

EXPRESSÃO DO ANTAGONISTA DE RECEPTOR DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO G120R-hGH NO ESPAÇO PERIPLÁSMICO DE *Escherichia coli* E SUA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Ana C. S. C. Menezes¹, Miriam F. Suzuki¹, João E. Oliveira¹, Maria T. C. P. Ribela¹, Isadora C. Furigo², José Donato Jr.², Paolo Bartolini¹, Carlos R. J. Soares¹

¹ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN - CNEN/SP

² Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo – ICB/USP

E-mail para contato: crsoares@ipen.br

RESUMO

A síntese do antagonista do receptor do hormônio de crescimento humano (G120R-hGH) foi realizada pela primeira vez no espaço periplásmico de *Escherichia coli* apresentando a vantagem da expressão da forma autêntica (sem metionina inicial) e com enovelamento correto (sem necessidade de etapas adicionais de refolding). O nosso interesse nos antagonistas de receptores para hormônios lactogênicos está relacionado ao uso potencial destes antagonistas no tratamento da diabetes mellitus 2 e na obesidade, em comparação com a bromocriptina, uma droga inibidora da síntese da hPRL no sistema nervoso central. A síntese no espaço periplásmico bacteriano do antagonista G120R-hGH foi obtida utilizando-se um vetor com o promotor lambda PL. A produção utilizando a cepa W3110 apresentou um rendimento de $1,34 \pm 0,24 \mu\text{g/mL/A600}$ a 37°C. A purificação em escala laboratorial foi realizada utilizando-se três etapas cromatográficas: uma de troca aniônica (Q Sepharose Fast Flow) e duas de exclusão molecular (Sephacryl S100 e HPSEC) com rendimento total de 32%. O produto obtido foi caracterizado por SDS-PAGE, Western Blotting, RP-HPLC e HPSEC mostrando uma pureza da ordem de 99%.

1. INTRODUÇÃO

O hormônio do crescimento humano (hGH) é uma proteína sintetizada pela hipófise humana e apresenta 191 aminoácidos e 22 kDa. Pertence à família das citocinas, ligando-se a receptores de hGH e também a receptores de prolactina humana (hPRL), formando um complexo: um ligante, dois receptores. A descoberta de um antagonista de receptor de GH resultou em uma droga denominada pegvisomant (Somavert[®]) que já foi aprovada para uso em pacientes com acromegalia

(Fuh et al., 1992). A mutação principal é a troca do aminoácido glicina na posição 120 pela lisina (hGH-G120K), responsável principal pelo seu efeito antagônico. Essa troca de aminoácido levou a alteração na conformação da molécula, permitindo a ligação com o sítio 1 do receptor de hGH e impedindo a ligação ao sítio 2, por inativar espacialmente o sítio 2 de ligação (Kopchick et al., 2014).

Várias evidências científicas tem demonstrado que o excesso de prolactina aumenta a prevalência de obesidade e Diabetes Mellitus tipo 2 (T2DM), ao passo que a supressão na secreção de prolactina tem impacto positivo sobre a homeostase glicêmica e o balanço energético (Landgraf et al., 1977). Notavelmente, alguns antagonistas do receptor de prolactina já foram sintetizados por meio de substituições pontuais de aminoácidos na cadeia proteica da prolactina (Soares et al., 2006). Porém, até então, esses antagonistas nunca foram estudados no contexto do tratamento do T2DM e da obesidade.

Considerando que o hGH também possui ação lactogênica similar a aquela da hPRL, compartilhando a mesma via de sinalização, optamos por sintetizar o antagonista de G120R-hGH, já relatado na literatura (Fuh et al., 1992), e que também é antagonista de hPRL.

O G120R-hGH foi sintetizado primeiramente em células L de camundongos (Chen et al., 1991). Posteriormente foi produzido em células CHO adaptadas ao cultivo em suspensão em meio de cultura livre de soro (Haldanikar et al., 1999). A expressão no citoplasma de *E. coli* (cepa Rosetta) na forma de corpos de inclusão, utilizando IPTG para ativação e ureia para o refolding foi relatada por Langenheim et al. (2006).

