



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO PERIPLÁSMICA DO GENE DO
hGH EM *Escherichia coli* UTILIZANDO O PROMOTOR λP_L**

FERNANDA IZILDA DE CARVALHO GOMIDE

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientador:
Dr. Carlos Roberto Jorge Soares

**São Paulo
2004**

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

**OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO PERIPLÁSMICA DO GENE DO
hGH EM *Escherichia coli* UTILIZANDO O PROMOTOR λP_L**

Fernanda Izilda de Carvalho Gomide



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

Orientador:

Dr. Carlos Roberto Jorge Soares

São Paulo

2004

Dedico este trabalho

Aos meus pais Gerson Gomide e Geralda Maria de Carvalho Gomide, pelo incentivo nos momentos mais difíceis.

A meu irmão Mauro Américo pelo apoio e incentivo.

A meu companheiro Thiago Camargo pela compreensão e carinho de todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Roberto Jorge Soares pela orientação, incentivo e carinho na realização deste trabalho.

Ao Dr. Paolo Bartolini pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo João Ezequiel de Oliveira pelo apoio e paciência nas diversas situações.

À Dr^a. Cibele Nunes Peroni e à Dr^a. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela pela colaboração.

À Dr^a. Kayo Okazaki pela valiosa contribuição.

Aos amigos Adriana, Cláudia, Janaína, Lucélia, Renan, Walter, Miriam, Neide, Fernanda, Patrick, Eric, Leonardo pela amizade em todos os momentos.

Ao amigo José Maria de Sousa pela colaboração e incentivo nos momentos mais difíceis.

A todos os funcionários do Centro de Biologia Molecular que colaboraram para a realização deste trabalho.

À Capes pelo apoio financeiro.

OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO PERIPLÁSMICA DO GENE DO hGH EM *Escherichia coli* UTILIZANDO O PROMOTOR λP_L

Fernanda Izilda de Carvalho Gomide

RESUMO

Neste trabalho foi investigada a influência de vários fatores sobre a expressão do hGH recombinante no espaço periplásmico da bactéria *Escherichia coli* cultivada em frascos de cultura. Os plasmídeos utilizados contêm um promotor ativado pelo aumento da temperatura, derivado do fago lambda P_L . Foram comparados quatro diferentes peptídeos sinalizadores: DsbA, npr2K5L, STII e o peptídeo sinalizador natural derivado do hGH, o mesmo utilizado por um vetor já existente no laboratório, denominado vetor de referência. Outros fatores, como composição do meio de cultura, condições de ativação e cepa da célula hospedeira também foram estudados.

A determinação do hGH foi realizada diretamente no produto obtido por choque osmótico, processo utilizado para a extração do hormônio produzido pelas bactérias. O método escolhido para análise foi a HPLC de fase reversa, que permite uma rápida e precisa avaliação da qualidade e quantidade do hGH secretado no espaço periplásmico.

O nível de hGH produzido aumentou 2,5 vezes em relação ao vetor de referência, atingindo um valor de $3,9 \pm 0,6 \mu\text{g/mL/A}_{600}$ ($n= 6$, coeficiente de variação = 16%).

O nível de expressão foi fortemente influenciado pelo peptídeo sinalizador e pelas condições de indução. Nossos resultados indicaram que a ativação por 6 horas a 40-42°C, iniciando com uma densidade óptica (A_{600}) de aproximadamente 1,5 para o meio LB, ou 3 para o meio mais rico 2x-HKSII, foram condições capazes de promover um nível de secreção máximo utilizando a seqüência sinalizadora DsbA e a cepa de *E. coli* W3110.

OPTIMIZATION OF *Escherichia coli* PERIPLASMIC hGH GENE EXPRESSION UTILIZING THE λP_L PROMOTER

Fernanda Izilda de Carvalho Gomide

ABSTRACT

The influence of different factors acting on *Escherichia coli* periplasmic expression of recombinant human growth hormone in shake flasks cultures has been investigated. Bacterial vectors containing the phage λP_L promoter, which is temperature activated, were utilized. Four different signal peptides were compared: DsbA, npr2K5L, STII and one derived from the natural hGH signal peptide, this last used as a reference. Other factors such as medium composition, optimized induction and expression conditions, and different bacterial strains were also studied.

The determination of hGH, carried out directly in osmotic shock fluids, was based on an isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography method, which allows direct, rapid evaluation of the quality and quantity of hGH being secreted in bacterial periplasmic space.

The level of hGH production increased 2.5-fold compared with the reference vector, reaching a level of $3.9 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}/A_{600}$ (n=6; coefficient of variation = 16%).

The expression level was affected by the signal peptide and by the induction conditions. Our results indicate that 6 h activation at 40-42°C, starting with an OD (A_{600}) of ~1,5 in the LB medium, or ~3 in a very rich medium 2x-HKSII, were conditions capable of providing the maximum secretion level for a vector utilizing the DsbA signal sequence and *E. coli* W3110.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 MATERIAIS	13
3.1.1 Equipamentos e acessórios	13
3.1.2 Cepas de <i>E. coli</i>	14
3.1.3 Reagentes e soluções	14
3.1.4 Sistemas e reagentes específicos	16
3.1.5 Material radioativo	17
3.1.6 Meios de cultura	17
3.1.7 Soluções	18
3.2 MÉTODOS	20
3.2.1 Construção dos vetores de expressão utilizando o promotor λP_L	20
3.2.1.1 Construção do cassete de expressão	20
3.2.1.2 Reações de PCR	21
3.2.1.3 Preparação das bactérias competentes	23
3.2.1.4 Construção dos vetores	24
3.2.1.5 Transformação e clonagem	29
3.2.2 Choque osmótico	29
3.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) ..	30
3.2.4 SDS-PAGE	31

3.2.5 Western Blotting (WB)	31
3.2.6 Determinação da eficiência de expressão	32
3.2.7 Padronização das condições de crescimento	32
3.2.7.1 Duração do período de ativação	33
3.2.7.2 Estágio de indução	33
3.2.7.3 Temperatura de ativação	33
3.2.7.4 Comparação entre diferentes meios	34
3.2.8 Estudo comparativo dos peptídeos sinalizadores	34
3.2.9 Estudo comparativo entre cepas de <i>E. coli</i>	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Duração do período de ativação	35
4.2 Estágio de indução	36
4.2.1 Início da indução	36
4.2.2 Indução em diferentes meios	36
4.2.3 Análise por SDS-PAGE e WB	36
4.2.4 Análise por SDS-PAGE e WB das frações coletadas no RP-HPLC	41
4.3 Temperatura de ativação	44
4.4 Comparação entre os meios de cultura LB e 2x-HKSII	45
4.5 Efeito do peptídeo sinalizador na expressão do hGH	45
4.6 Comparação da célula hospedeira	46
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia é um termo que tem sido utilizado para descrever o uso de organismos vivos na obtenção de produtos farmacêuticos, diagnósticos e para pesquisa, que em geral são classificados pelas autoridades normativas como produtos biológicos (Federici, 1994). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) substâncias biológicas são aquelas cuja inocuidade não pode ser adequadamente assegurada apenas por métodos físico-químicos. São derivadas de organismos vivos que geralmente têm estrutura molecular complexa e requerem procedimentos especiais de controle de qualidade, em virtude do processo de produção, da natureza biológica da matéria prima e da necessidade de métodos biológicos para caracterizar os lotes, garantindo sua pureza e potência (Jeffcoate, 1992).

O desenvolvimento das metodologias de DNA recombinante possibilitou que genes de um organismo sejam transferidos para outro, viabilizando a produção de macromoléculas em quantidades consideráveis e de forma bastante pura (Federici, 1994). O uso destes organismos tem sido explorado para a produção de proteínas de interesse terapêutico, tais como insulina, hormônio de crescimento, eritropoietina, citocinas e muitas outras (Federici, 1994, Thomas, 1995). Essas técnicas estão substituindo a extração e purificação de hormônios a partir, por exemplo, de hipófises humanas.

As primeiras observações experimentais sobre a função do lóbulo anterior da hipófise no crescimento humano datam de 1900, sendo demonstrado posteriormente que extratos hipofisários promoviam crescimento de animais. Hormônio de crescimento humano (hGH) e de macaco foram isolados e purificados por Li & Papkoff em 1956. Por meio de testes clínicos foi possível demonstrar seus efeitos anabólicos e sobre o crescimento (Li, 1957). Desde então foi clinicamente utilizado na terapia de substituição em crianças com deficiência de hGH a partir da extração de hipófises humanas (Roos *et al.*, 1963) até

aproximadamente 1985, lembrando que o hGH representa cerca de 10-15% do peso seco do lóbulo anterior da hipófise. Durante esse período o tratamento foi considerado eficaz e sem efeitos colaterais acentuados (Gesundheit & Alexander, 1995; Strobl & Thomas, 1994). Porém, além da dificuldade ético-legal para obtenção das glândulas de cadáveres, comprovou-se, posteriormente, o risco da contaminação por vírus ou príon. Como exemplo podemos citar a doença de Creutzfeld-Jakob, caracterizada por degeneração neurológica fatal (Brown *et al.*, 1985; Strobl & Thomas, 1994).

Por outro lado os avanços tecnológicos recentes, especialmente na área de Biologia Molecular, possibilitaram a produção de proteínas com potencial terapêutico através de técnicas de Engenharia Genética, com expressão do DNA em sistemas heterólogos. Nesse contexto, foi primeiramente considerado o hormônio de crescimento humano pela sua necessidade e importância terapêutica (Goedel *et al.*, 1979; Miozzari, 1981; Jones & O'Connor, 1982; Lupker *et al.*, 1983; Gray *et al.*, 1984; Ikehara *et al.*, 1984; Gray *et al.*, 1985; Fryklund *et al.*, 1986; Hsiung *et al.*, 1986; Kato *et al.*, 1987; Gellerfors *et al.*, 1989; Hsiung *et al.*, 1989; Jensen & Carlsen, 1990).

O hormônio de crescimento humano tem sido utilizado para tratamento de crianças com deficiência do hormônio de crescimento, resistência ao hGH, crianças pequenas para a idade gestacional (PIG), insuficiência renal crônica, síndrome de Turner, e de adultos com deficiência de hormônio de crescimento ou síndrome da imunodeficiência (AIDS) (Tritos & Mantzoros, 1998; Liberman & Cukiert, 2004). Também está sendo investigado seu uso em outras condições, como tratamento de fraturas ou displasias ósseas, queimadura de pele, crianças com baixa estatura idiopática, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Noonan, uso na corticoterapia crônica e em idosos sem deficiência de hGH (Shin *et al.*, 1998; Tritos & Mantzoros, 1998; Liberman & Cukiert, 2004).

O hGH é um polipeptídeo expresso nas células somatotrópicas da glândula hipofisária anterior com massa molecular de 22.125 Da, formado por uma cadeia simples composta por 191 aminoácidos. Contém quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfeto intramoleculares (Cis⁵³ - Cis¹⁶⁵ e Cis¹⁸² - Cis¹⁸⁹) com duas alças correspondentes, uma maior e outra menor (Li, 1982). A Figura 1 apresenta a estrutura da molécula de hGH, segundo Roswall e colaboradores (1996).

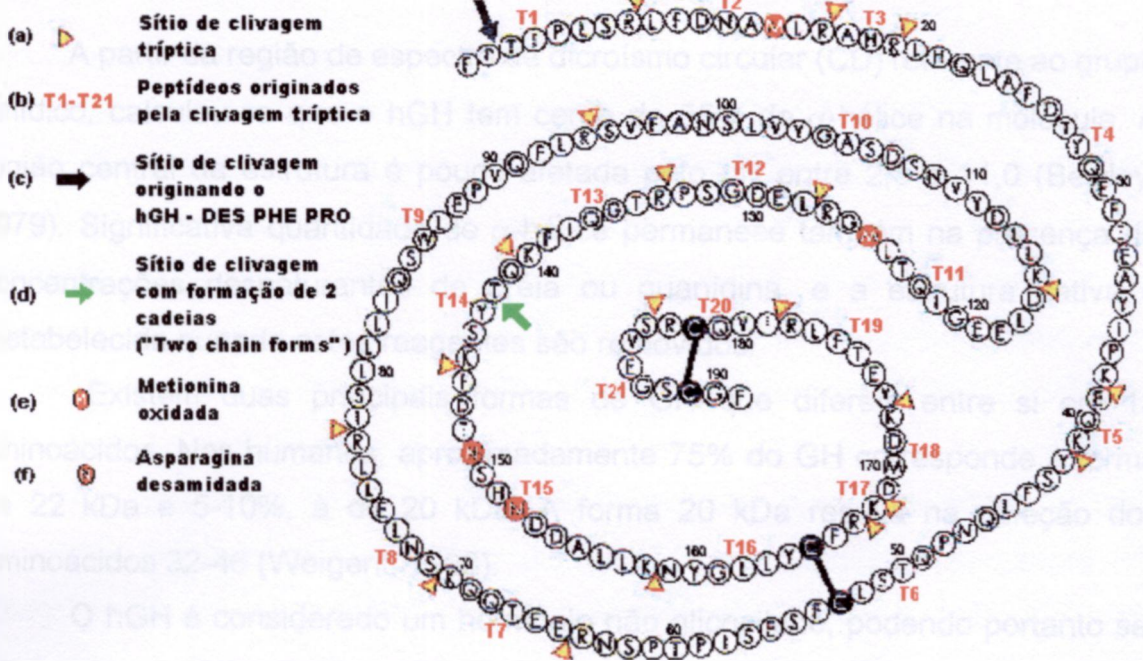


Figura 1. Estrutura primária da molécula de hormônio de crescimento humano segundo Roswall e colaboradores (1996). O diagrama também indica os sítios de clivagem tríptica (a) e os respectivos peptídeos formados (b); o sítio de clivagem responsável pela deleção dos dois aminoácidos da porção N-terminal (F e P), originando o hGH-DES PHE PRO (c); sítio de clivagem enzimática que separa o hGH em duas cadeias ("Two chain forms") (d); metioninas que são susceptíveis à oxidação (e); asparaginas que são susceptíveis à desamidação, originando as isoformas desamidadas do hGH (f).

O hGH contém uma proporção relativamente alta de resíduos não-polares e tem tendência a formar dímeros e agregados em solução aquosa (Fisher, 1964). Estruturalmente, o hGH é uma proteína bastante estável, com quatro hélices num arranjo antiparalelo raramente encontrado. Ao longo das quatro α -hélices, nas alças de conexão, há três pequenos segmentos com α -hélices adicionais. Conforme proposto, com base em dados de espectroscopia de absorção no UV confirmados por análise de estrutura por difração com raios-X, a Asp 169 da hélice IV está unida por pontes de hidrogênio ao Trp⁸⁶ da hélice II. Na proteína nativa, o triptofano fica no interior do núcleo hidrofóbico (Wicar *et al.*, 1994). A molécula é relativamente rígida e altamente resistente à desnaturação irreversível em determinadas temperaturas e condições de solução (Lewis *et al.*, 1980). A estrutura terciária foi determinada para o GH suíno e, embora não avaliada nos mesmos detalhes, presume-se que a do hGH seja similar (Baumann, 1991).

A partir da região de espectro de dicroísmo circular (CD) referente ao grupo amídico, calculou-se que o hGH tem cerca de 55% de α -hélice na molécula. A região central da estrutura é pouco afetada pelo pH entre 2,5 e 11,0 (Bewley, 1979). Significativa quantidade de α -hélice permanece também na presença de concentrações desnaturantes de uréia ou guanidina, e a estrutura nativa é restabelecida quando estes reagentes são removidos.

Existem duas principais formas de GH que diferem entre si em 13 aminoácidos. Nos humanos, aproximadamente 75% do GH corresponde à forma de 22 kDa e 5-10%, à de 20 kDa. A forma 20 kDa resulta na deleção dos aminoácidos 32-46 (Weigent, 1996).

O hGH é considerado um hormônio não glicosilado, podendo portanto ser produzido em sistema procariótico de expressão. Pode-se utilizar, por exemplo, *Escherichia coli* como a célula hospedeira, freqüentemente utilizada para alto nível de produção de proteínas heterólogas (Becker *et al.*, 1986; Nicaud *et al.*, 1986; Marino, 1989; Gold, 1990; Hodgson, 1993; Olins *et al.*, 1993; Shatzman, 1995; Hanning & Makrides, 1998). De acordo com a estratégia de expressão adotada, o produto de interesse pode ser secretado em diferentes compartimentos do hospedeiro, como o espaço citoplásmico, o espaço periplásmico ou ainda pode ser secretado para o meio extracelular. A escolha do compartimento celular para expressão da proteína deve levar em conta as vantagens e desvantagens de cada um.

Um alto nível de expressão de hGH tem sido obtido usando procedimentos conhecidos para otimizar tanto a transcrição do gene como a tradução do mRNA e vários grupos têm relatado a expressão do hormônio no citoplasma da *E. coli* (Goeddel *et al.*, 1979; Ikehara *et al.*, 1984; Dalbøge *et al.*, 1987; Mukhija *et al.*, 1995; Shin *et al.*, 1998; Patra *et al.*, 2000). No entanto, a produção citoplásmica apresenta certas desvantagens, por exemplo, a formação de corpos de inclusão, como são conhecidos os agregados de proteínas insolúveis gerados em virtude do alto nível de expressão (Becker *et al.*, 1986; Hanning & Makrides, 1998). É necessária uma etapa de solubilização e renaturação para a proteína voltar a sua conformação natural e essa recuperação da proteína biologicamente ativa pode ter alto custo na produção em larga escala (Georgiou *et al.*, 1996). As condições redutoras do citoplasma dificultam a formação de pontes dissulfeto. Várias estratégias de expressão têm sido desenvolvidas para ajudar na formação da

estrutura da proteína nativa. Neste compartimento, a degradação da proteína pela ação proteolítica é mais intensa (Makrides, 1996; Hanning & Makrides, 1998), pois o citoplasma apresenta um grande número de enzimas proteolíticas que estão envolvidas em várias atividades metabólicas, entre as quais a remoção de proteínas anormais ou reparadas incorretamente. A proteína produzida no citoplasma bacteriano geralmente contém uma metionina N-terminal, (Becker *et al.*, 1986, Hanning & Makrides, 1998) que pode ter um papel na formação de anticorpos nos pacientes tratados com o hormônio.

A secreção de proteínas no meio extracelular da *E. coli* pode ser uma estratégia desejável, porém pouco utilizada. Como vantagens apresenta um menor nível de atividade proteolítica e a purificação da proteína é facilitada devido ao baixo nível de contaminação por proteínas bacterianas, porém esta se encontra mais diluída. Este método não é viável para uma produção em larga escala, pois a proteína necessita atravessar duas membranas, a citoplásmica e a externa, e o rendimento por esse processo não é muito alto (Hanning & Makrides, 1998).

Deste modo tem sido utilizado um sistema de expressão baseado na secreção da proteína no espaço periplásmico da *E. coli*, no qual a ação proteolítica é menos intensa. O periplasma contém apenas 4% do total de proteínas celulares (Nossal *et al.*, 1966). Este sistema apresenta baixo custo na purificação da proteína quando comparado com o citoplásmico, sendo que está encontra-se concentrada no meio periplásmico (Makrides, 1996). O ambiente menos redutor facilita a formação das pontes dissulfeto. A proteína é obtida na forma solúvel e em sua conformação natural (Hanning & Makrides, 1998). Secreção semelhante ao processo natural das células somatotróficas é conseguida pela inserção de uma seqüência sinalizadora no gene do hGH. Em nossos estudos foi utilizada a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) para a inserção da seqüência sinalizadora.

