. Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **60**:239-43, 1985.
82. SINHA, Y.N.; DePAOLO, L.V.; HARO, L.S.; SINGH, R.N.P.; JACOBSEN, B.P.; SCOTT, K.E.; LEWIS, U.J. Isolation and biochemical properties of four forms of glycosylated porcine prolactin. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **80**:203-13, 1991.

89. TOMICH, C.S.C.; OLSON, E.R.; OLSEN, M.K.; KAYTES, P.S.; ROCKENBACH, S.K.; HATZENBUHLER, N.T. Effect of nucleotide sequences directly downstream from the AUG on the expression of bovine somatotropin in E. coli. *Nucleic Acids Res.*, **17**:3179-97, 1989.
90. TRUONG, A.T.; DUEZ, C.; BELAYEW, A.; RENARD, A.; PICTET, R.; BELL, G.I.; MARTIAL, J.A. Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J.*, **3**:429-37, 1984.
91. VIZE, P.D. & WELLS, J.R.E. Spacer alterations which increase the expression of porcine growth hormone in E. coli. *FEBBS. Lett.*, **213**:155-8, 1987.
92. YOUNG, K.H.; BUHI, W.C.; HORSEMAN, N.; DAVIS, J.; KRAELING, R.; LINZER, D.; BAZER, F.W. Biological activities of glycosylated and nonglycosylated porcine prolactin. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **71**:155-62, 1990.

09 MAY 1994