No presente trabalho descrevemos a síntese do antagonista G120R-hGH de forma inédita no espaço periplásmico bacteriano para utilização futura em modelos animais de obesidade e diabetes. A produção no espaço periplásmico apresenta a vantagem de produzir uma proteína autêntica, ou seja, sem a metionina inicial que é clivada junto com o peptídeo sinalizador no transporte do citoplasma para o periplasma. Foi realizada sua produção e purificação em escala laboratorial, assim como, sua caracterização físico-química.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para sintetizar o G120R-hGH no periplasma de *E. coli*, seguimos basicamente os mesmos procedimentos utilizados para sintetizar o hGH (Soares et al., 2003). O peptídeo sinalizador original do hGH de 26 aminoácidos foi substituído pela sequência do DsbA – dissulfeto oxirredutase bacteriano e o códon da glicina 120 foi substituído pelo códon da arginina. O DNA contendo os sítios das enzimas de restrição NdeI e BamHI, peptídeo sinalizador DsbA e o gene do G120R-hGH foi sintetizado pela Genscript. O gene foi introduzido no cassete de expressão que contém o promotor λ PL e o gene para resistência à ampicilina utilizando-se a enzima T4 DNA ligase. Após a transformação por choque térmico das bactérias DH5 α com o produto da ligação vetor e inserto, as colônias foram selecionadas quanto à presença do gene G120R-hGH por reação de PCR. Após confirmação do correto sequenciamento, foi feita a amplificação do plasmídeo e transformação por choque térmico das bactérias *E. coli* cepas W3110 e RRI.

Recentemente passamos a utilizar o promotor λ PL constitutivo, portanto, sem a utilização do repressor termo lábil clts, pois essa estratégia tem apresentado ótimos resultados, principalmente na expressão de proteínas sensíveis à temperatura (Soares et al., 2008). O cultivo foi realizado em frascos erlenmeyer com capacidade para 250 mL e volume de trabalho de 100 mL de meio LB, inoculando-se uma única colônia a partir de uma placa de seleção. O crescimento foi realizado a 30°C até uma densidade óptica máxima e a elevação da temperatura para expressão da proteína para 32°C, 35°C, 37°C e 42°C por 6 horas. Após este período, as bactérias foram centrifugadas e submetidas ao choque osmótico para extração do fluido periplásmico. Os melhores clones foram selecionados avaliando-se a expressão por cromatografia líquida de alto desempenho em fase reversa (RP-HPLC) (Dalmora et al., 2007) utilizando-se como padrão o rec-hGH da Organização Mundial da Saúde (OMS).

O extrato periplásmico obtido por choque osmótico com a proteína de interesse foi purificada utilizando técnica de cromatografia líquida de troca iônica e exclusão molecular (Oliveira et al., 1999). Como uma primeira etapa de purificação utilizou-se uma troca aniônica forte (resina Q Sepharose Fast Flow em coluna de vidro de 16 x 125 mm) com gradiente linear de 0 – 1 M de NaCl em tampão de acetato de amônio 0,01 M, pH 7,0, fluxo 300 mL/h. A segunda etapa de purificação foi uma cromatografia de exclusão molecular (resina Sephacryl S100 em coluna de vidro de 26 x 100 mm) isocrática com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,9, fluxo 60 mL/h, ambas em sistema ÄKTA (GE Health Sciences). Em uma terceira etapa, uma nova cromatografia de exclusão molecular foi realizada em um sistema de HPLC utilizando uma coluna de aço inoxidável TSK G2000 SW (60 cm x 7,5 mm I.D., com tamanho das partículas de 10 μ m e tamanho dos poros de 125 Å) (TosoHaas, Montgomeryville, PA, EUA) acoplada a uma pré-coluna TSK SW de 7,5 cm x 7,5 mm I.D. Foi utilizado como fase móvel bicarbonato de amônio 0,025 M, pH 7,0, fluxo de 1 mL/min, em temperatura ambiente e a leitura realizada em comprimento de onda de 220 nm.

A caracterização físico-química foi feita por SDS-PAGE, Western Blotting e cromatografia líquida de alta resolução de fase reversa e de exclusão molecular (RP-HPLC e HPSEC). Para caracterizar o antagonista e a sua pureza foram realizados SDS-PAGE em gel de acrilamida 12% não reduzido e corados com Comassie Blue G. Para o Western Blotting, foi utilizado anticorpo primário anti-hGH produzido em coelho (1:1000) e anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra (1:10000). A revelação foi feita por quimioluminescência e a membrana foi exposta ao filme de raios-X. RP-HPLC e HPSEC também foram utilizados para confirmar a pureza após cada etapa de purificação. Na RP-HPLC foi utilizado o sistema de HPLC da marca Shimadzu Modelo SCL-10 A, acoplado a um detector de UV SPD-10 AV (Shimadzu, MD, EUA), usando o software Class VP. A coluna C4 Vydac 214TP54 (25 cm x 4,6 mm ID, diâmetro dos poros de 300 Å e diâmetro das partículas de 5 μ m) acoplada ao sistema de detecção foi utilizada com a fase móvel constituída de tampão Tris-HCl 71% (50 mM, pH 7,5) e n-propanol 29%. O fluxo foi de 0,5 mL/min, com leitura no comprimento de onda de 220 nm. A temperatura da coluna foi mantida a 45°C. Para as análises em HPSEC foram utilizadas as mesmas condições descritas no processo de purificação.