A técnica de PCR visa amplificar um fragmento específico de DNA. É baseada na capacidade da enzima Taq DNA polimerase não ser inativada por temperaturas elevadas, que promovem normalmente a desnaturação do DNA. Esta mistura de reação deve conter o DNA que se deseja amplificar, a Taq DNA polimerase, nucleotídeos contendo os 4 tipos de bases nitrogenadas (A,T,C,G) e

dois oligonucleotídeos iniciadores ("primers"), que são complementares às duas extremidades (5' e 3') do fragmento de DNA que será amplificado.

Essa técnica se baseia na alternância de ciclos térmicos. Na fase de alta temperatura, o DNA, incluindo o fragmento que se deseja amplificar, se desnatura e, com a diminuição da temperatura, ocorre a hibridização das extremidades do fragmento a ser amplificado com os oligonucleotídeos que lhe são complementares. Ainda na fase de baixa temperatura, a atividade enzimática da Taq DNA polimerase é máxima em preencher o espaço entre os dois "primers" com os nucleotídeos (dNTPs) presentes na solução. O DNA original é usado como molde ("template"), de acordo com a seqüência presente na fita simples. O ciclo térmico então se reinicia e, ao aumentarmos a temperatura novamente, teremos a desnaturação de pelo menos 4 fitas do fragmento do DNA que se deseja amplificar e que servirão de molde para a síntese de 4 novos fragmentos assim que a temperatura da reação diminuir. A cada ciclo térmico, a quantidade de cópias do fragmento de DNA aumenta. O produto final desta reação é composto por uma grande quantidade do DNA amplificado, juntamente com o DNA original presente no início da reação.

Os peptídeos sinalizadores inseridos no hGH são compostos de 15 a 30 aminoácidos localizados na região N-terminal da proteína, facilitando a passagem do hormônio através da membrana citoplásmica, o que não garante uma eficiência no processo, já que outros fatores estruturais estão envolvidos (Novotny *et al.*, 1991; Andrews *et al.*, 1996; Makrides, 1996). O peptídeo sinalizador é clivado, ocorrendo a liberação da proteína madura para o espaço periplásmico (Hanning & Makrides, 1998), que é o espaço entre as membranas externa e interna da *E. coli*, sem a metionina inicial, ou seja, na sua forma autêntica. A proteína recombinante é extraída a partir do líquido periplásmico obtido mediante "choque osmótico" (Neu & Heppel, 1965; Koshland & Botstein, 1980) que mantém a integridade da célula, sendo o meio ideal para avaliar a qualidade e rendimento do produto antes da etapa de purificação (Dalmora *et al.*, 1997).

A Tabela I mostra os melhores rendimentos da expressão periplásmica relatados na literatura para o hGH, junto com as referências correspondentes e o método analítico utilizado para determinação do hormônio. Com exceção do nosso grupo, a quantificação foi feita por radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoenzimático (ELISA), que possuem uma exatidão limitada, especialmente no

caso de meios de cultura e extratos brutos (Jacobson *et al.*, 1997; De Oliveira *et al.*, 1999). Imunoensaios não podem distinguir entre formas indesejadas relacionadas ao hGH (como isômeros de carga e massa) e a forma principal do hormônio. Esta distinção é possível com o uso da metodologia de HPLC ou eletroforese capilar de zona livre (FZCE), que podem ser diretamente aplicadas no produto obtido do choque osmótico com propósitos qualitativos e quantitativos. (Strege & Langu, 1995; McNemey *et al.*, 1996; Dalmora *et al.*, 1997; Jacobson *et al.*, 1997; Jorgensen *et al.*, 1998; Karlsson *et al.*, 1999; Ueda *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2002; Ribela *et al.*, 2003).

Um vetor de expressão contém elementos que afetam a tradução e transcrição da proteína, e a inclusão de um gene que confira resistência a antibiótico facilita a seleção do vetor. O promotor controla a transcrição e afeta o nível de expressão do gene em *E. coli*. O promotor é considerado forte quando é capaz de produzir a proteína de interesse numa taxa de 10 a 30% do total de proteínas celulares e deve ter um nível basal de transcrição mínimo, o que é essencial na síntese de proteínas tóxicas para a célula hospedeira (Brown *et al.*, 1993; Dohert *et al.*, 1993; Wülfing & Plückthün, 1993; Suter-Crazzolara & Unsicker, 1995; Trudel *et al.*, 1996). O promotor deve ser induzido de maneira simples e com baixo custo. São usadas induções por temperatura e química. O açúcar isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) é um indutor efetivo de promotores *tac* e *trc*, mas seu uso não é ideal para produção em larga escala de proteínas terapêuticas devido à sua toxicidade e custo. A introdução de um promotor sensível à temperatura, como aquele derivado do fago lambda P_L (λ P_L), fornece um conveniente método de indução (Bernard & Helinski, 1979).

Tabela I. Expressão periplásmica de hGH recombinante em *E. coli*

Nível de expressão de hGH ($\mu\text{g/mL/DO}$)	Célula Hospedeira	Promotor	Peptídeo Sinalizador	Método analítico para determinação de hGH	Referência
1,5	<i>P. aeruginosa</i>	Trp	hGH	RIA	Gray et al., 1984
0,6	<i>E. coli</i> 294	Trp	PhoA	RIA	Gray et al., 1985
10-15	<i>E. coli</i> K12RV308	Lpp-lac	OmpA	RIA/ELISA	Becker & Hsiung, 1986; Hsiung et al., 1989
15-25	<i>E. coli</i> W3110	PhoA	STII	RIA	Chang et al., 1987
11,2 ^a	<i>E. coli</i> 101	Penicilina	Penicilina	RIA	Kato et al., 1987 ^b
10-15	<i>E. coli</i> BL21	Trc	OmpA	RIA	Cheah et al., 1994
10	<i>E. coli</i> W3110	npr	npr	ELISA	Uchida et al., 1997
0,8	<i>E. coli</i> RR1	λP_L	hGH	RP-HPLC	Dalmora et al., 1997

^a $\mu\text{g/mL}$ do meio de cultura.

^b hGH transportado através do periplasma e secretado no meio.

Em estudos anteriores, o nosso grupo relatou a construção e uso de um vetor de expressão para hGH incluindo uma seqüência sinalizadora derivada do hGH natural sob o controle do promotor λP_L . Esse vetor, que apresentou uma boa expressão, foi utilizado como vetor de referência no nosso estudo (Dalmora *et al.*, 1997; De Oliveira *et al.*, 1999; Ribela *et al.*, 2000).

Neste trabalho será avaliada a influência de vários fatores sobre a expressão do hGH, considerando aspectos qualitativos e quantitativos desse hormônio. Além da comparação de diferentes peptídeos sinalizadores incluindo o DsbA (Martin *et al.*, 1993) e o STII (Picken *et al.*, 1983), produzidos originalmente em *E. coli*, utilizaremos também o npr, um peptídeo sinalizador obtido da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* e modificado pela inserção do peptídeo composto por dois aminoácidos de lisina (K) e cinco aminoácidos de leucina (L) (npr2K5L), conforme descrito por Uchida e colaboradores (1997). As seqüências de aminoácidos dos peptídeos sinalizadores estudados são apresentados na Tabela II.

Tabela II. Aminoácidos codificados pelas seqüências sinalizadoras que foram utilizadas nas construções.

Peptídeo	Seqüência de aminoácidos
DsbA	Met Lys Lys Ile Trp Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ala Phe Ser Ala Ser Ala
STII	Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala
npr2K5L	Met Gly Leu Gly Lys Lys <u>Lys Lys Leu Leu Leu Leu Leu</u> Leu Ser Ser Ala Val Ala Ala Ser Phe Met Ser Leu Thr Ile Ser Leu Pro Gly Val Gln Ala
SPhGH	Met Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala

Serão avaliados também os efeitos sobre a expressão do hGH referentes ao estágio, duração e temperatura de indução, composição do meio de cultura e cepa das células hospedeiras. Os estudos foram realizados utilizando frascos de cultura no lugar do biorreator, usado em pesquisas anteriores (Dalmora *et al.*, 1997; De Oliveira *et al.*, 1999). Portanto, tornou-se necessário desenvolver uma metodologia para uma comparação rápida e fácil do nível de expressão das várias cepas nas diferentes condições de cultivo e ativação. A combinação sistemática dos vários fatores será direcionada para obtenção de uma melhora significativa da expressão do hGH em relação ao vetor de referência.

Os avanços tecnológicos na área de produção, purificação e metodologias analíticas viabilizaram o desenvolvimento de métodos físico-químicos para a caracterização de produtos biológicos, tornando possível relacionar a atividade biológica de algumas substâncias com determinações físico-químicas, com segurança aceitável (Riggin *et al.*, 1987; Riggin *et al.*, 1988; Horaud *et al.*, 1994; Bristow, 1996; Mire-Sluis *et al.*, 1996). Entre os métodos descritos pela literatura para as análises qualitativa e quantitativa do hGH, destacam-se a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil sulfato de sódio (SDS), freqüentemente combinada com "immunoblotting", também denominado "Western Blotting" ou WB (Ikehara *et al.*, 1984; Bangham *et al.*, 1985; Becker & Hsiung, 1986; Hsiung *et al.*, 1986; Lefort & Ferrara, 1986; Chang *et al.*, 1987; Gellerfors *et al.*, 1989;) e a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) (Riggin *et al.*, 1987; Teshima & Canova-Davis, 1992; Dalmora *et al.*, 1997).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e o teste imunológico (immunoblotting) são alternativas bastante usadas para obter informações relativas às proteínas recombinantes. Podem ser usados para identificar e quantificar proteínas de interesse, ou detectar e quantificar impurezas protéicas produzidas pela célula hospedeira.

Riggin e colaboradores estudaram e padronizaram metodologia de RP-HPLC para caracterização de rec-hGH. Avaliaram as condições cromatográficas, incluindo tipo de coluna, temperatura, composição da fase móvel, pH e diferentes fluxos. Analisaram a eficiência da resolução, comparando RP-HPLC por gradiente e isocrática com HPLC de troca iônica. Demonstraram que a RP-HPLC isocrática, com coluna Vydac C4 a 45°C, fase móvel composta de 29% de n-propanol e 71% de tampão Tris 50 mM pH 7,5 resultava na melhor separação. O método

possibilitou determinar sulfóxidos, desamidados e a forma não-alterada de hGH, com maior resolução em relação aos procedimentos eletroforéticos e cromatográficos alternativos, como focalização isoelétrica e troca iônica, que aliás não permitem a determinação dos sulfóxidos (Riggin *et al.*, 1987; Hayakawa, *et al.*, 1991; Bristow *et al.*, 1995; Bristow, 1996).

Cabe ressaltar a importância tecnológica e prática do presente estudo, pois uma melhora no vetor de expressão do hGH refletirá diretamente na melhora de rendimentos tanto na etapa de fermentação (maior quantidade de hormônio por volume de meio de cultura), como também no aumento da eficiência da purificação, pois o hGH presente no material de partida (líquido periplásmico) apresentará uma maior atividade específica.

2 OBJETIVOS

Uma das metas deste trabalho é padronizar um método que possibilite avaliar a influência de vários fatores sobre a expressão do hGH recombinante no espaço periplásmico da bactéria *Escherichia coli* cultivada em frascos de cultura. Entre os fatores estudados estão as condições de cultivo bacteriano: densidade óptica para indução ou ativação, duração da ativação, temperatura de ativação e composição do meio de cultura. Serão avaliadas também a eficiência de diferentes cepas de *E. coli* e de diferentes peptídeos sinalizadores, nas melhores condições de cultivo, com o propósito principal de obter vetores que apresentem um aumento significativo na expressão do hGH, em comparação com o vetor de referência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético, modelo 258, Fanem (São Paulo, Brasil);
- Agitador rotatório tipo Vortex, modelo 162, Marconi (São Paulo, Brasil);
- Aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo SCL-10A, acoplado a um detector de UV SPD-10AV e a um programa de computador Class VP, Shimadzu (MD, EUA);
- Aparelho Milli-Q-plus, purificador de água, Millipore, Bedford, (MA, EUA);
- Autoclave vertical, modelo 103, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil);
- Balança analítica, modelo H20T, Mettler (Zurich, Suíça);
- Balança analítica, modelo P100N, Mettler (Zurich, Suíça);
- Banho-maria, modelo 112, Fanem (São Paulo, Brasil);
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC-2B, Sorvall, Newtown, (Connecticut, EUA);
- Coluna para HPLC de fase reversa C₄, 214 TP54 (25 cm X 4,6 mm D.I.), diâmetro dos poros 300 Å e tamanho das partículas de 5 µm e pré-coluna 214 GD54 (5µm; 1,0 cm X 4,6 mm D.I.), Vydac (Hesperia, EUA);
- Concentrador a vácuo, Savant, modelo DNA 110-120, Instruments, Inc. Farmingdale (NY, EUA);
- Contador gama tipo "poço", com troca automática de amostra, modelo Cobra auto-gama, eficiência aproximada para I¹²⁵ de 80%, Packard Instrument Company (Illinois, EUA);
- Destilador de água, modelo 016, Fabbe-Primar (São Paulo, Brasil);
- Espectrofotômetro, modelo PQM II, Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha);
- Estufa de esterilização e secagem, modelo 315 SE, Fanem (São Paulo, Brasil);
- Estufa de cultura, modelo 002-CB, Fanem (São Paulo, Brasil);

- Estufa de cultura retilínea, Fanem (São Paulo, Brasil);
- Freezer -80°C, modelo 8425, Forma Scientific, Marietta (Ohio, EUA);
- Fluxo Laminar, Veco (São Paulo, Brasil);
- Incubador Tipo Shaker, série 25, New Brunswick Scientific Co. Inc. (Edison, EUA);
- Máquina de produzir gelo picado, modelo EGE 150, Everest (Rio de Janeiro, Brasil);
- Medidor digital de pH, modelo 420A, Orion (Boston, EUA);
- Membrana de nitrocelulose (22 µm), Hybond - C modelo RPN 303C, Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia);
- Micro-centrifuga, modelo 5415 C, Eppendorf (Hamburgo, Alemanha);
- Refrigerador duplex, modelo Air Flow System DC38, Electrolux (São Paulo, Brasil);
- Sistema de eletroforese vertical Horfer Mini VE, Amersham biosciences (Uppsala, Suécia);
- Sistema de purificação de água Millipore Milli-Q plus (Bedford, EUA).

3.1.2 Cepas de *E. coli*

- RR1
- HB2151
- BMH7118
- W3110
- RB791
- TP2339

3.1.3 Reagentes e soluções

- Acrilamida, Merck (São Paulo, Brasil);
- Acetonitrila, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA);
- Ácido Acético, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Ácido Clorídrico, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico) (EDTA), Synth (São Paulo, Brasil);
- Ácido Fosfórico, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Ágar purificado para bacteriologia, Merck (São Paulo, Brasil);

- Ágar (Bacto Ágar), BD (São Paulo, Brasil);
- Álcool Isopropílico, P.A., Synth (São Paulo, Brasil)
- Ampicilina, Bayer (São Paulo, Brasil);
- Azul de bromofenol, Sigma (St. Louis, EUA);
- Bicarbonato de Amônio, P.A., Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha);
- Brometo de etídeo, Sigma (St. Louis, EUA);
- Casaminoácidos, Difco (São Paulo, Brasil);
- Cloreto de Cálcio Anidro, J. T. Baker Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA);
- Cloreto de Sódio, P.A., QM (São Paulo, Brasil);
- Dodecilsulfato de sódio, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia);
- Enzimas de restrição Bam HI, Eco RI, Hind III, NdeI e a enzima T4 DNA ligase adquiridas da Pharmacia, Uppsala, Suécia ou da New England Biolabs (Beverly, EUA);
- Etanol, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Extrato de Levedura para Microbiologia, Difco (São Paulo, Brasil);
- Fosfato de Sódio Dibásico, P.A., Synth (São Paulo, Brasil);
- Fosfato de Sódio Monobásico, P.A., Synth (São Paulo, Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Formaldeído, P. A., Synth (São Paulo, Brasil);
- Glicerol, P.A., Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA);
- Glicina, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Glicose, P.A., Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA);
- Hidróxido de Sódio, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Iodeto de Potássio, P.A., Carlo Erba (São Paulo, Brasil);
- Leite desnatado em pó Molico, composição declarada: gordura (1%), proteínas (36%), lactose (52%), sais minerais (8%), água (3%);
- Metanol P.A. Merck (São Paulo, Brasil);
- Metilenobisacrilamida, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia);
- Molibdato de Sódio, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- n-propanol, grau HPLC, Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA);
- Persulfato de amônio, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia);
- Proteína A, Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia);
- Reagente de Folin, P.A., Sigma (St. Louis, EUA);

- Sacarose para uso em meios de cultura bacteriológicos, Difco (São Paulo, Brasil);
- Sílica Si 60, 7,9-12,4 μm , Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Soluções tampões para calibração de pHmetro, pH 4,0 e 7,0, Merck (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de Amônio, P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de Cobalto II (Heptahidratado), P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de Ferro II (Heptahidratado), P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de Magnésio Anidro, P.A., J. T. Baker Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA);
- Sulfato de Manganês (Monohidratado), P.A., Synth (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de Potássio, P.A., QM (São Paulo, Brasil);
- Sulfato de Zinco (Heptahidratado), P.A., Merck (São Paulo, Brasil);
- Triptona, Difco (São Paulo, Brasil);
- Tris Base (Trizma Base), P.A., Sigma (St. Louis, EUA).

3.1.4 Sistemas e reagentes específicos

- Marcador de peso molecular para SDS-PAGE da Pharmacia (Uppsala, Suécia);
- Padrão Internacional de hGH recombinante (WHO 98/574), com atividade específica de 3,0 UI/mg. Cada ampola contém 2 mg de somatropina, 2 mg de glicina, 2 mg de manitol, 2 mg de lactose e 2,5 mg de bicarbonato de sódio. Cedido pelo National Institute for Biological Standards and Control (Londres, Inglaterra);
- Sistema de purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose QIAquick da Qiagen (Hilden, Alemanha);
- Sistema de extração de DNA plasmidial QIAprep da Qiagen (Hilden, Alemanha);
- Sistema de dosagem de proteína total, Micro BCA, Pierce (Rockford, EUA);
- Soro de coelho anti-rec-hGH produzido no IPEN (Lote 1992).

3.1.5 Material radioativo

- Na ¹²⁵I comercial, livre de carregadores e oxidantes com atividade específica de 11100-22200 MBq/mL (300-600 mCi/mL), fornecido pela Nordion Europe S.A. (Fleurus, Bélgica).

3.1.6 Meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados usando-se água destilada, sendo adicionada a solução de antibiótico após a autoclavação.

Composição do meio de cultura Luria-Bertani (LB)

Extrato de levedura	-----	5g
NaCl	-----	10g
Triptona	-----	10g
H ₂ O destilada qsp	-----	1 L

Composição de meio de cultura LB/Ágar

Ágar	-----	25g
Meio de cultura LB qsp	-----	1L

Composição do meio HKSII

Extrato de levedura	-----	10g
Triptona	-----	20g
Hidrolizado de caseína	-----	4g
K ₂ SO ₄	-----	3g
MgSO ₄ .7H ₂ O	-----	0,8g
CaCl ₂	-----	0,1g
Solução de metais*	-----	320µL
H ₂ O deionizada qsp	-----	1L

* Solução de metais

FeSO ₄ .7H ₂ O	-----	0,5g
MnSO ₄ .H ₂ O	-----	0,3g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-----	0,1g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	-----	0,1g
H ₃ BO ₃	-----	0,025g
CoSO ₄	-----	0,24g
CuCl ₂ .2H ₂ O	-----	0,05g
KI	-----	0,03g
HCl 5N qsp	-----	50 mL

3.1.7 Soluções

- Solução cloreto de cálcio (CaCl₂) 1M;
- Solução de EDTA 0,5 M, pH 8,0;
- Solução tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8;
- Solução tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8;
- Solução tampão Tris-HCl 1mM, pH 8,0;
- Solução tampão Tris-HCl 2M, pH 8,0;
- Solução de antibiótico, ampicilina 100 µg/mL;
- Solução de sacarose 20%, pH 7,5.