3. RESULTADOS

O estudo de expressão realizado em diferentes temperaturas (30°C a 42°C) e em diferentes cepas (W3110 e RRI) mostrou a maior expressão na temperatura de 37°C ($1,60 \pm 0,26 \mu\text{g/mL/A}_{600}$; $n = 4$) (Figura 1). A média de três produções de G120R-hGH foi de $1,34 \pm 0,24 \mu\text{g/mL/A}_{600}$ (em 1 L de meio LB com ampicilina, a 37°C).

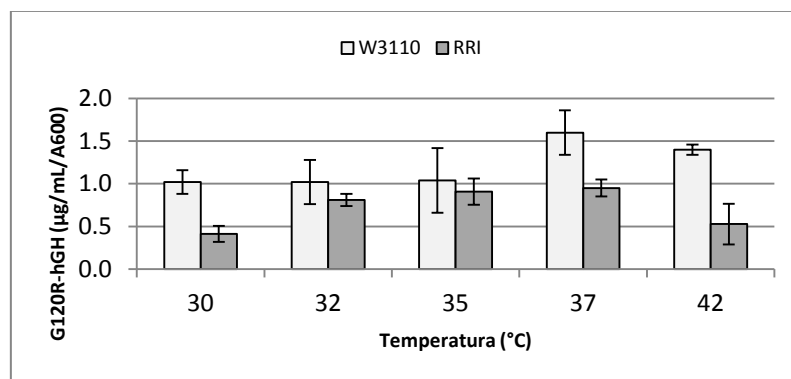


Figura 1. Comparação da produção de G120R-hGH ($\mu\text{g/mL/A}_{600}$) no periplasma de *E. coli*, cepas W3110 e RRI, em diferentes temperaturas. Quantificação por RP-HPLC, média e desvio-padrão ($n = 4$)

A primeira etapa de purificação por cromatografia de troca iônica mostrou-se eficiente para concentrar o produto (figura 2A). Após análise em SDS-PAGE, foi feito um pool dos tubos coletados na primeira etapa e foi conduzida uma segunda etapa de purificação para a eliminação de proteínas de maior massa molecular. Ao final da segunda etapa de purificação em coluna cromatográfica de exclusão molecular (Figura 2B) e análise das amostras coletadas em SDS-PAGE, foi feito um novo pool e aplicado em HPSEC preparativa (Figura 2C).

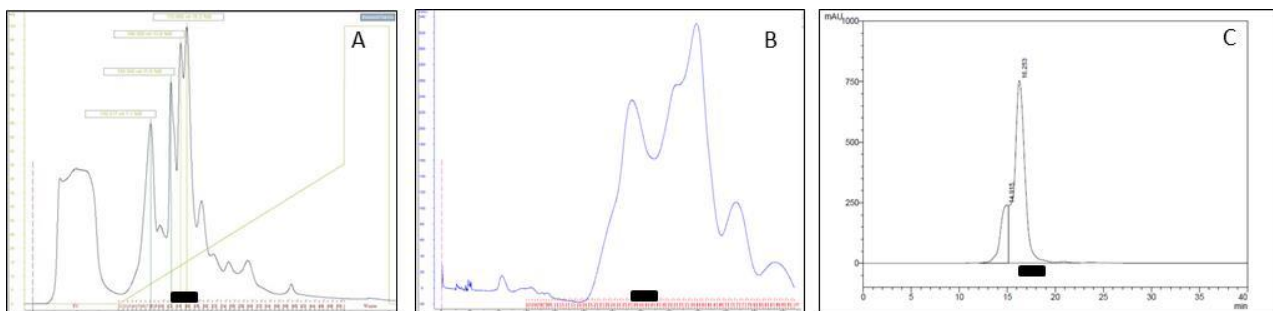


Figura 2. Cromatogramas das diferentes etapas de purificação do fluido periplásmico: Cromatografia de troca iônica (A); Cromatografia de exclusão molecular (B); HPSEC (C). A barra indica as frações que continham o G120R-hGH