Solução SDS-PAGE

Preparação do gel de poliacrilamida 15% para corrida eletroforética.

SOLUÇÕES	GEL DE APLICAÇÃO DA AMOSTRA Volume (10 mL)	GEL DE SEPARAÇÃO Volume (20 mL)
Água deionizada	6,8	4,6
Acrilamida/Bisacrilamida	1,7	10,0
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,25	---
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	---	5,0
SDS 10%	0,1	0,2
Persulfato de amônio 10%	0,1	0,2
TEMED	0,01	0,08

Soluções Western Blotting

Tampão de Transferência

Glicina	-----	1,45g
Tris-Base	-----	2,9g
SDS 20%	-----	0,925 mL
Metanol	-----	100 mL
H ₂ O deionizada qsp	-----	500 mL
Acertar o pH para 8,3		

PBS 10x

NaCl	-----	8g
KCl	-----	0,2g
Na ₂ HPO ₄	-----	1,44g
KH ₂ PO ₄	-----	0,24g
H ₂ O deionizada qsp	-----	100 mL
Acertar o pH para 7,4		

3.2 Métodos

3.2.1 Construção dos vetores de expressão utilizando o promotor λP_L

Novos vetores foram construídos a partir de um vetor já desenvolvido no laboratório e caracterizado por conter o promotor λP_L , a sequência sinalizadora derivada do hGH seguido do gene do hGH e também o gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina. Esse vetor, introduzido na cepa RR1, foi denominado no nosso estudo de vetor de referência (Dalmora *et al.*, 1997; De Oliveira *et al.*, 1999; Ribela *et al.*, 2000).

3.2.1.1 Construção do cassete de expressão

O vetor que gerou o cassete de expressão, utilizado nas demais construções, foi obtido pela introdução, no vetor de referência, do sítio de restrição NdeI entre o sítio EcoRI e o códon de inicialização ("start codon"), através de mutação por reação de polimerase em cadeia (PCR). A utilização da PCR possibilitou também a eliminação de uma sequência de aproximadamente 117 pares de bases presentes no vetor de referência, mas que por se localizar após o códon de terminação ("stop codon") não era traduzida. Esse novo vetor foi denominado SPhGH (Figura 2).

Para obtenção do cassete de expressão foi realizada a digestão do vetor SPhGH com as enzimas de restrição NdeI e BamHI, seguida da isolamento e purificação do fragmento de 2560 pb. O fragmento de DNA foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 5 μ g de brometo de etídeo por mL, sendo as bandas reveladas durante exposição à luz ultravioleta. A região do gel contendo a banda de interesse foi recortada e o DNA extraído utilizando o kit QIAquick® (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Brevemente, o gel é dissolvido em um tampão que fornece condições apropriadas para a ligação do DNA na resina de sílica presente na coluna usada para purificação. Durante a fase de absorção do DNA as impurezas são eliminadas, passando através da coluna. Resíduos de sal são lavados pela solução contendo etanol, e o resíduo desta é eliminado por uma etapa adicional de centrifugação. Para eluição eficiente o tampão deve ser básico com baixa força iônica (10 mM Tris-HCl, pH8,5).

Após a purificação, o fragmento de 2560 pb foi defosforilado (incubação por 30 minutos a 37°C com a enzima fosfatase alcalina) e submetido a uma nova purificação, obtendo por fim o cassete de expressão, pronto para uso.

A defosforilação (remoção do grupo fosfato 5') tem por finalidade diminuir a possibilidade de recircularização do vetor sem a presença do inserto, melhorando assim a eficiência das próximas etapas de clonagem.

3.2.1.2 Reações de PCR

O vetor de referência foi utilizado como molde na reação de PCR. As técnicas de biologia molecular utilizadas seguiram as metodologias descritas por Maniatis e colaboradores (1989).

Os oligonucleotídeos sintéticos usados neste PCR foram o "sense" incluindo o sítio NdeI (sublinhado) e 6 nucleotídeos do peptídeo sinalizador do hGH (5'- GAG GAA TTC CAT ATG GGC TCC -3') e o "anti-sense" incluindo a seqüência C-terminal do gene do hGH e o sítio BamHI (sublinhado) depois do stop códon (5'-ATC GGA TCC TTA TCA GAA GCC ACA GCT GCC CTC C -3').

O cassete de expressão foi obtido após digestão do vetor SPhGH pelas enzimas de restrição NdeI e BamHI, e retirada do gene correspondente ao hGH.

Outros vetores, diferenciados pelo peptídeo sinalizador, foram construídos mediante a introdução no cassete de expressão dos genes (peptídeo sinalizador-hGH) obtidos por PCR, conforme esquema a seguir:

(I) seqüência DsbA-hGH - oligonucleotídeo "sense", incluindo o sítio NdeI, 57 nucleotídeos do peptídeo sinalizador DsbA-hGH (sublinhado) e parte do gene do hGH (5'- GAG GAA TTC CAT ATG AAA AAG ATT TGG CTG GCG CTG GCT GGT TTA GTT TTA GCG TTT AGC GCA TCG GCG TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCC -3'); o oligonucleotídeo "anti-sense" foi o mesmo usado na construção do cassete de expressão.

(II) seqüência STII-hGH - oligonucleotídeo "sense", incluindo o sítio NdeI, 69 nucleotídeos do peptídeo sinalizador do STII (sublinhado) e parte do gene do hGH (5'- GAA TTC CAT ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT GCA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAT GCC TAT GCA TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCC -3'), o oligonucleotídeo "anti-sense" foi o mesmo usado na construção do cassete de expressão.

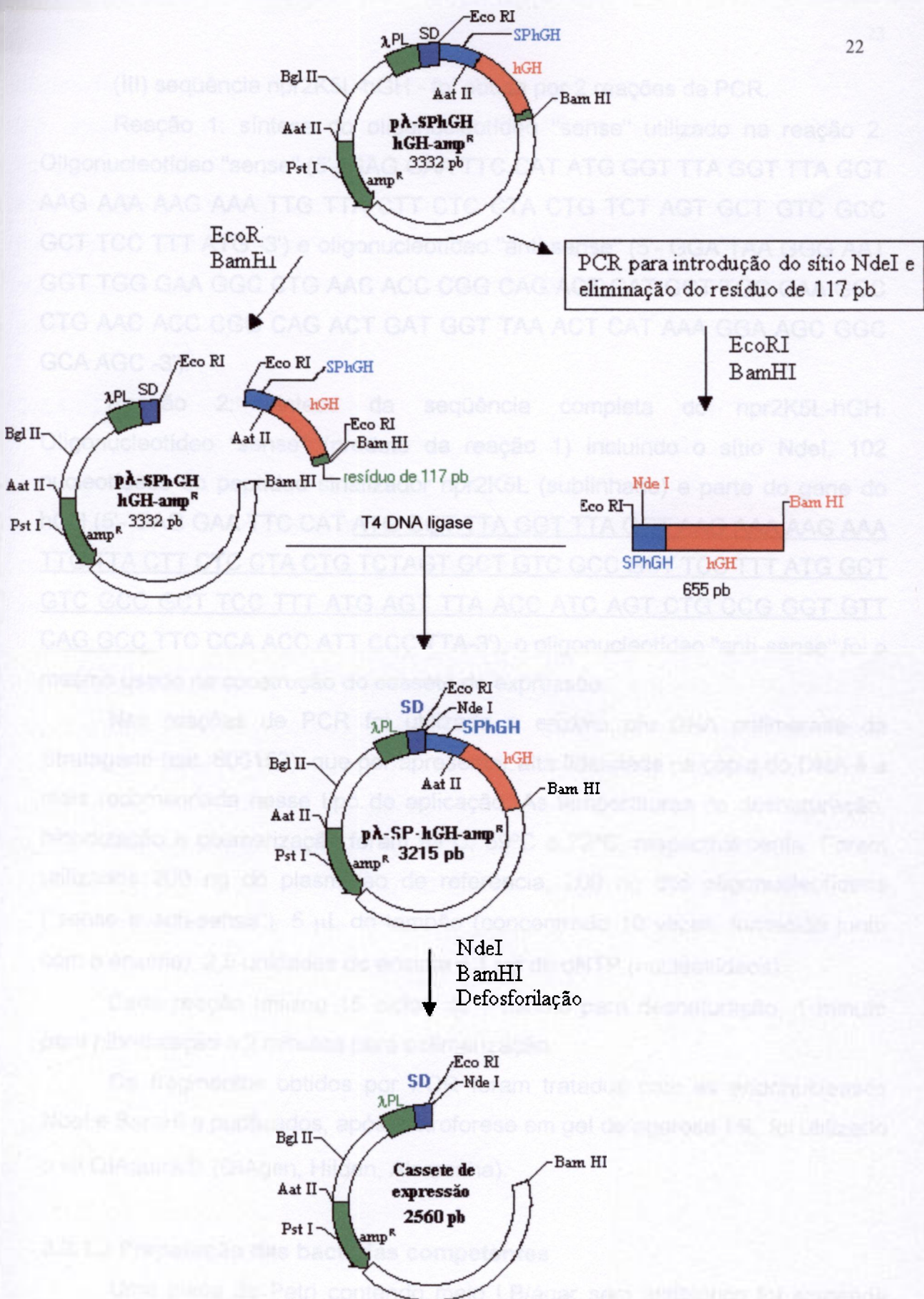


Figura 2. Esquema de construção do Cassete de Expressão.

(III) seqüência npr2K5L-hGH - foi obtida por 2 reações de PCR.

Reação 1: síntese do oligonucleotídeo "sense" utilizado na reação 2. Oligonucleotídeo "sense" (5'- GAG GAA TTC CAT ATG GGT TTA GGT TTA GGT AAG AAA AAG AAA TTG TTA CTT CTC CTA CTG TCT AGT GCT GTC GCC GCT TCC TTT ATG -3') e oligonucleotídeo "anti-sense" (5'- GGA TAA GGG AAT GGT TGG GAA GGC CTG AAC ACC CGG CAG ACT GAT GGT TGG GAA GGC CTG AAC ACC CGG CAG ACT GAT GGT TAA ACT CAT AAA GGA AGC GGC GCA AGC -3').

Reação 2: síntese da seqüência completa do npr2K5L-hGH. Oligonucleotídeo "sense" (produto da reação 1) incluindo o sítio NdeI, 102 nucleotídeos do peptídeo sinalizador npr2K5L (sublinhado) e parte do gene do hGH (5'- GAG GAA TTC CAT ATG GGT TTA GGT TTA GGT AAG AAA AAG AAA TTG TTA CTT CTC CTA CTG TCTAGT GCT GTC GCC GCT TCC TTT ATG GCT GTC GCC GCT TCC TTT ATG AGT TTA ACC ATC AGT CTG CCG GGT GTT CAG GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3'), o oligonucleotídeo "anti-sense" foi o mesmo usado na construção do cassete de expressão.

Nas reações de PCR foi utilizada a enzima pfu DNA polimerase da Stratagene (cat. 600153), que por apresentar alta fidelidade na cópia do DNA é a mais recomendada nesse tipo de aplicação. As temperaturas de desnaturação, hibridização e polimerização foram 94°C, 59°C e 72°C, respectivamente. Foram utilizados 200 ng do plasmídeo de referência, 200 ng dos oligonucleotídeos ("sense e anti-sense"), 5 µL do tampão (concentrado 10 vezes, fornecido junto com a enzima), 2,5 unidades da enzima e 1 µg de dNTP (nucleosídeos).

Cada reação utilizou 15 ciclos de 1 minuto para desnaturação, 1 minuto para hibridização e 2 minutos para polimerização.

Os fragmentos obtidos por PCR foram tratados com as endonucleases NdeI e BamHI e purificados, após eletroforese em gel de agarose 1%, foi utilizado o kit QIAquick® (QIAGEN, Hilden, Alemanha).

3.2.1.3 Preparação das bactérias competentes

Uma placa de Petri contendo meio LB/ágar sem antibiótico foi semeada com *E. coli* (RR1) e incubada a 30°C "overnight" (ON). Uma colônia foi inoculada em 2 mL de meio LB e mantida a 30°C, com agitação, por 16 h. Esta cultura foi

diluída em 200 mL de meio LB e incubada, sob agitação, até atingir a DO de 0,4 a 0,5 unidades ópticas, no comprimento de onda de 600 nm (A_{600}). Após centrifugação (3000g-5 minutos) as bactérias foram ressuspensas em 100 mL de solução gelada composta de CaCl_2 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e glicerol 15%, mantidas em gelo por 15 minutos e centrifugadas novamente. As bactérias foram ressuspensas em 13 mL da mesma solução, fracionadas em alíquotas de 200 μL e armazenadas a -80°C .

3.2.1.4 Construção dos vetores

O cassete de expressão foi circularizado mediante ligação covalente com os fragmentos correspondentes ao gene do hGH contendo um dos peptídeos sinalizadores: DsbA, npr2K5L ou STII. Os fragmentos de DNA foram incubados com a enzima T4 DNA ligase a 4°C "overnight" (ON), sendo o volume final da reação de 10 μL . O produto da reação de ligase foi utilizado para transformar cepas RR1 de *E. coli*. Alguns clones foram escolhidos e incubados a 30°C em meio LB para extração do DNA plasmidial para análise de restrição. Foi utilizado o kit QIAprep® (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Após confirmação da construção por análise de restrição, os vetores resultantes foram denominados DsbA-hGH, npr2K5L-hGH e STII-hGH. Os clones foram estocados a -80°C em 15% de glicerol. Os esquemas utilizados na construção de cada um dos vetores são apresentados nas Figuras 3, 4 e 5. A Figura 6 apresenta o resultado de uma análise de restrição, na qual os vetores foram digeridos com as enzimas EcoRI e BamHI.

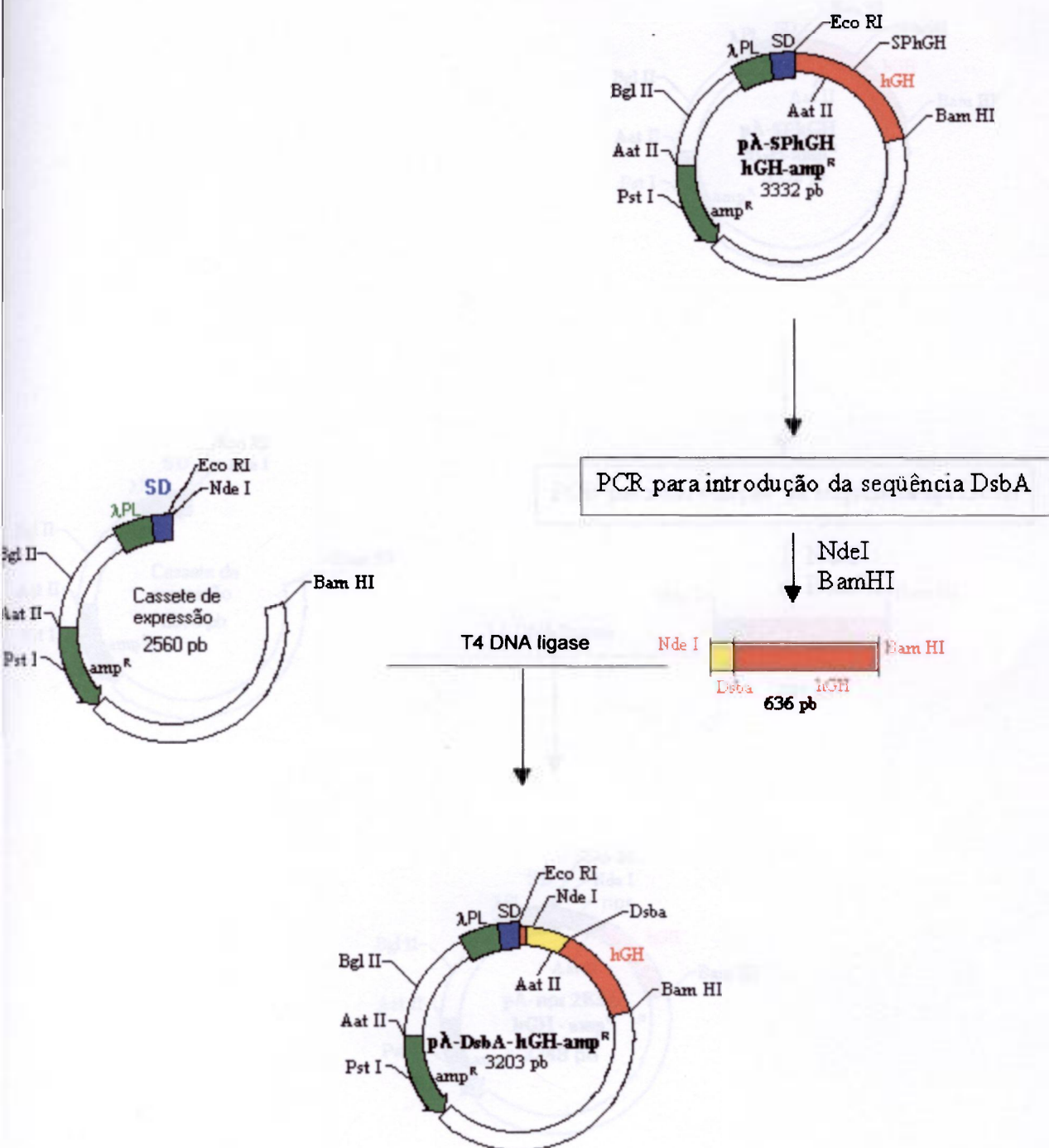


Figura 3. Construção do vetor de expressão $p\lambda$ -DsbA-hGH-amp^R a partir do Cassete de Expressão e do vetor de referência no qual, por PCR, foi introduzida a seqüência relativa ao peptídeo sinalizador DsbA.

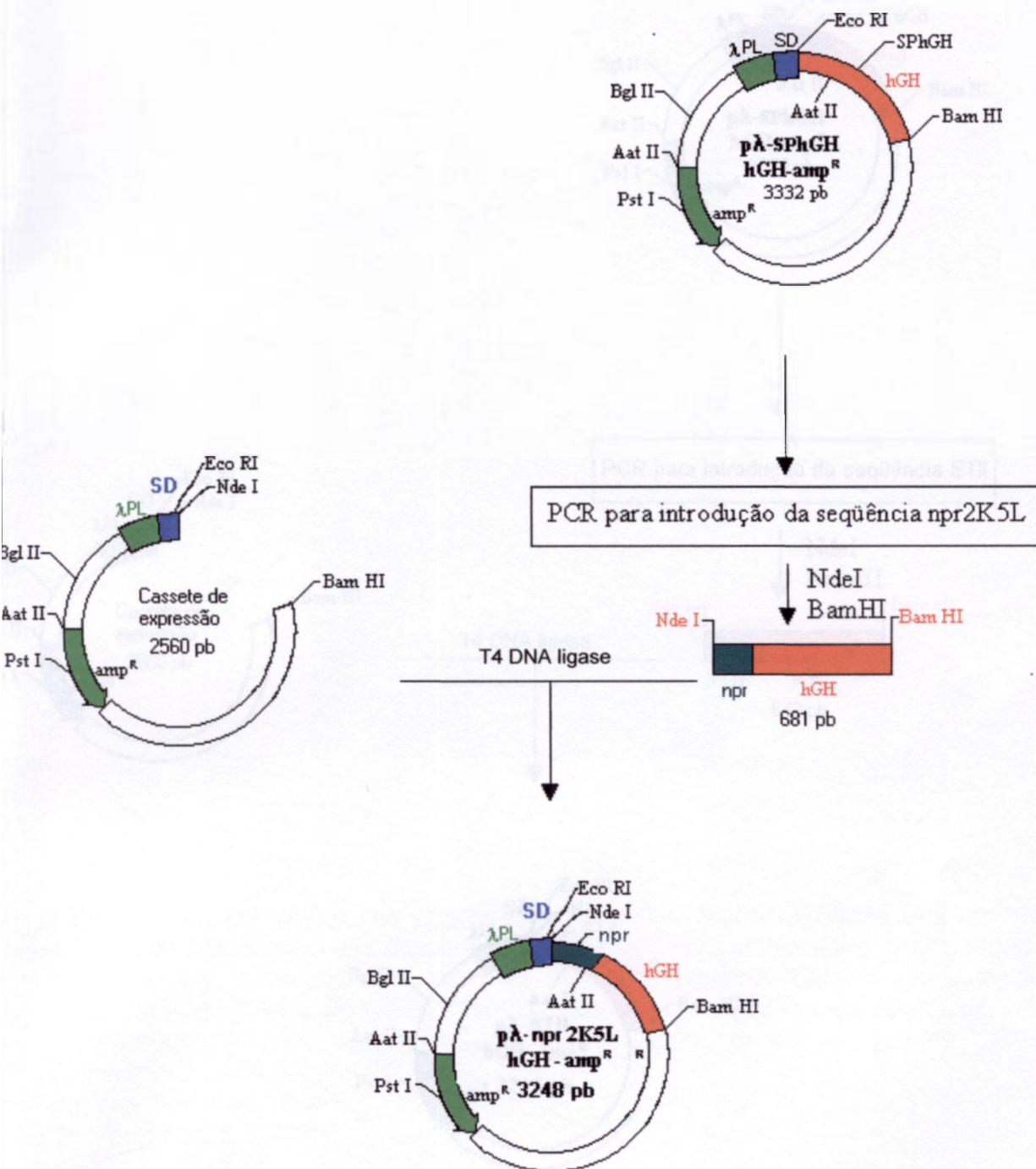


Figura 4. Construção do vetor de expressão $p\lambda$ -npr2K5L-hGH-amp^R a partir do Cassete de Expressão e do vetor de referência no qual, por PCR, foi introduzida a seqüência relativa ao peptídeo sinalizador npr2K5L.

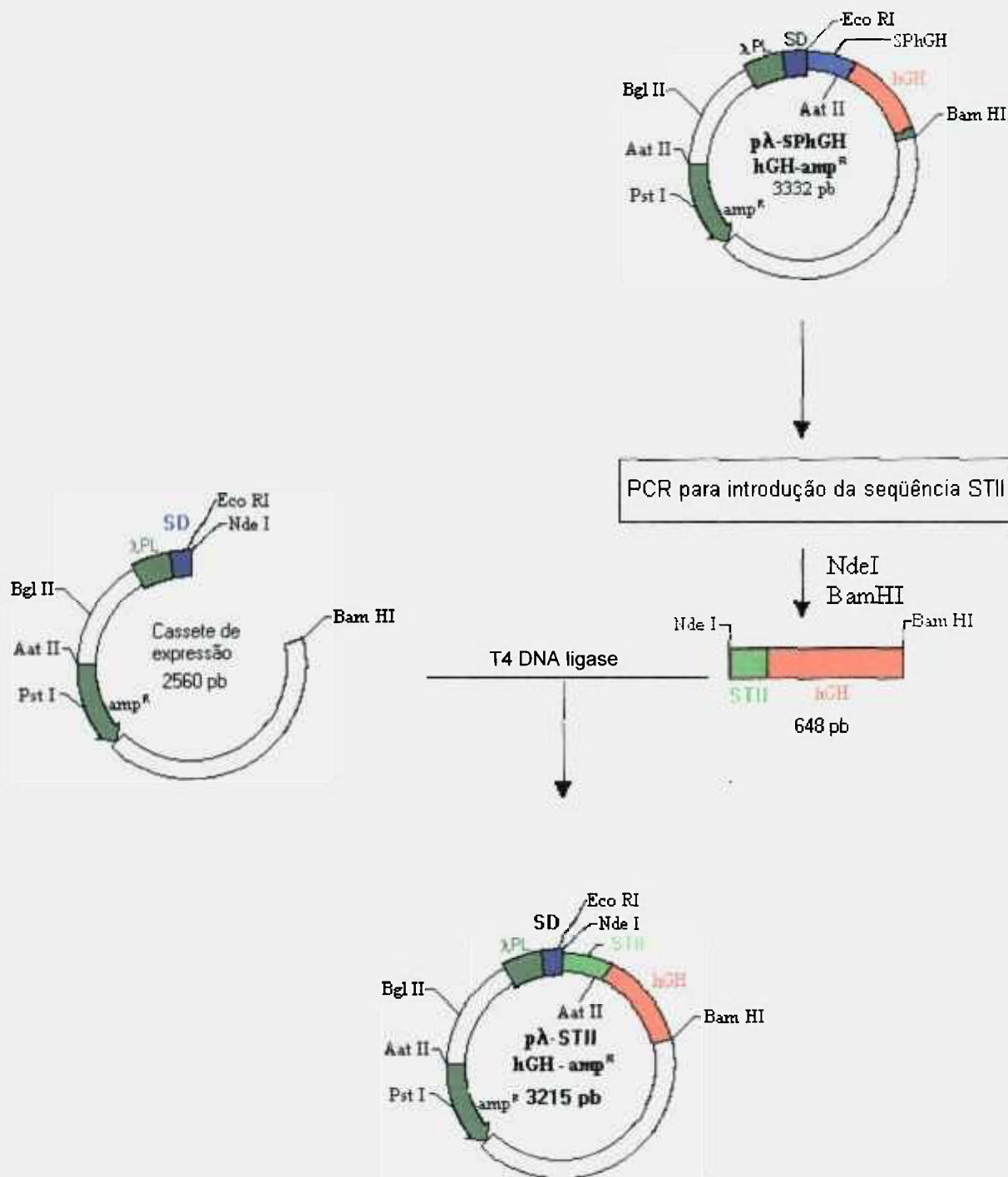


Figura 5. Construção do vetor de expressão $p\lambda$ -STII-hGH-amp^R a partir do Cassete de Expressão e do vetor de referência no qual, por PCR, foi introduzida a seqüência relativa ao peptídeo sinalizador STII.

3.2.1.5 Transformação e clonagem

As células da bactéria competentes foram resuscitadas do freezer a 37°C e transformadas a 42°C (Shimizu et al., 2004). A mistura contendo DNA

foam introduzidas na bactéria e submetidas a choque térmico em banho-maria a 42°C por 90 segundos. Cada alíquota foram incubadas a 37°C com agitação constante em placas de Petri com bactérias em placas de Petri a 37°C.

contendo meio de crescimento. Após 24 horas de incubação a 37°C, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet foi resuscitado em 100 µl de água estéril.

3.2.2 Choque osmótico
O meio de crescimento contendo as células transformadas foi utilizado para cultivar as células em meio hipotônico (incubação a 37°C por 24 horas).

Após 24 horas de incubação, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet foi resuscitado em 100 µl de água estéril. A concentração bacteriana da suspensão bacteriana foi determinada por contagem em placa.

As células foram precipitadas por centrifugação a 1000g por 5 minutos a 4°C. O precipitado resultante, após resusperado em solução de Tris-HCl 10 mM pH 7.5 contendo sacarose 20% e solução de EDTA 0.5 M pH 8.0, foi

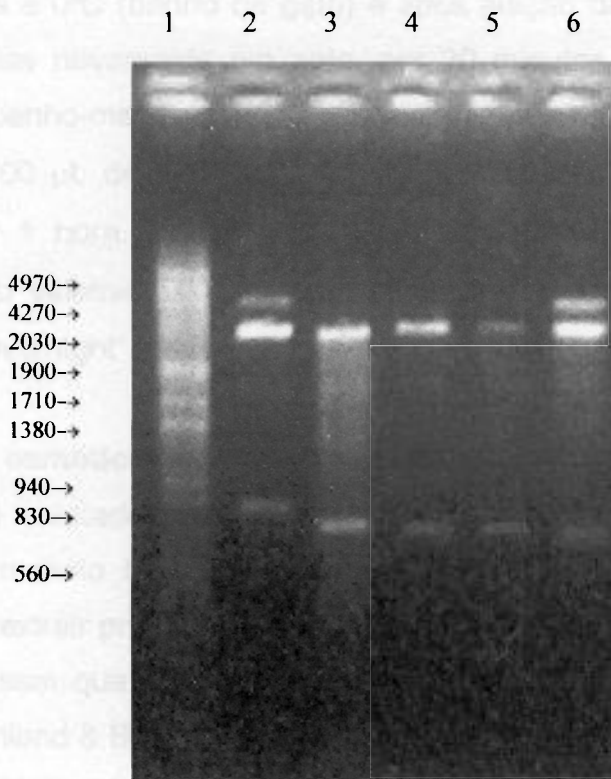


Figura 6. Análise em gel de agarose 1%, com revelação mediante brometo de etídeo dos plasmídeos das diferentes construções. Os plasmídeos foram obtidos por mini-prep após digestão com as enzimas EcoRI e BamHI, gerando os fragmentos de DNA correspondentes ao vetor e ao peptídeo sinalizador/hGH.

- 1- Marcador de peso molecular com indicação do número de par de bases relativo a cada fragmento
- 2- Vetor de referência
- 3- Vetor npr2K5L-hGH
- 4- Vetor SP-hGH
- 5- Vetor STII-hGH
- 6- Vetor DsbA-hGH

$$\eta = \frac{DQ \cdot \rho \cdot g \cdot d^2}{100 \cdot V \cdot \Delta \rho}$$

$$\eta = \frac{g \cdot d^2}{20}$$

3.2.1.5 Transformação e clonagem

As alíquotas de bactérias competentes foram retiradas do freezer -80°C e descongeladas a 0°C (banho de gelo) e após adição da mistura contendo DNA, foram incubadas novamente em gelo, por 20 minutos e submetidas a choque térmico em banho-maria a 37°C por 2 minutos. Em cada alíquota foram adicionados $800\ \mu\text{L}$ de meio LB, seguido de incubação a 30°C , com agitação rotacional por 1 hora. Foram semeados $300\ \mu\text{L}$ destas bactérias em placas contendo meio seletivo LB/ágar com ampicilina ($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas em estufa 30°C "overnight" (ON).

3.2.2 Choque osmótico

O meio coletado da fermentação foi submetido ao choque osmótico, (incubação em meio hipertônico seguido de incubação em meio hipotônico), utilizado para extrair proteínas periplásmicas a partir da suspensão bacteriana da fermentação, sem que ocorra ruptura da célula, como pode ser observado na Figura 7 (Koshland & Botstein, 1980).

As bactérias foram precipitadas por centrifugação, 3000g -5 minutos, realizada a 4°C . O precipitado resultante, após ressuspensão em solução de Tris-HCl $10\ \text{mM}$ pH $7,5$ contendo sacarose $20\ \%$ e solução de EDTA $0,5\ \text{M}$ pH $8,0$, foi mantido em repouso, em banho de gelo, durante 10 minutos. Uma nova centrifugação foi realizada, nas mesmas condições anteriores, sendo descartado o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensão em solução de Tris-HCl $1\ \text{mM}$ pH $7,0$ e mantido em banho de gelo por 10 minutos. Outra centrifugação foi realizada, nas mesmas condições anteriores, durante 15 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante contendo as proteínas periplásmicas, foi mantido a 4°C ou estocado a -80°C . Os volumes das soluções de sacarose e Tris-HCl foram calculados pela fórmula "a" e os volumes de EDTA, pela fórmula "b".

$$a = \frac{\text{DO } 600\ \text{nm} \times \text{Volume do Meio (mL)}}{100}$$

$$b = \frac{a}{30}$$

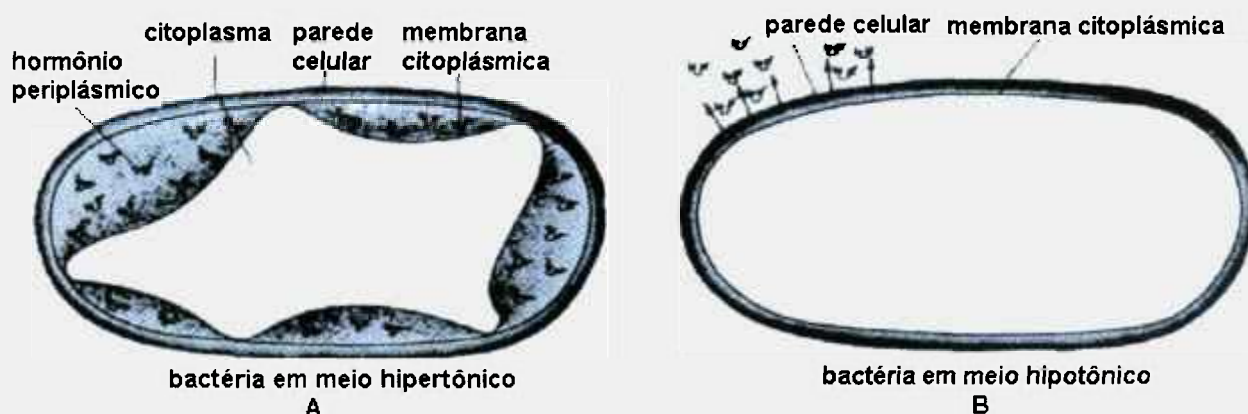


Figura 7. Esquema de choque osmótico realizado para extração das proteínas periplásmicas. (A) meio hipertônico. (B) meio hipotônico.

3.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC)

As avaliações qualitativa e quantitativa do hGH foram realizadas por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC).

Foi utilizado o HPLC da marca Shimadzu, modelo SCL-10AV HPLC acoplado a um sensor de UV SPD-10AV no comprimento de onda de 220 nm, empregando o software Class VP, também da Shimadzu. A coluna utilizada foi a Vydac C4 214 TP54 (25 cm x 4,6 mm D.I., diâmetro do poro de 300 Å e diâmetro da partícula de 5 µm) mantida a 45°C. A pré-coluna Vydac 214GD54 foi colocada entre o injetor da amostra e a coluna principal, e entre a bomba e o injetor da amostra foi instalada uma coluna de sílica Si-60 com partículas de 7,9 a 12,4 µm. A fase móvel consistiu da mistura de 71% Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e 29% de n-propanol, que foi filtrada em membrana de 47 mm de diâmetro com poros de 0,22 µm (Dalmora *et al.*, 1997). O fluxo foi de 0,5 mL/min. Injetou-se volume de 100 µL. A quantidade da forma não alterada de hGH foi calculada utilizando o programa de computador Class-VP, fornecido pela Shimadzu.

3.2.4 SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 15%, na presença de 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), sob condições não redutoras. Durante a corrida eletroforética, a intensidade da corrente foi de 35 mA. As proteínas presentes no gel foram fixadas mergulhando o gel em uma solução com 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial, por 30 minutos.

A coloração foi efetuada imergindo o gel fixado em uma solução com 0,25% de "Coomassie Brilliant Blue G250", 45% de metanol e 8% de ácido acético e mantendo-o sob agitação por aproximadamente uma hora. A seguir o gel foi descorado em uma solução com 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial, sendo realizadas trocas sucessivas, até ser obtida a transparência desejada. O gel foi conservado em uma solução de 1% de glicerol em água.

3.2.5 Western Blotting (WB)

A técnica do WB, seguiu basicamente a metodologia de transferência semi-seca, utilizando o anticorpo anti-hGH, produzido no IPEN, diluído 1:100.

As amostras para análise no WB foram submetidas a uma SDS-PAGE seguida por transferência semi-seca para uma membrana de nitrocelulose. A transferência das proteínas foi realizada por eletroeluição do seguinte modo: colocou-se uma camada de aproximadamente 3 mm de espessura de papel filtro pré-umedecido em tampão de transferência (glicina 0,3%, Tris-base 0,6%, SDS 0,04%, metanol 20%) e em seguida, do polo positivo para o polo negativo, colocou-se a membrana de nitrocelulose, o gel e mais uma camada de papel filtro pré-umedecida. A corrente foi fixada de acordo com a área do gel, sendo calculada da seguinte forma: corrente aplicada (mA) = área (cm²) x 0,85. A transferência foi realizada em 1 hora.

Após a transferência, a membrana foi tratada por dez minutos com tampão fosfato salina (PBS) contendo 5% de leite desnatado liofilizado e incubada por dezoito horas a temperatura ambiente com 50mL de anticorpo diluído em PBS contendo 5% de leite desnatado. Após a incubação com anticorpo foram realizadas cinco lavagens com PBS 5% de leite. A seguir, a membrana foi incubada por uma hora com 50 mL de uma solução PBS 5% de leite desnatado contendo 200.000 cpm/mL de proteína A marcada com ¹²⁵I. Ao final dessa incubação, a membrana foi lavada com PBS contendo 0,01% de Tween 20 por

pelo menos seis vezes. Na seqüência, a membrana foi seca a temperatura ambiente e envolvida por membrana transparente de PVC, estando assim pronta para a autorradiografia. A exposição autorradiográfica, utilizando telas intensificadoras, foi realizada a -80°C , por um período de tempo dependente da intensidade da resposta desejada, que por sua vez depende da atividade específica da proteína A marcada com ^{125}I , da afinidade, do título do anticorpo e da riqueza do produto a ser analisado.

3.2.6 Determinação da eficiência de expressão

A determinação da eficiência de expressão e, portanto, do funcionamento do conjunto promotor-peptídeo sinalizador-cepa, foi realizada com base em metodologia de HPLC de fase reversa, padronizada em nosso laboratório para o hGH (Dalmora *et al.*, 1997). Esta metodologia apresenta a vantagem de realizar diretamente no líquido periplásmico, determinações quantitativa e qualitativa mais exatas e informativas que as técnicas convencionais de SDS-PAGE e Western Blotting.

3.2.7 Padronização das condições de crescimento

É fundamental escolher o tempo e as condições ideais de ativação, a fim de obter a máxima síntese e secreção de hGH, combinada com a mínima presença de formas alteradas.

Com o objetivo de padronizar as condições de crescimento, foi utilizada a cepa de *E. coli* RR1 como célula hospedeira para transformação e propagação dos plasmídeos.

O cultivo foi realizado em erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio LB ou de um outro meio mais rico em nutrientes denominado 2x-HKSII (Dalmora *et al.*, 1997; De Oliveira *et al.*, 1999). Foram adicionados 100 μg de ampicilina/mL de meio. As cepas de *E. coli* transformadas foram incubadas em placas com LB/Ágar no dia anterior ao ensaio. Foi inoculada uma colônia por frasco, seguida por incubação com agitação rotacional a 30°C , possivelmente sem expressão de hGH que, sendo uma proteína estranha à fisiologia da *E. coli*, dificultaria seu crescimento. De acordo com a medida da densidade óptica, realizada periodicamente, os frascos eram mantidos a 30°C ou induzidos por incremento de temperatura. Nesta segunda etapa, chamada de ativação, o

aumento da temperatura deve levar à expressão máxima da proteína recombinante.

3.2.7.1 Duração do período de ativação

A cepa *E. coli* RR1 foi transformada com o vetor de referência, inoculada em meio LB e incubada com agitação a 30°C. Quando a densidade óptica (DO) atingiu 1,5, a temperatura foi aumentada para 42°C, iniciando a ativação. Após 0, 2, 4, 6, 7 e 8 horas, as amostras foram coletadas e o hormônio extraído por choque osmótico foi conservado a 4°C. Para quantificar o hGH presente no líquido periplásmico, foram injetados 100µL de amostra, previamente centrifugada, em HPLC de fase reversa isocrática com coluna Vydac C4. Efetuou-se a determinação das proteínas relacionadas ao rec-hGH, integrando-se a área respectiva em relação ao Padrão Internacional de hGH recombinante (WHO 98/574), empregando o programa Class-VP, fornecido pela Shimadzu.

3.2.7.2 Estágio de indução

O objetivo desse estudo é avaliar o efeito da fase de início da indução (ou ativação) na expressão do hGH. Para isso, a indução provocada pelo aumento de temperatura foi realizada em diferentes fases do crescimento. O parâmetro de avaliação escolhido foi a densidade óptica (A_{600}).

A cepa RR1 contendo o vetor de referência λ P_L-SPhGH-AMP[®] foi inoculada em meio LB, incubando com agitação rotacional a 30°C. Quando a densidade óptica (A_{600}) atingiu 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 a temperatura foi aumentada para 42°C, ocorrendo a ativação do promotor. Após 6 horas de ativação, o hormônio foi extraído por choque osmótico e analisado em HPLC de fase reversa.

3.2.7.3 Temperatura de ativação

A cepa contendo o vetor de referência foi inoculada em meio LB, incubando com agitação rotacional a 30°C. Quando a densidade óptica (A_{600}) atingiu 1,5 foram separadas frações para indução por aumento de temperatura. Foram estudadas temperaturas entre 30 e 45°C. Após 6 horas de ativação, o hormônio foi extraído por choque osmótico e analisado em HPLC de fase reversa.

3.2.7.4 Comparação entre diferentes meios

O nível de expressão de hGH usando o vetor de referência foi analisado comparando-se o cultivo em meio Luria Bertani (LB) ou em um meio mais rico, 2x-HKSII, descrito por Jensen & Carlsen (1990), o mesmo meio usado nos estudos do biorreator (De Oliveira *et al.*, 1999). Nos dois meios foram acrescentados 100 µg de ampicilina/mL. Em cada frasco foi inoculada uma colônia de *E.coli*, incubando com agitação rotacional a 30°C. Após atingir diferentes valores de densidades ópticas, o meio foi mantido a 30°C ou induzido por incremento de temperatura.

3.2.8 Estudo comparativo dos peptídeos sinalizadores

Os quatro vetores: SPhGH-hGH, npr2K5L-hGH, DsbA-hGH, STII-hGH, diferenciados apenas pelo peptídeo sinalizador, foram inicialmente introduzidos na cepa RR1. O nível de expressão de hGH em cada construção foi analisado em comparação com o vetor de referência. As cepas contendo os vetores acima mencionados foram inoculadas em meio LB, incubando com agitação rotacional a 30°C. Quando a densidade óptica (A_{600}) atingiu 1,5, a temperatura foi aumentada para 42°C ocorrendo a ativação do promotor. Após 6 horas de ativação o hormônio foi extraído por choque osmótico e analisado em HPLC de fase reversa.

3.2.9 Estudo comparativo entre cepas de *E. coli*

Diferentes cepas de *E. coli* foram transformadas com o vetor que apresentou melhor desempenho. Foi utilizada a técnica de transformação por choque térmico (Maniatis *et al.*, 1989). As cepas estudadas foram: RR1, HB2151, BMH7118, W3110, RB791 e TP2339.

4 RESULTADOS

4.1 Duração da ativação

A influência da duração da ativação na expressão do hGH é mostrada na Figura 8. A cepa *E. coli* RR1 contendo o plasmídeo de referência cresceu em meio LB a 30°C.

O nível de expressão de hGH aumentou durante a ativação, atingindo um máximo após 6 horas. Um período longo de ativação, acima de 8 horas, produziu um significativo aumento de formas alteradas e/ou baixo nível de expressão de hGH.

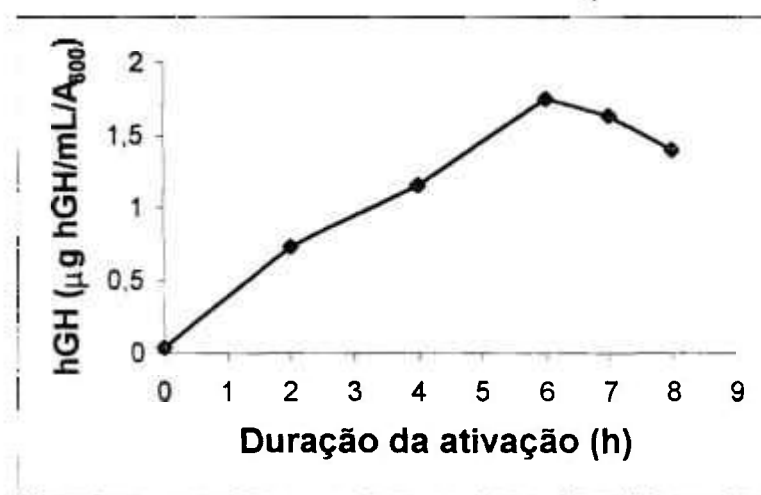


Figura 8. Nível de expressão de hGH, determinado por RP-HPLC isocrática, no líquido periplásmico obtido após choque osmótico de diferentes períodos de ativação da cepa *E. coli* RR1 transformada com o vetor de referência.

4.2 Estágio de indução

4.2.1 Início da indução

Como já mencionado no Materiais e Métodos o objetivo desse estudo é avaliar o efeito da fase da indução na expressão do hGH. A cepa contendo o vetor de referência foi incubada a 30°C em meio LB. Quando a densidade óptica atingiu 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ou 3,0 a temperatura foi aumentada para 42°C. Após 6 horas de ativação, o nível de expressão de hGH em cada estágio de indução foi avaliado, como mostrado na Figura 9. O nível de expressão aumentou progressivamente de 0,4 (ativação com $A_{600} = 0,3$) para 1,4 $\mu\text{g/mL}/A_{600}$ (ativação com $A_{600} = 1,5$), mas diminuiu significativamente acima de $A_{600} = 2,0$. No caso da ativação com menor densidade óptica, além de se obter uma baixa expressão, uma maior quantidade de formas alteradas puderam ser observadas na análise por RP-HPLC.

4.2.2 Indução em diferentes meios

As duas curvas de crescimento a 30°C apresentadas na Figura 10 ilustram a diferença de comportamento quando é usado o meio 2x-HKSII (Jensen & Carlsen, 1990), um meio mais rico do que o LB. Observamos que a densidade óptica máxima de crescimento obtida com o meio rico foi praticamente o dobro daquela obtida com o meio LB. No caso do meio 2x-HKSII a melhor condição de expressão do hGH foi obtida na ativação com $A_{600} = 3,0$, o dobro daquela utilizada com o meio LB.

4.2.3 Análise por SDS-PAGE e Western Blotting

Em experimento similar ao descrito no item 4.2.1, o choque osmótico dos diferentes estágios de indução foi analisado por SDS-PAGE e Western Blotting. Neste estudo, a cepa RR1 contendo o vetor de referência foi inoculada em meio LB e quando a densidade óptica atingiu 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0, a temperatura foi aumentada para 42°C. Após 6 horas de ativação foi avaliado o nível de expressão de hGH em cada estágio de indução. O resultado pode ser observado na Figura 11.

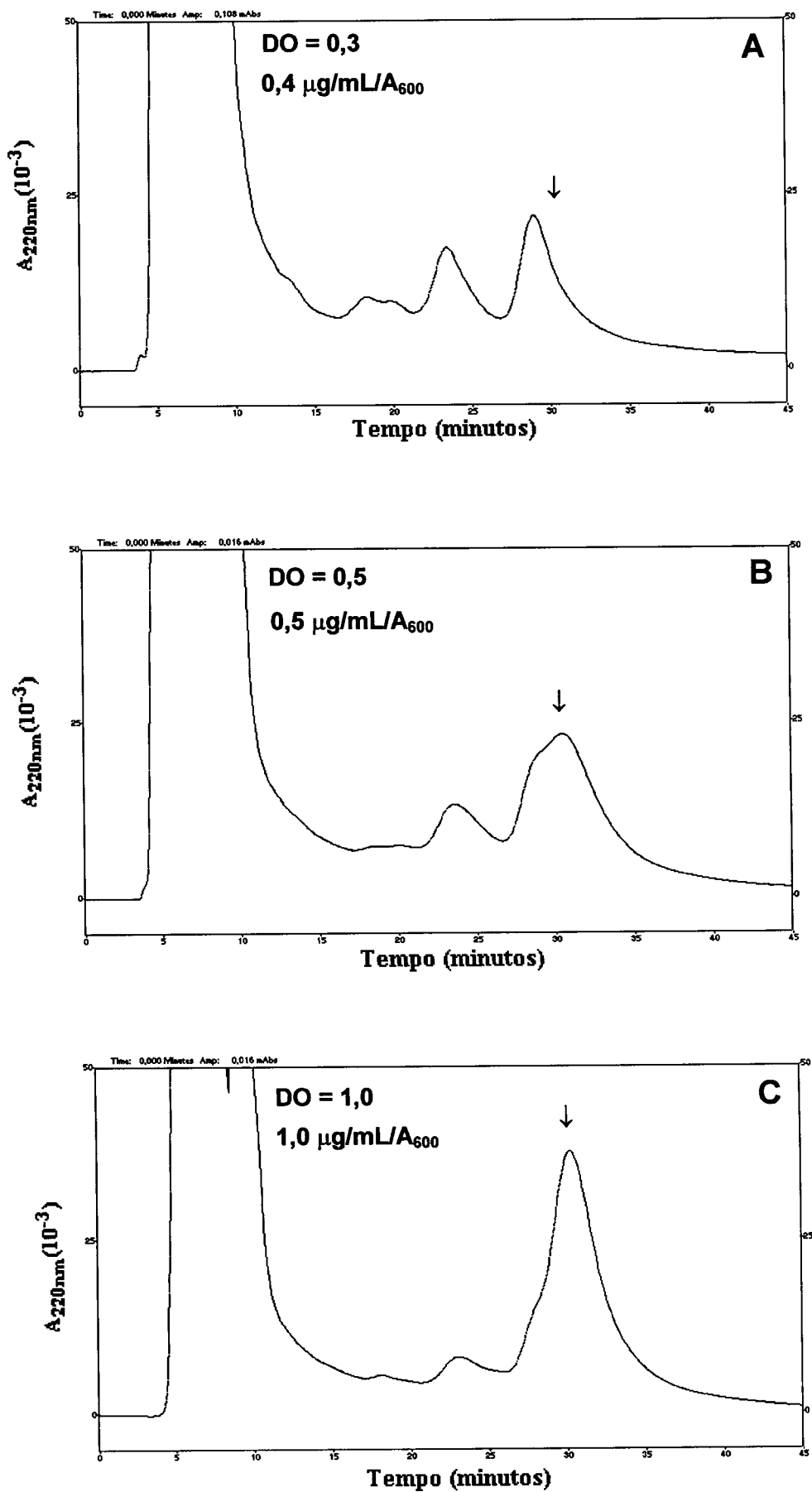


Figura 9. (Continua)

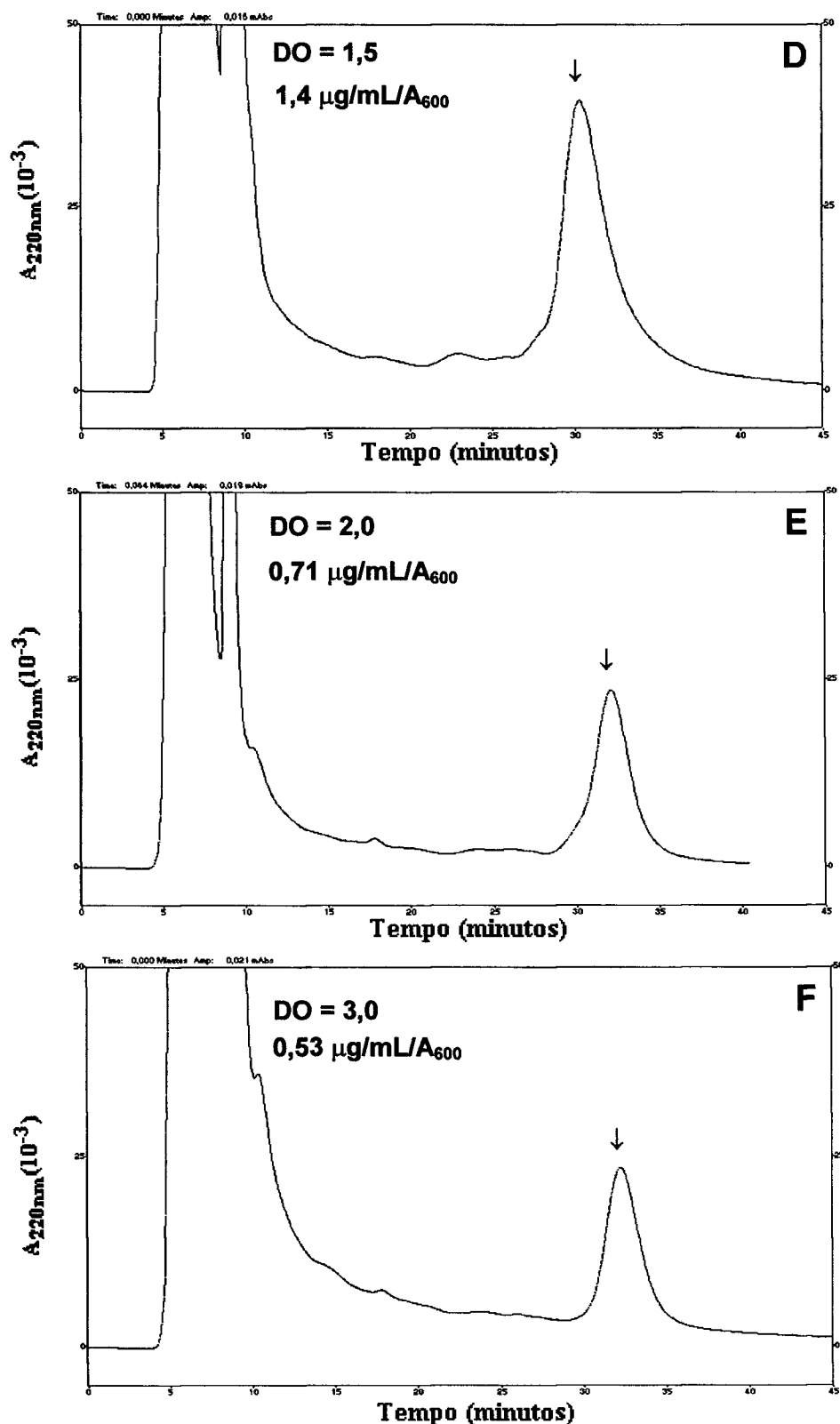


Figura 9. Análise em RP-HPLC isocrática da expressão de hGH após indução a diferentes densidades ópticas e incubação a 42°C por 6 horas. (A) ativação com $A_{600} = 0,3$. (B) ativação com $A_{600} = 0,5$. (C) ativação com $A_{600} = 1,0$. (D) ativação com $A_{600} = 1,5$. (E) ativação com $A_{600} = 2,0$. (F) ativação com $A_{600} = 3,0$. O nível de expressão celular específico está indicado em cada cromatograma. A seta indica o tempo de retenção (t_R) do Padrão Internacional de hGH, analisado no mesmo experimento.

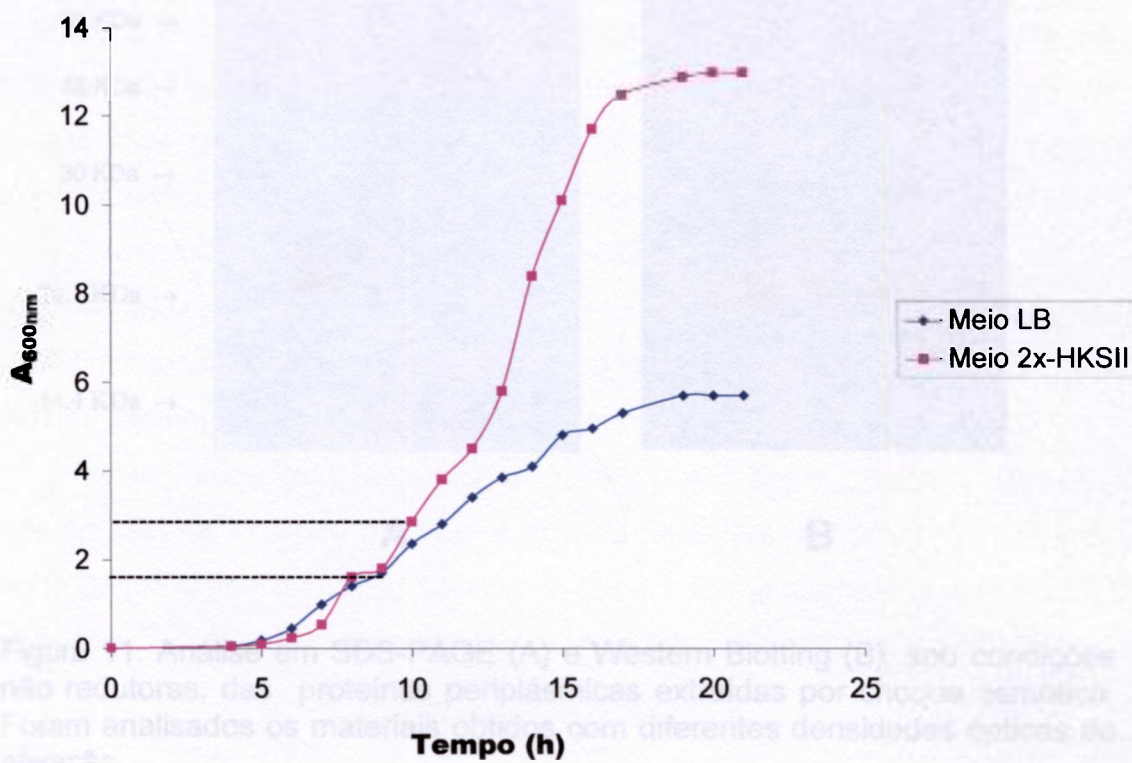


Figura 10. Curvas de crescimento, sem indução, da cepa RR1 de *E. coli* a 30°C em meio LB e meio 2x-HKSII. As linhas pontilhadas indicam a densidade óptica de indução para cada curva.

Esses resultados confirmam que a indução em meio LB com A_{600} entre 1,5 e 2,0 apresenta uma expressão máxima de hGH, com o mínimo de formas alteradas. Os dados também confirmam que a forma alterada de hGH, que apresenta uma massa molecular aproximada entre 30 e 22 kDa, surge quando a indução ocorre com A_{600} baixa ($A_{600} < 1,5$).

Um experimento mais específico elucidando essas formas alteradas, com análise por RP-HPLC é apresentado no item 4.2.4.

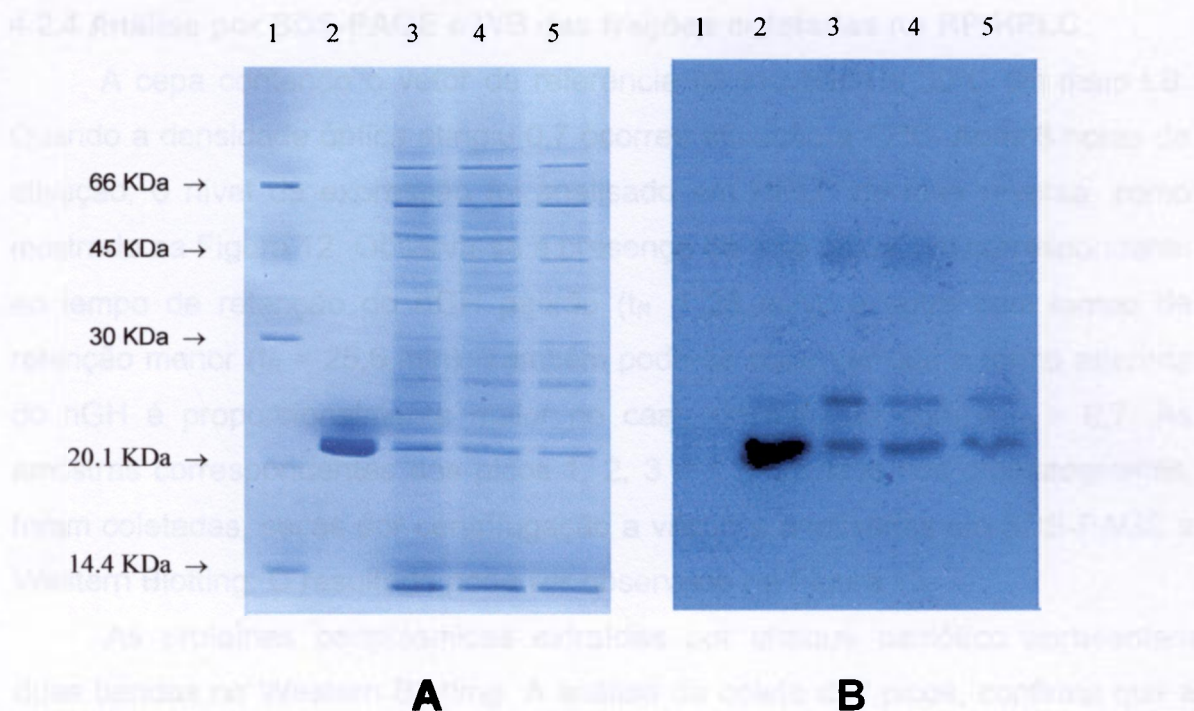


Figura 11. Análise em SDS-PAGE (A) e Western Blotting (B), sob condições não redutoras, das proteínas periplásmicas extraídas por choque osmótico. Foram analisados os materiais obtidos com diferentes densidades ópticas de ativação.

- 1- Marcador de massa molecular
- 2- Padrão Internacional de hGH (WHO 98/574)
- 3- Ativação com $A_{600} = 1,0$
- 4- Ativação com $A_{600} = 1,5$

Esses resultados confirmam que a indução, em meio LB com A_{600} entre 1,5 e 2,0 apresenta uma expressão máxima de hGH, com o mínimo de formas alteradas. Os dados também confirmam que a forma alterada de hGH, que apresenta uma massa molecular aparente entre 30 e 22 kDa, surge quando a indução ocorre com D.O. baixas ($A_{600} < 1,5$).

Um experimento mais específico estudando essas formas alteradas após análise por RP-HPLC é apresentado no item 4.2.4.

4.2.4 Análise por SDS-PAGE e WB das frações coletadas no RP-HPLC

A cepa contendo o vetor de referência foi incubada a 30°C em meio LB. Quando a densidade óptica atingiu 0,7 ocorreu ativação a 42°C. Após 6 horas de ativação, o nível de expressão foi analisado em HPLC de fase reversa, como mostrado na Figura 12. Observa-se a presença de dois picos, um correspondente ao tempo de retenção do hGH padrão ($t_R = 28$ min), e outro com tempo de retenção menor ($t_R = 25,6$ min). Também pode-se observar que a forma alterada do hGH é proporcionalmente maior no caso da indução com $A_{600} = 0,7$. As amostras correspondentes aos picos 1, 2, 3 e 4, indicados nos cromatogramas, foram coletadas, secas por centrifugação a vácuo e analisadas em SDS-PAGE e Western Blotting. O resultado pode ser observado na Figura 13.

As proteínas periplásmicas extraídas por choque osmótico apresentam duas bandas no Western Blotting. A análise da coleta dos picos, confirma que a banda de maior massa molecular corresponde à forma alterada com $t_R = 25,6$ min e a banda de menor massa molecular, $t_R = 28$ min, corresponde ao hGH.

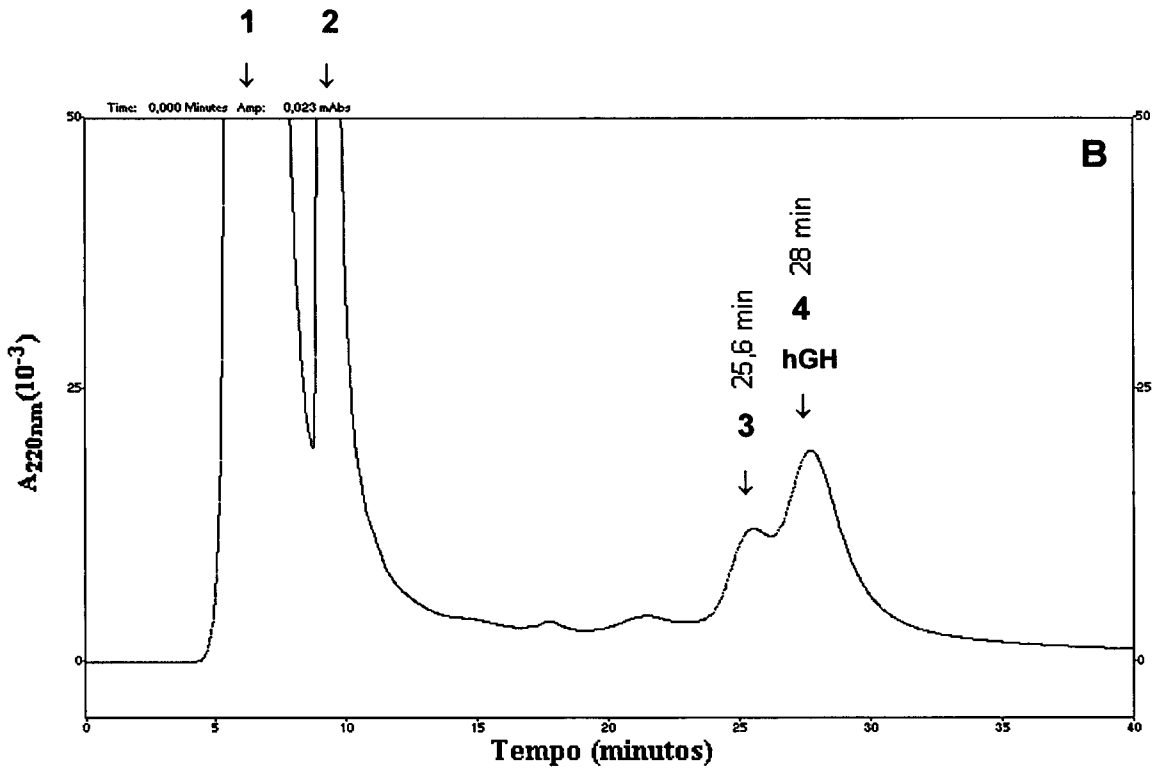


Figura 12. Análise em RP-HPLC isocrática da expressão de hGH após indução na densidade óptica 0,7 e incubação a 42°C por 6 horas. As setas indicam os picos coletados para análise em SDS-PAGE

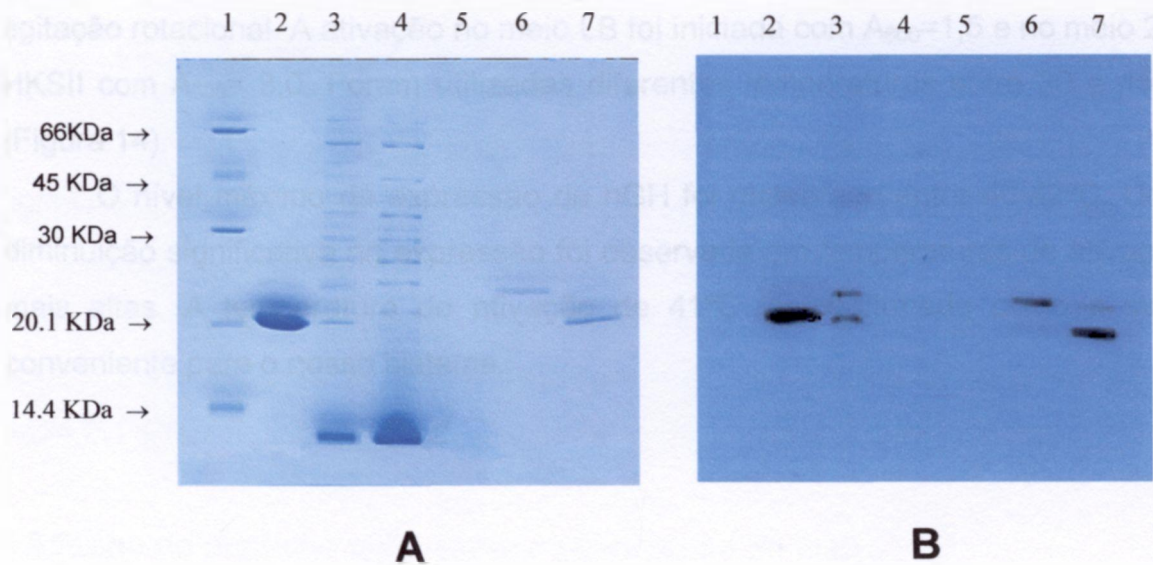


Figura 13. Análise em SDS-PAGE (A) sob condições não redutoras dos picos coletados em RP-HPLC e correspondente Western Blotting (B).

- 1- Marcador de massa molecular
- 2- Padrão Internacional de hGH (WHO 98/574)
- 3- Proteínas periplásmicas extraídas por choque osmótico - ativação com $A_{600} = 0,7$
- 4- Coleta Pico1
- 5- Coleta Pico 2
- 6- Coleta Pico 3
- 7- Coleta pico 4

4.3 Temperatura de ativação

Para se examinar o efeito da temperatura de ativação na expressão do hGH, o vetor de referência, foi incubado em meio LB ou 2x-HKSII a 30°C, com agitação rotacional. A ativação no meio LB foi iniciada com $A_{600}=1,5$ e no meio 2x-HKSII com $A_{600}= 3,0$. Foram utilizadas diferentes temperaturas entre 30 e 45°C (Figura 14).

O nível máximo de expressão de hGH foi observado entre 40-42°C. Uma diminuição significativa na expressão foi observada em temperaturas de ativação mais altas. A temperatura de ativação de 41°C foi confirmada como a mais conveniente para o nosso sistema.

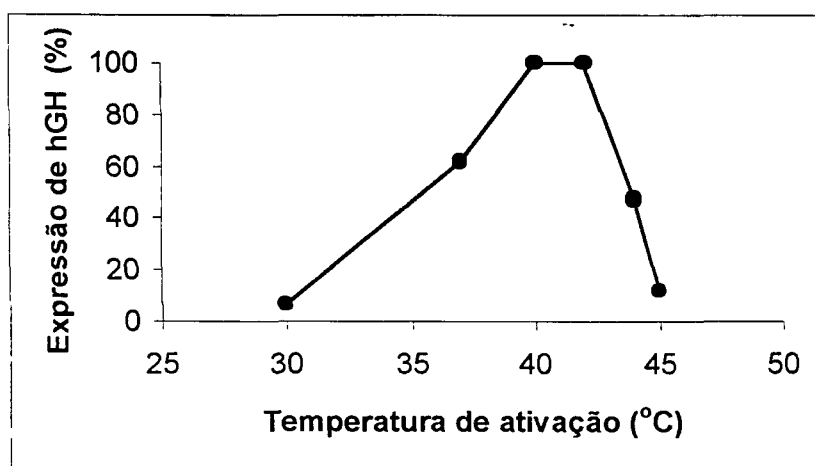


Figura 14. Nível de expressão de hGH, determinado por RP-HPLC no líquido periplásmico obtido por choque osmótico sob diferentes temperaturas de ativação. O nível de expressão do hGH está indicado em percentagem do valor máximo da expressão obtido.

4.4 Comparação entre os meios de cultura LB e 2x-HKSII

A expressão de hGH, utilizando o vetor de referência, foi analisada em meio LB e no meio 2x-HKSII, um meio mais rico utilizado em estudos de biorreatores (De Oliveira *et al.*, 1999; Jensen & Carlsen, 1990).

A quantidade de hGH produzida por bactéria foi praticamente a mesma nos dois casos. No meio LB foi obtida uma estatística inter-ensaio de $1,6 \pm 0,7$ $\mu\text{g}/\text{mL}/A_{600}$, com um coeficiente de variação (CV) de 40%, considerando um $n=14$, enquanto que com 2x-HKSII foi obtido $1,6 \pm 0,3$ $\mu\text{g}/\text{mL}/A_{600}$, CV= 22% e $n=8$. A principal diferença foi na curva de crescimento, onde a densidade óptica final após 6 horas de ativação foi praticamente o dobro no caso do meio 2x-HKSII: $A_{600}= 6,1 \pm 0,9$ contra $A_{600}= 3,5 \pm 0,7$.

4.5 Efeito do peptídeo sinalizador na expressão do hGH

Para examinar a influência do peptídeo sinalizador na secreção do hGH para o periplasma da *E. coli*, foram construídos quatro vetores utilizando diferentes seqüências sinalizadoras. Nosso vetor de referência, como mencionado, é baseado em um peptídeo sinalizador eucariótico, derivado da seqüência sinalizadora natural do gene do hGH. O segundo peptídeo sinalizador utilizado foi o DsbA, derivado de uma proteína periplásmica da *E. coli* de 21 kDa que por causa da sua origem e função, deveria fornecer uma eficiente secreção periplásmica (Martin *et al.*, 1993). O terceiro foi o npr, modificado pela inserção do peptídeo composto por 2 aminoácidos lisina (K) e 5 aminoácidos leucina (L) (npr2K5L) na porção N-terminal para aumentar a carga positiva e hidrofobicidade. Esta modificação resultou no aumento da secreção do hGH 20 kDa em *E. coli* (Uchida *et al.*, 1997). O quarto peptídeo sinalizador foi o de STII, derivado de uma proteína de *E. coli* que tem fornecido uma alta e eficiente secreção periplásmica de hGH (Chang *et al.*, 1987). A expressão de hGH obtida com os quatro diferentes peptídeos sinalizadores, usando a RR1 como célula hospedeira, é mostrada na Tabela III. Os resultados mostram que o peptídeo sinalizador mais eficiente foi o baseado no DsbA, com nível de expressão aproximadamente 80% maior daquele do vetor de referência.

Observamos também que o vetor de referência e a sua variante (SP-hGH, Figura 2) que gerou o cassete de expressão, não apresentam diferenças

significativas de expressão, confirmando que as alterações, principalmente a introdução do sítio de restrição NdeI, não prejudicaram a expressão. Essa alteração é particularmente crítica, pois foi trocado um nucleotídeo na importante região do Shine Delgarno, responsável pela ligação dos ribossomos no início da tradução.

A influência do peptídeo sinalizador, sua correta conformação e a eficiência do choque osmótico foram confirmados por análise em SDS-PAGE sob condições não redutoras (Figura 15). Esta figura mostra a clivagem correta do peptídeo sinalizador, produzindo autêntico hGH. Também foi confirmado que o DsbA é o mais eficiente peptídeo sinalizador e que praticamente todo hGH presente no espaço periplásmico foi extraído.

Tabela III. Influência dos diferentes peptídeos sinalizadores na secreção de hGH na cepa de *E. coli* RR1 em meio 2x-HKSII.

Peptídeo sinalizador	Nível de secreção de hGH ($\mu\text{g/ml/A}_{600}$)	N	Teste de significância ^b
hGH	Vetor de referência	9	---
	Cassete de expressão	9	NS
DsbA	2,8 \pm 23	21	P < 0,001
npr2K5L	2,2 \pm 27	7	P < 0,001
STII	0,5 \pm 84	3	P < 0,001

^a Coeficiente de variação (CV), expresso como porcentagem da média

^b Teste de t de Student, em comparação com o vetor de referência

4.6 Comparação entre diferentes células hospedeiras

Como as cepas de *E. coli* diferem em sua habilidade de promover a expressão de genes clonados (Kaytes *et al.*, 1986), o vetor que demonstrou ser mais eficiente, λP_L DsbA-hGH amplificado na RR1, foi utilizado também para transformar outras cepas de *E. coli*: HB2151, W3110, RB791, TP2339 e BMH7118.

Nesse estudo foi utilizado o meio 2x-HKSII, ocorrendo ativação com $A_{600} = 3,0$. Os níveis de expressão obtidos em *E. coli* W3110 e RB791 foram

significativamente mais altos que os obtidos usando o mesmo vetor na RR1 e 2.5 vezes maior quando comparado com o vetor de referência na RR1 (Tabela IV). Também é interessante observar que a W3110 não foi somente uma das cepas mais produtivas, mas também forneceu a maior fração de massa de hGH, ou atividade específica, ou seja, o hGH se apresentou mais puro.

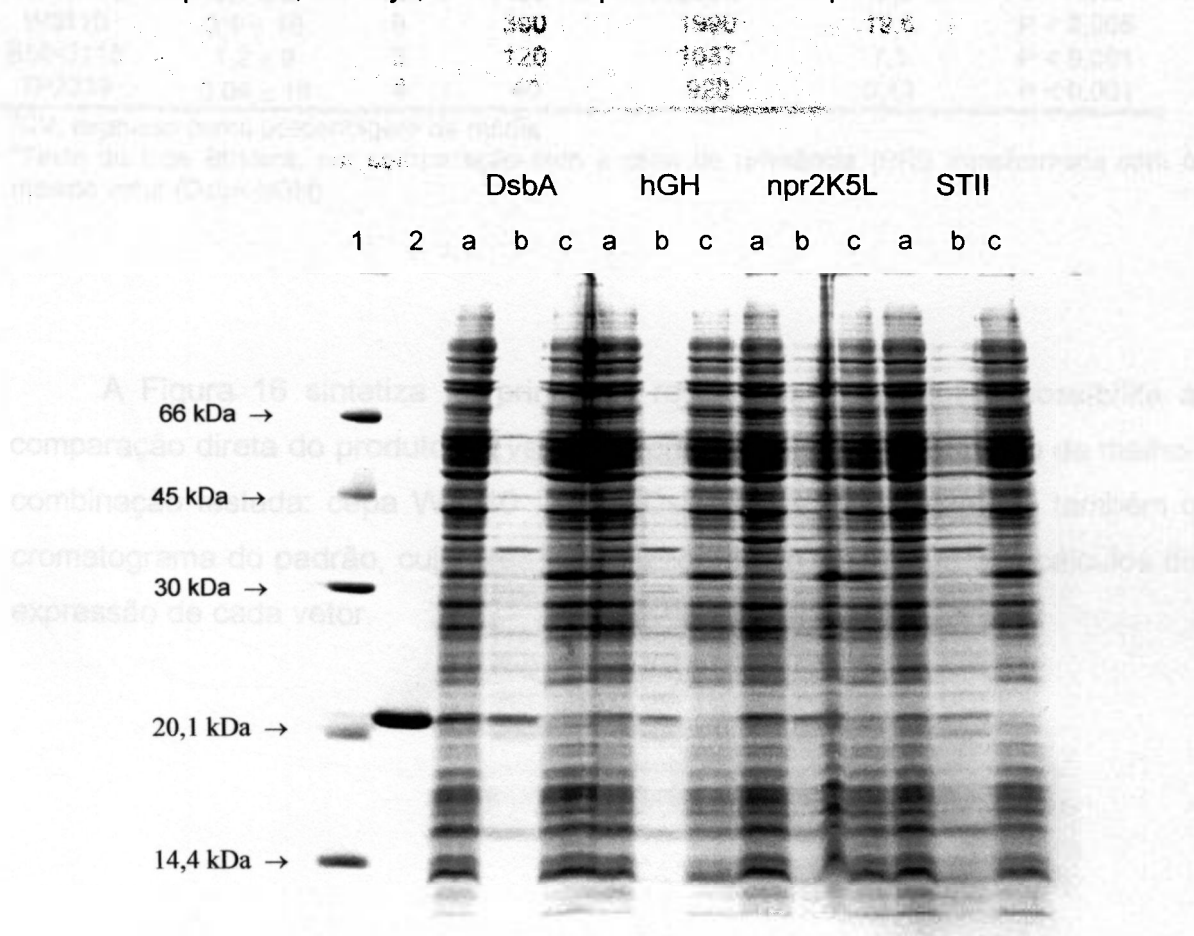


Figura 15- Análise em SDS-PAGE, sob condições não redutoras, da secreção periplásmica de hGH. Foram analisados quatro peptídeos sinalizadores: DsbA, hGH natural, npr2K5L e STII.

- 1- Marcador de massa molecular
- 2- Padrão Internacional de hGH (WHO 98/574) (5 μ g)
 - a. Proteínas derivadas do lisado celular total incubado a 41°C por 6 horas
 - b. Proteínas periplásmicas extraídas por choque osmótico
 - c. Proteínas citoplásmicas.

Tabela IV. Análise da secreção de hGH no periplasma de várias cepas hospedeiras, utilizando o vetor de expressão λP_L DsbA-hGH.

Cepa	Nível de expressão de hGH($\mu\text{g/ml}/A_{600}$)	n	hGH periplásmico total ($\mu\text{g/ml}$)	Proteína periplásmica total ($\mu\text{g/ml}$)	Fração de massa de hGH (%)	Teste de significância ^b
RR1	$2,8 \pm 23^a$	21	290	1784	16,3	---
HB2151	$1,2 \pm 32$	4	120	2107	5,7	$P < 0,001$
RB791	$3,9 \pm 8$	2	420	2587	16,2	$P < 0,05$
W3110	$3,9 \pm 16$	6	390	1990	19,6	$P < 0,005$
BMH7118	$1,2 \pm 9$	3	120	1637	7,3	$P < 0,001$
TP2339	$0,04 \pm 16$	4	40	920	0,43	$P < 0,001$

^aCV, expresso como porcentagem da média

^bTeste de t de Student, em comparação com a cepa de referência (RR1) transformada com o mesmo vetor (DsbA-hGH)

A Figura 16 sintetiza os principais resultados obtidos. Ela possibilita a comparação direta do produto do vetor de referência na cepa RR1 e o da melhor combinação testada: cepa W3110 - vetor DsbA-hGH. É apresentado também o cromatograma do padrão, cuja área foi utilizada como referência nos cálculos da expressão de cada vetor.

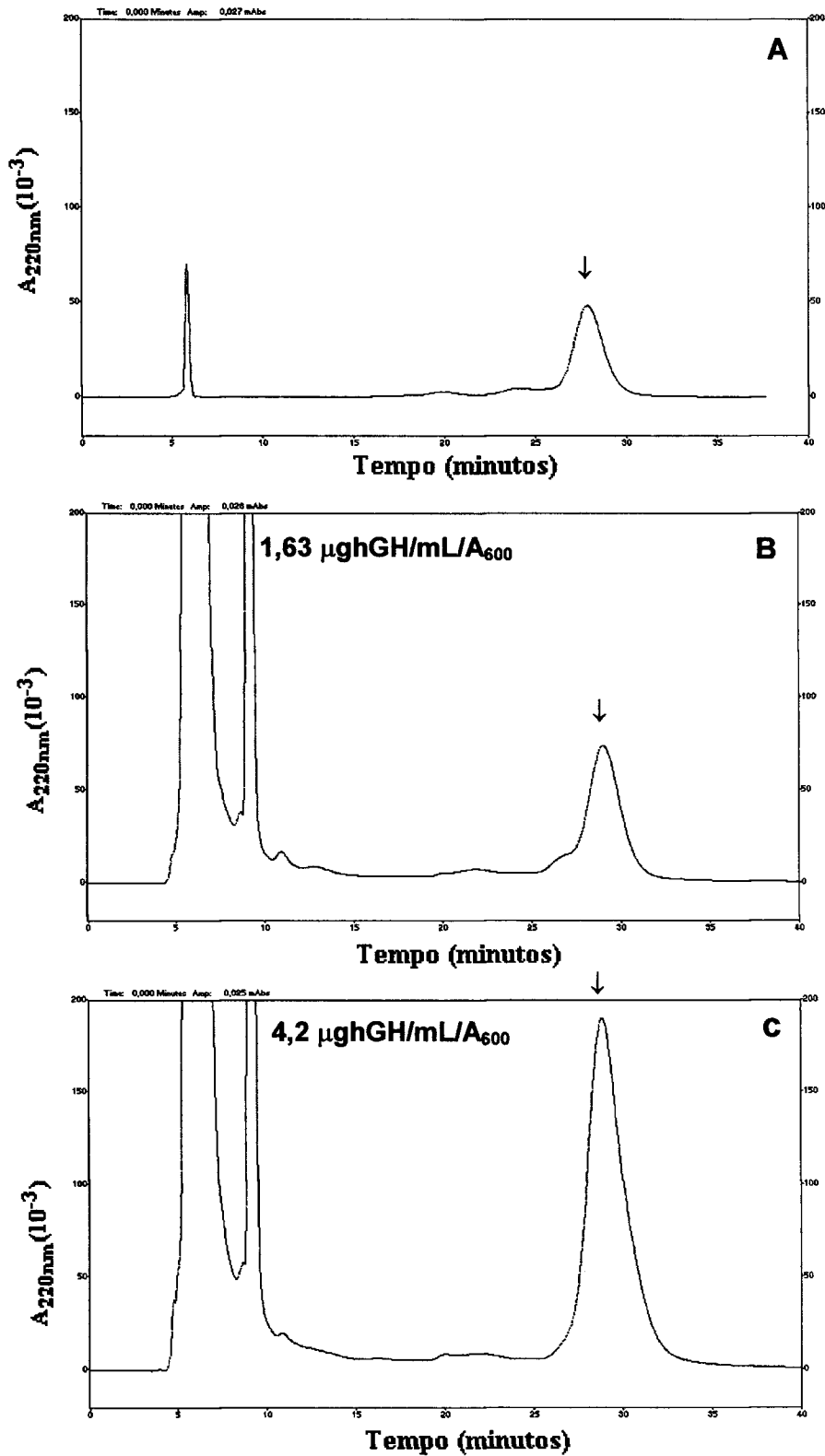


Figura 16. Análise em RP-HPLC isocrática. (A) Padrão Internacional de hGH (10 μ g). (B) Proteínas periplásmicas obtidas usando o vetor de referência na cepa RR1. (C) Proteínas periplásmicas obtidas usando o DsbA-hGH na W3110. A seta indica o tempo de retenção (t_R) do Padrão Internacional de hGH, analisado no mesmo experimento.

5 DISCUSSÃO

O maior nível de secreção periplásmica de hGH já relatado com um sistema baseado no promotor λP_L foi obtido otimizando cuidadosamente as condições de indução e expressão. Esse sistema de indução por aumento de temperatura é um dos mais utilizados para produção de proteínas em larga escala, devido a seu uso simples, seguro e econômico (Makrides, 1996). Altos níveis de expressão periplásmica (até 10-25 $\mu\text{g hGH/mL/DO}$) foram relatados por diversos autores (Becker *et al.*, 1986; Chang *et al.*, 1987; Cheah *et al.*, 1994; Uchida *et al.*, 1997) empregando os promotores Lpp-lac, phoA, trc ou npr. Nestes casos, entretanto, a quantificação do hGH foi baseada exclusivamente em imunoenensaio que, como já mencionado antes, é uma metodologia incapaz de distinguir as diferentes isoformas do hormônio, principalmente em misturas complexas. Além disso, não oferece a mesma exatidão de métodos físico-químicos, como o RP-HPLC, que permite também realizar determinações qualitativa e/ou quantitativa do hGH diretamente no líquido periplásmico (Strege & Lagu, 1995; Dalmora *et al.*, 1997; Jacobson *et al.*, 1997; De Oliveira *et al.*, 1999).

É importante enfatizar que o presente estudo foi realizado em frascos de cultura, um procedimento largamente utilizado nos laboratórios, que ao contrário do biorreator, raramente é padronizado para este propósito. Na expressão de diferentes proteínas em *E. coli*, sob o controle do promotor termicamente induzido, numerosos autores têm recomendado iniciar a ativação (estágio de indução) com DO entre 0,2 e 1,2, sem descrição do procedimento de otimização que levou a essa escolha. As mesmas considerações também podem ser aplicadas nos relatos sobre a variação da temperatura de crescimento (de 28 a 32°C) e ativação (de 36 a 45°C) e a duração do período de ativação de 1 a 4 horas (Bernard & Helinski, 1979; Crowl *et al.*, 1985; Caulcott & Rhodes, 1986; Crowl *et al.*, 1986; Breitling *et al.*, 1990; Lowman & Bina, 1990; Cheng &

Patterson, 1992; Balakrishnan *et al.*, 1994; Love *et al.*, 1996; Heim *et al.*, 1998; Hoffman *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 2003).

A duração da ativação recomendada, com base no nosso estudo, para frascos de cultura é de 6 horas, um resultado consistente com as observações de vários autores (Simons *et al.*, 1984; Lowman & Bina, 1990) e também com o relato sobre a otimização da produção em larga escala de hormônio do crescimento bovino (bGH) (Choi & Lee, 1997). O mesmo período ótimo de ativação foi obtido em nosso laboratório em um estudo anterior empregando o mesmo vetor de referência para a expressão do hGH, no qual a fermentação foi realizada em um biorreator de 20 L com alimentação contínua (feed batch) (Dalmora *et al.*, 1997).

Sob nossas condições, e em contraste com dados da literatura, o estágio de indução otimizado corresponde a $A_{600} = 1,5$ no caso do meio LB e $A_{600} = 3,0$ para o meio 2x-HKSII. Alguns autores recomendam que o início da indução deve ocorrer no começo da fase log da curva de crescimento (Choi & Lee, 1997). Analisando a Figura 10 observamos que a indução seguiu esse princípio, porém corresponde a valores bem diferentes de DO para os dois meios, e obviamente deve ser considerado em qualquer processo de otimização. No caso do meio LB, quando a ativação começou abaixo de $A_{600} = 1,0$, foi obtido um rendimento muito menor de hGH (parcialmente alterado). Foram também realizados alguns estudos procurando caracterizar melhor esse hGH alterado. Análises por RP-HPLC indicaram que a principal forma alterada mostrou uma menor hidrofobicidade, já que apresenta um menor tempo de retenção e nas análises por SDS-PAGE/WB essa forma apresentou uma migração menor que o hGH, refletindo maior massa ou tamanho molecular. No entanto, nas ativações iniciadas acima de $A_{600} = 2,0$, o nível de secreção decaiu. Uma situação similar foi observada para o meio 2x-HKSII, porém com valores mais altos de A_{600} .

Com relação à temperatura de ativação, nossos dados estão de acordo com o valor em geral recomendado pela literatura, de 42°C. Acima desta temperatura, os níveis de secreção de hGH caem drasticamente. No entanto, para garantir uma reprodutibilidade entre os ensaios, nós preferimos manter este parâmetro a 41°C com o intuito de se evitar perdas como resultado de pequenas flutuações na temperatura. No caso da PRL periplásmica (um hormônio muito mais instável que o hGH), por exemplo, a temperatura de ativação não pode

exceder 38°C para se obter boa recuperação. Bastante interessante com respeito a esse assunto é o enfoque dado por vários autores que descrevem uma ativação a 42-45°C por curto período (5-20 minutos) seguida de uma incubação por longo período a 37-41°C (Bernard & Helinsk, 1979; Caulcott & Rhodes, 1986; Balakrishnan *et al.*, 1984). Existem vários relatos, no entanto, sugerindo que temperatura de indução abaixo de 42°C pode ser mais apropriada para produção de proteínas em geral (Lowman & Bina, 1990).

O meio mais rico aparentemente não teve influência no nível de secreção de hGH por bactéria, mas afetou a produção do hormônio por unidade de volume, sendo que o meio 2x-HKSII produziu uma biomassa quase duas vezes maior que o meio LB.

Os efeitos da mudança do peptídeo sinalizador na secreção do bGH de *E. coli* foram extensivamente estudados por Klein *et al.* (1992) que não encontraram qualquer influência significativa para os seis peptídeos sinalizadores investigados. No nosso caso, ao contrário, um dos fatores que exerceram a maior influência na secreção do hGH foi o peptídeo sinalizador. A simples troca da seqüência natural do hGH para o peptídeo sinalizador modificado do npr ou DsbA forneceu aumentos estatisticamente significativos de 41 ou 79%, respectivamente. A boa performance do peptídeo sinalizador DsbA direcionando uma eficiente secreção e uma correta formação da proteína no periplasma bacteriano já tinha sido observada (Rietsch *et al.*, 1996; Hanning & Makrides, 1998; Winter *et al.*, 2000). Bastante inesperada foi a baixa performance obtida com o uso do STII, o qual junto com o promotor *phoA*, é o responsável pela maior expressão periplásmica já relatada para o hGH (Chang *et al.*, 1987).

Um aumento estatisticamente significativo da produção de hGH (~40%) também foi obtido pela troca da cepa de referência RR1 para RB791 ou W3110, mas mantendo inalterados todos os outros parâmetros, incluindo as temperaturas de crescimento e ativação. A última cepa não apenas forneceu a maior secreção de hGH em nosso estudo, mas também a maior fração de massa, atingindo 20% do total de proteínas periplásmicas, a qual pode facilitar enormemente a produção da proteína de interesse. *E. coli* W3110 tem de fato sido relatada como uma das cepas mais eficientes para expressão do hGH e secreção periplásmica (Chang *et al.*, 1987; Uchida *et al.*, 1997). Nenhum relato foi encontrado sobre a produção do hGH em RB791. No entanto, esta cepa mostrou-se capaz de produzir e secretar

β -lactamase ou fator de crescimento epidermal no periplasma (Chalmers *et al.*, 1990).

Em conclusão, nós alcançamos um aumento estatisticamente significativo de 150% na expressão/secreção periplásmica de hGH (ou seja, um rendimento celular específico de $3,9 \mu\text{g}/\text{mL}/A_{600}$) em *E. coli*, com sistema baseado no promotor λP_L , após otimização do período, estágio e temperatura de ativação, do tipo de meio de cultivo, sendo comparados quatro diferentes peptídeos sinalizadores e seis cepas bacterianas. Seguindo o exemplo de Yin e colaboradores (2003), o qual avaliou três diferentes promotores e três células hospedeiras para expressão bacteriana de colágeno em frasco de cultura e também de Choi & Lee (1997), que estudaram temperatura, estágio de indução, tempo de expressão, concentração de IPTG e tipo de célula para bGH, a nosso ver é altamente recomendável que otimizações análogas sejam realizadas sempre que proteínas heterólogas forem expressas em uma célula hospedeira para produção em larga escala.

6 CONCLUSÕES

- Esse estudo possibilitou obter o maior nível de secreção periplásmica de hGH já relatado: ~ 4,0 µg hGH/mL/A₆₀₀, 2,5 vezes maior daquele obtido com o vetor de referência na cepa RR1.
- Condições otimizadas para fermentação em frascos de cultura:
 - Início da ativação/indução: A₆₀₀ = 1,5 para o meio LB ou A₆₀₀ = 3,0 para o meio 2x-HKSII
 - Temperatura de ativação: 41°C
 - Duração da ativação: 6 horas
- O melhor peptídeo sinalizador utilizado foi o DsbA que forneceu um incremento na secreção de hGH de aproximadamente 80%.
- A cepa de *E. coli* W3110 forneceu a maior secreção de hGH, e a maior fração de massa, atingindo 20% do total de proteínas periplásmicas.
- Foi construído um cassete de expressão que poderá ser utilizado para produção de outras proteínas de interesse (Ex.: hPRL).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS B.; ADARI, H.; HANNIG, G.; LAHUE, E.; GOSSELIN, M.; MARTIN, S.; AHMED, A.; FORD, P.J.; HAYMAN, E.G.; MAKRIDES, S.C. A tightly regulated high level expression vector expression vector that utilizes a thermosensitive lac repressor: production of the human T cell receptor V beta 5.3 in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 182(1-2), p. 101-109, 1996.
- BALAKRISHNAN, R.; BOLTEN, B.; BACKMAN, K.C. A gene cassette for adapting *Escherichia coli* strains as hosts for att-Int-mediated rearrangement and P_L expression vectors. **Gene**, v. 138, p. 101-104, 1994.
- BANGHAM, D.R.; GAINES-DAS, R.E.; SCHULSTER, D. The international standard for human growth hormone for bioassay: calibration and characterization by international collaborative study. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 42, n. 3, p. 269-282, 1985.
- BAUMANN, G. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. **Endocr. Rev.**, v. 12, p. 424, 449, 1991.
- BECKER G.W.; HSIUNG, H.M. Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*- purification and characterization. **Febs Letters**, v. 201(1), p. 145-150, 1986.
- BERNARD, H.; HELINSKI, D.R. Use of the λ phage promoter P_L to promote gene expression in hybrid plasmid cloning vehicles. **Methods Enzymol.**, v. 68, p. 482-492, 1979.
- BEWLEY, T.A. Circular dichroism of pituitary hormones. **Recent Prog. Horm. Res.**, v. 35, p. 155-213, 1979.
- BREITLING, R.; SOROKIN, A.V.; BEHNKE, D. Temperature-inducible gene expression in *Bacillus subtilis* mediated by the cI857-encoded repressor of bacteriophage lambda. **Gene**, v. 93, p. 35-40, 1990.
- BRISTOW, A.F. Collaborative study for the establishment of somatropin chemical reference standard. **Pharmeuropa**, v. Bio 96-1, p. 70-79, 1996.
- BRISTOW, A.F.; GAINES-DAS, R.; JEFFCOATES, S.L.; SCHULSTER, D. The first international standard for somatropin: report of an international collaborative study. **Growth Reg.** v. 5, p. 133-141, 1995.
- BROWN, P.; GAJDUSEK, D.C.; GIBBS JR, C.J.; ASHER, D.M. Potencial epidemic of Creutzfeldt-Jakob disease from human growth hormone therapy. **New Eng. J. Med.**, v. 313, n. 12, p. 729-731, 1985.

BROWN, W.C.; CAMPBELL, J.L. A new cloning vector and expression strategy for genes encoding proteins toxic to *Escherichia coli*. **Gene**, v. 127, p. 99-103, 1993.

CAULCOTT, C.A.; RHODES, M. Temperature-induced synthesis of recombinant proteins. **Trends Biotechnol.**, v.4, p. 142-146, 1986.

CHALMERS, J.J.; KIM, E.; TELFORD, J.N.; WONG, E.Y.; TACON, W.C.; SHULER, M.L.; WILSON, D.B. Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56(1), p. 104-111, 1990.

CHANG, C.N.; REY, M.; BOCHNER, B.; HEYNEKER, H.; GRAY, G. High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. **Gene**, v. 55, p. 189-196, 1987.

CHEAH, K.; HARRISON, S.; KING, R.; CROCKER, L.; WELLS, J.R.E.; ROBBINS, A. Secretion of eukaryotic growth hormone in *Escherichia coli* is influenced by the sequence of the mature proteins. **Gene**, v. 138, p. 9-15, 1994.

CHENG, X.; PATTERSON, T.A. Construction and use of λP_L promoter vectors for direct cloning and high level expression of PCR amplified DNA coding sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 20(17), p. 4591-4598, 1992.

CHOI, J.W.; LEE, S.Y. Enhanced expression of bovine growth hormone gene by different culture conditions in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Lett.**, v. 19(8), p. 735-739, 1997.

CROWL, R.; SEAMANS, C.; LOMEDICA, P.; MCANDREW, S. Versatile expression vectors for high-level synthesis of cloned gene products in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 38, p. 31-38, 1985.

CROWL, R. Expression of human interferon genes in *E. coli* with the lambda P_L promoter. **Methods Enzymol.**, v. 119, p. 376-383, 1986.

DALBOGE H.; DAHL, H.H.M.; PEDERSEN, J. HANSEN, J.W. CHRISTENSEN, T. A novel enzymatic method for production of authentic hGH from an *Escherichia coli* produced hGH precursor. **Biotechnol.**, v. 5(2), p. 161-164, 1987

DALMORA, S.; DE OLIVEIRA, J.E.; AFFONSO, R.; GIMBO, E.; RIBELA, M.T.C.P.; BARTOLINI, P. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. **J. Chromatogr. A**, v. 782(2), p. 199-210, 1997

DE OLIVEIRA, J.E.; SOARES, C.R.J.; PERONI, C.N.; GIMBO, E.; CAMARGO, I.M.C.; MORGANTI, L.; BELLINI, M.H.; AFFONSO, R.; ARKATEN, R.R.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. High yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in *Escherichia coli* periplasmic space. **J. Chromatogr. A**, v. 852(2), p. 441-450, 1999.

DOHERT, A.J.; CONNOLY, B.A.; WORRALL, A.F. Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. **Gene**, v. 136, p. 337-340, 1994.

EUROPEAN Pharmacopoeia, 3 ed. Strasbourg: Council of Europe, 1997.

FARMACOPÉIA Brasileira, 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

FEDERIC, M. The quality of biotechnology products. **Biologicals**, v. 22, p. 151-159, 1994.

FISHER, H.F. A limiting law relating the size and shape of protein molecules to their composition. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 51, p. 1285-1291, 1964.

FRYKLUND, L.M.; BIERICH, J.R.; RANKE, M.B. Recombinant human growth hormone. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 15, p. 511-535, 1986.

GELLERFORS, P.; EKETORP, G.; FHÖLENHAG, K.; PAVLU, B.; JOHANSSON, S.; FRYKLUND, L. Characterisation of a secreted form of recombinant derived human growth hormone, expressed in *Escherichia coli* cells. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 7, n. 2, p. 173-183, 1989.

GEORGIU, G.; VALAX, P. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 7(2), p. 190-197, 1996.

GESUNDHEIT, N., ALEXANDER, J.K. Endocrine therapy with recombinant hormones and growth factors. In: Weintraub, B. D. (ED.) **Molecular endocrinology: basic concepts and clinical correlations**. New York: Raven Press, 1995, p. 491-507.

GOEDDEL, 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 *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. **Nature**, v. 281(5732), p. 544-548, 1979.

GOLD, L. Expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Methods Enzimol.** V. 185, p. 11-14, 1990.

GRAY, G.L.; BALDRIDGE, J.S.; McKEOWN, K.S.; HEYNEKER, H.L.; CHANG, C.N. Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in *Escherichia coli*: natural and bacterial signal sequences are interchangeable. **Gene**, v. 39, p. 247-254, 1985.

GRAY, G.L.; McKEOWN, K.A.; JONES, A.J.S., SEEBURG, P.H.; HEYNEKER, H.L. *Pseudomonas aeruginosa* secretes and correctly processes human growth hormone. **Biotechnol.**, v. 2, p. 161-165, 1984.

- HANNING, G.; MAKRIDES, S.C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Focus**, v. 16, p. 54-60, 1998.
- HAYAKAWA, T.; NIIMI, S.; UCHIDA, E. Control of therapeutic recombinant human growth hormone. **Pharmeuropa**, v. 3, p. 33-40, 1991.
- HEIM, J.; SCHMIDT-DANNERT, C.; ATOMI, H.; SCHMID, R.D. Functional expression of a mammalian acetylcholinesterase in *Pichia pastoris*: comparison to acetylcholinesterase, expressed and reconstituted from *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1396, p. 306-319, 1998.
- HODGSON, J. Expression systems: a user's guide. **Biotechnol.**, v. 11, p. 887-893, 1993.
- HOFFMANN, F.; ARÍS, A.; CARBONELL, X.; ROHDE, M.; CORCHERO, J.L.; RINAS, U.; VILLAVERDE, A. Heat- inactivation of plasmid-encoded CI857 repressor induces gene expression from Ind^{r} lambda prophage in recombinant *Escherichia coli*. **Microbiol. Lett.**, v. 177, p. 327-334, 1999.
- HORAUD, F.; LUBINIECKI, A.S.; ROBERTSON, J.S. IABS International meeting on genetic stability and recombinant product consistency. **Biologicals**, v. 22, p. 77-81, 1994.
- HSIUNG, H.M; CANTRELL, A.; LUIRINK, J.; OUDEGA, B.; VEROS, A.J.; BECKER, G.W. Use of bacteriocin release protein in *Escherichia coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. **Biotechnol.**, v. 7, p. 267-271, 1989.
- HSIUNG, H.M; MAYNE, N. G.; BECKER, G.W. High-level expression, efficient secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. **Biotechnol.**, v.4, p. 991-995, 1986.
- IKEHARA, M.; OHTSUKA, E.; TOKUNAGA, T.; TANIYAMA, Y.; IWAI, S.; KITANO, K.; MIYAMOTO, S.; OHGI, T.; SAKURAGAWA, Y.; FUJIYAMA, K.; IKARI, T.; KOBAYASHI, M.; MIYAKE, T.; SHIBAHARA, S.; ONO, A.; UEDA, T.; TANAKA, T.; BABA, H.; MIKI, T.; SAKURAI, A.; OISHI, T.; CHISAKA, O.; MATSUBARA, K. Synthesis of a gene for human growth hormone and its expression in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA- Biol. Sci.**, v. 81(19), p. 5956-5960, 1984.
- JACOBSON, F.S.; HANSON, J.T.; WONG, P.Y.; MULKERRIN M.; DEVENEY, J.; REILLY, J.; WONG, S.C. Role of high-performance liquid chromatographic protein analysis in developing fermentation processes for recombinant human growth hormone, relaxin, antibody fragments and lymphotoxin. **J. Chromatogr. A**, v. 763(1-2), p. 31-48, 1997.
- JEFFCOATE, S.L. New biotechnologies: challenges for the regulatory authorities. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 44, n. 1, p. 191-194, 1992.

JENSEN, E.B.; CARLSEN, S.; Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. ***Biotechnol. and Bioeng.***, v.36(1), p. 1-11, 1990.

JONES, A.J.S.; O'CONNOR, J.V. Chemical characterization of methionyl human growth hormone. In: Gueriguian, J.L., Bransome, E.D., Outschoorn, A. S. (Ed.) ***Hormone drugs, proceedings of the FDA-USP workshop on drug and reference standards for insulina, somatropins and thyroid-axis hormones.*** Rockville: U.S. Pharmacopeial Convention, 1982, p. 335-351.

JORGENSEN, T.K.; BAGGER, L.H.; CHRISTIANSEN, J.; JOHNSEN, G.H.; FAARBAEK, J.R.; JORGENSEN, L.; WELINDER, B.S. Quantifying biosynthetic human growth hormone in *Escherichia coli* with capillary electrophoresis under hydrophobic conditions. ***J. Chromatogr. A***, v. 817(1-2), p. 205-214, 1998

KAYTES, P.S.; THERIAULT N.Y.; POORMAN, R.A.; MURAKAMI, K.; TOMICH, C.S.C. High level expression of human renin in *Escherichia coli*. ***J. Biotechnol.***, v. 4(4), p. 205-218, 1986.

KARLSSON, G.; GELLERFORS, P.; PERSSON, A.; NOREN, B.; EDLUND, P.A.; SANDBERG, C.; BIRNBAUM, S. Separation of oxidized and deamidated human growth hormone variants by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography. ***J. Chromatogr. A***, v. 855(1), p. 147-155, 1999.

KATO, C.; KOBASHI, T.; KUDO, T.; FURUSATO, T. Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*. ***Gene***, v. 54, p. 197-201, 1987.

KLEIN, B.K.K.; POLAZZI, J.O.; DEVINE, C.S.; RANGWALA, S.H.; OLINS, P.O. Effects of signal peptide changes on the secretion of bovine somatotropin (bST) from *Escherichia coli*. ***Protein Engineering***, v. 5(6), p. 511-517, 1992.

KOSHLAND, D.; BOTSTEIN, D. Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. ***Cell***, v. 20(3), p. 749-760, 1980.

LEFORT, S.; FERRARA, P. Hydrophobic adsorbants for the isolation and purification of biosynthetic human growth hormone from crude fermentation mixtures. ***J. Chromatogr.***, v. 361, p. 209-216, 1986.

LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.P.; TUTWILER, G.F.; SIGEL, M.B.; VANDERLAAN, E.F. VANDERLAAN, W.P. Human growth hormone: a complex of proteins. ***Recent Prog. Horm. Res.***, v. 36, p. 477-508, 1980.

LI, C.H. Properties of and structural investigations on growth hormone isolated from bovine, monkey and human pituitary glands. ***Fed. Proc.***, v. 16, p. 775-783, 1957.

LI, C.H.; PAPKOFF, H. Preparation and properties of growth hormone from human and monkey pituitary glands. ***Science***, v. 124, p. 1293-1294, 1956.

LIBERMAN, B.; CUKIERT, A. **Fisiologia e fisiopatologia do Hormônio de Crescimento**. Lemos editorial, São Paulo, SP, 2004.

LOVE, C.A.; LILLEY, P.E.; DIXON, N.E. Stable high-copy-number bacteriophage λ promoter in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 176, p. 49-53, 1996.

LOWMAN, H.B.; BINA, M. Temperature-mediated regulation and downstream inducible selection for controlling gene expression from the bacteriophage λ P_L promoter. **Gene**, v. 96, p. 133-136, 1990.

LUPKER, J.H.; ROSKAM, W.G. MILOUS, B.; LIAUZUN, P.; YANIV, M.; JOUANNAU, J. Abundant excretion of human growth hormone by recombinant-plasmid-transformed monkey kidney cells. **Gene**, v. 24, p. 281-287, 1983.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

McNEMEY, T.M.; WATSON, S.K.; SIM, J.H.; BRIDENBAUGH, R.L. Separation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli* cell pellet extract by capillary zone electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v. 744(1-2), p. 223-229, 1996.

MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiol. Rev.**, v. 60(3), p. 512-538, 1996.

MARINO, M.H. Expression systems for heterologous protein production. **BioPharm**, v. 2, p. 18-33, 1989.

MARTIN, J.L.; BARDWELL, J.C.A.; KURIYAN, J. Crystal structure of the DsbA protein required for disulfide bond formation in vivo. **Nature**, v. 365(6445), p. 464, 468, 1993.

MIOZZARI, G.F. Strategies for obtaining expression of peptide hormones in *E. coli*. In: Gueriguian, J.L. (Ed.) **Insulins, growth hormone and recombinant DNA technology**. New York: Raven Press, 1981, p. 13-31.

MIRE-SLUIJS, A.R.; GERRARD, T.; DAS, R.G.; PADILHA, A.; THORPE, R. Biological assays: their role in the development and quality control of recombinant biological medicinal products. **Biologicals**, v. 24, p. 351-362, 1996.

MUKHIJA, R.; RUPA, P.; PILLAI, D.; GARG, L.C. High-level production and one-step purification of biologically active growth hormone in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 165(2), p. 303-306, 1995.

MURBY, M.; UHLEN, M.; STAHL, S. Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.**, v. 7(2), p. 129-136, 1996.

NEU, H.C.; HEPPEL, L.A. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. **J. Biol. Chem.**, v. 240, p. 3685-3692, 1965.

NICAUD, J.M.; MACKMAN, N.; HOLLAND I.B. Current status of secretion of foreign proteins by microorganisms. *J. Biotechnol.*, v. 3, p. 255-270, 1986.

NOSSAL, N.G.; HEPPEL, L.A. The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. *J. Biol. Chem.*, v. 241, p. 3055-3062, 1966.

NOVOTNY, J.; GANJU, R.K.; SMILEY, S.T.; HUSSEY, R.E.; LUTHER, M.A.; RECHNY, M.A.; SILICIANO, R.F.; REINHERZ, E.L. A soluble, single-chain T-cell receptor fragment endowed with antigen-combining properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 8646-8650, 1991

OLINS, P.O.; LEE, S.C. Recent advances in heterologous gene expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 4, p. 520-525, 1993.

PATRA, A.K.; MUKHOPADHYAY, R.; MUKHIJA, R.; KRISHNAN, A.; PANDA A.K. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein expr. purif.*, v. 18(2), p. 182-192, 2000.

PICKEN, R.N.; MAZAITIS, A.J.; MAAS, W.K.; REY, M.; HEYNEKER, H. Nucleotide sequence of the gene for heat stable enterotoxin-II of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, v.42(1), p. 269-275, 1983.

PUGSLEY, A.P.; FRANCETIC, O.; POSSOT, O.M.; SAUVONNET, N.; HARDIE, K.R. Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in gram-negative bacteria - A review. *Gene*, v. 192(1), p. 13-19, 1997.

PRINZ, W.A.; ASLUND, F.; HOLMGREN, A.; BECKWITH, J. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Biol. Chem.*, v. 272(25), p. 15661-15667, 1997.

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*, v. 159(1-2), p. 269-274, 1993.

RIBELA, M.T.C.P.; CAMARGO, I.M.C.; OLIVEIRA, J.E.; BARTOLINI, P. Single step purification of recombinant human growth hormone (hGH) directly from bacterial osmotic shock fluids, for the purpose of I-125-hGH preparation. *Protein expr. purif.*, v. 18(2), p. 115-120, 2000.

RIBELA, M.T.C.P.; GOUT, P.W.; BARTOLINI, P. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. *J. Chromatogr. B*, v. 790, p. 269-274, 2003.

RIETSCH, A.; BELIN, D.; MARTIN, N.; BECKWITH, J. An *in vivo* pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 93, p. 13048-13053, 1996.

RIGGIN, R.M.; DORULLA, G.K.; MINER, D.J. A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for characterization of biosynthetic human growth hormone. **Anal. Biochem.**, v. 167, p. 199-209, 1987.

RIGGIN, R.M.; SHAAR, C.J.; DORULLA, G.K.; LEFEBER, D.S.; MINER, D.J. High-performance size-exclusion chromatographic determination of the potency of biosynthetic human growth hormone products. **J. Chromatogr.**, v. 435, p. 307-318, 1988.

ROOS, P.; FEVOLD, H.R.; GEMZELL, C.A. Preparation of human growth hormone by gel filtration. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 74, p. 525-531, 1963.

ROSWALL, E.C.; MUKKU, V.R.; CHEN, A.B. HOFF, E.H.; CHU, H.; MCKAY, P.A.; OLSON, K.C.; BATTERSBY, J.E.; GEHANT, R.L.; MEUNIER, A.; GARNICK, R.L. Novel assays based on human growth hormone receptor as alternatives to the rat weight gain bioassay for recombinant human growth hormone. **Biologicals**, v. 24, p. 25-39, 1996.

SANDKVIST, M.; BAGDASARIAN, M. Secretion of recombinant proteins by gram-negative bacteria. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 7(5), p. 505, 511, 1996.

SHATZMAN, A.R. Expression systems. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 6, p. 491-493.

SHIN, N.; KIM, D.; SHIN, C.; HONG, M.; LEE, J.; SHIN, H. High-level production of human growth hormone in *Escherichia coli* by a simple recombinant process. **J. Biotechnol.**, v. 62, p. 143-151, 1998.

SIMONS, G.; REMAUT, E.; ALLET, B.; DEVOS, R.; FIERS, W. High-level expression of human interferon gamma in *Escherichia coli* under control of the PL promoter of bacteriophage lambda. **Gene**, v.28, p. 55-64, 1984.

SOARES, C.R.J.; CAMARGO, I.M.C.; MORGANTI, L.; GIMBO, E.; DE OLIVEIRA, J.E.; LEGOUX, R.; FERRARA, P.; BARTOLINI, P. Reversed phase high performance liquid chromatography method for the determination of prolactin in bacterial extracts and in its purified form. **J. Chromatogr. A**, v. 955(2), p. 229-236, 2002

STREGE, M.A.; LAGU, A.L. Analysis of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli* fermentation broth by micellar high-performance liquid-chromatography, **J. Chromatogr. A**, v. 705(1), p. 155-161, 1995

STROBL, J.S.; THOMAS, M. J. Human growth hormone. **Pharmacol. Rev.**, v. 46, n. 1, p. 1-34, 1994.

SUTER-CRAZZOLARA, C. UNSICKER, K. Improved expression of the toxic proteins in *E. coli*. **Biotechniques**, v. 19, p. 202-204, 1995.

- TESHIMA, G.; CANOVA-DAVIS, E. Separation of oxidized human growth hormone variants by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Effect of mobile phase pH and organic modifier. **J. Chromatogr.**, v. 625, p. 207-215, 1992.
- THOMAS, J.A. Recent developments and perspectives of biotechnology-derived products. **Toxicology**, v. 105, p. 7-22, 1995.
- TRITOS, N.A.; MANTZOROS C.S. Recombinant human growth hormone: old and novel uses. **American Journal of Medicine**, v. 105(1), p. 44-57, 1998.
- TRUDEL, P.; PROVOST, S.; MASSIE, B.; CHARTRAND, P.; WALL, L. pGATA: a positive selection vector based on the toxicity of the transcription factor GATA-1 to bacteria. **Biotechniques**, v. 20, p. 684-693, 1996.
- UCHIDA, H.; NAITO, N.; ASADA, N.; WADA, M.; IKEDA, M.; KOBAYASHI, H.; ASANAGI, M.; MORI, K.; FUJITA, Y.; KONDA, K.; KUSUHARA, N.; KAMIOKA, T.; NAKASHIMA, K.; HONJO, M.; Secretion of authentic 20 kDa human growth hormone (20kDa hGH) in *Escherichia coli* and properties of the purified product. **J. Biotechnol.**, v. 55(2), p. 101-112, 1997.
- UEDA, E.K.M.; GOUT, P.W.; MORGANTI, L. Ni(II)-based immobilized metal ion affinity chromatography of recombinant human prolactin from periplasmic *Escherichia coli*. **J. Chromatogr. A**, v. 922(1-2), p. 165-175, 2001.
- WEIGENT, D.A. Immunoregulatory properties of growth hormone and prolactin. **Pharmacol. Ther.**, v. 69, n.3, p. 237-257, 1996.
- WICAR, S.; MULKERRIN, M.G.; BATHORY, G.; KHUNDKAR, L.H.; KARGER, B.L. Conformational changes in the reversed phase liquid chromatography of recombinant human growth hormone as a function of organic solvent: the molten globule state. **Anal. Chem.**, v. 66, p. 3908-3915, 1994.
- WINTER, J.; NEUBAUER, P.; GLOCKSHUBER, R.; RUDOLPH, R. Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of *Escherichia coli* by fusion to DsbA. **J. Biotechnol.**, v. 84, p. 175-185, 2000.
- WÜLFING, C.; PLÜCKTHUN, A. A versatile and highly repressible *Escherichia coli* expression system based in invertible promoters: expression of a gene encoding a toxic product. **Gene**, v. 136, p. 199-203, 1993.
- WÜLFING, C.; PLÜCKTHUN, A. Correctly folded T cell receptor fragments in the periplasm of *Escherichia coli* - influence of folding catalysts. **J. Mol. Biol.**, v. 242(5), p. 655-669, 1994.
- YIN, J.; LIN, J.; LI, W.; WANG, D.I.C. Evaluation of different promoters and host strains for the high-level expression of collagen-like polymer in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, v. 100, p. 181-191, 2003.