As diferentes etapas de purificação apresentaram rendimentos superiores a 65% sendo o rendimento final do processo de purificação de 32% (Tabela 1). Nas figuras 3A e 3B podemos observar que as amostras de cada etapa de purificação em SDS-PAGE apresentaram diminuição das

formas de alta massa molecular e o Western Blotting demonstra a presença da proteína e o reconhecimento pelo anticorpo. O produto final analisado por RP-HPLC apresentou 3% de formas oxidadas e desamidadas (Figura 3C) e na análise por HPSEC um grau de pureza de 99% (Figura 3D).

Tabela 1. Rendimento (%) de G120R-hGH nas diferentes etapas de purificação

	Volume (mL)	Concentração (µg/mL)	G120R-hGH (mg)	Rendimento (%)
Fluido periplásmico	128	135,9	17,4	-----
Q Sepharose FF	50	227,6	11,4	65,5
Sephacryl S100	55	144,5	7,9	69,3
HPSEC	220	25,3	5,6	70,9

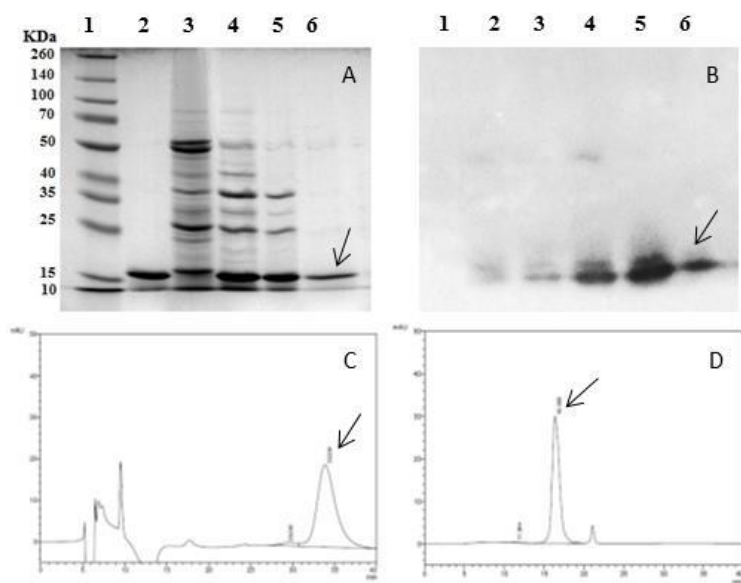


Figura 3. Caracterização físico-química da G120R-hGH: SDS-PAGE (A) e Western Blotting (B) de amostras das diferentes etapas de purificação: 1 – marcador de massa molecular, 2 – rec-hGH (OMS), 3 – fluido periplásmico, 4 – amostra coletada na Q Sepharose Fast Flow, 5 – amostra coletada na Sephacryl S100, 6 – amostra coletada na HPSEC; Cromatograma em RP-HPLC (C) e HPSEC (D) do produto final

Em conclusão, pela primeira vez foi obtida no espaço periplásmico a expressão do antagonista de hGH. Foi padronizada também a sua purificação que gerou um produto final com 99% de pureza, com 32% de rendimento após três etapas cromatográficas. Com o processo de produção laboratorial desenvolvido foram obtidos 5 mg do antagonista a partir de 3 L de meio de cultura LB. Esse produto foi utilizado para a caracterização físico-química e servirá para futuros ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*.

4. REFERÊNCIAS

- Chen, W.Y., White, M.E., Wagner, T.E., Kopchick, J.J. 1991. Functional antagonism between endogenous mouse growth hormone (GH) and a GH analog results in dwarf transgenic mice. *Endocrinology*, 129, 1402-8.
- Dalmora, S., Oliveira, J.E., Affonso, R., Gimbo, E., Ribela, M.T.C.P., Bartolini, P. 1997. Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. *J Chromatogr A*, 782, 199-210.
- Fuh, G., Cunningham, B.C., Fukunaga, R., Nagata, S., Goeddel, D.V., Wells, J.A. 1992. Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. *Science*, 256, 1677-80.
- Haldankar, R., Kopchick, J.J., Ridgway, D. 1999. Stable production of a human growth hormone antagonist from CHO cells adapted to serum-free suspension culture. *Biotechnol Prog*, 15, 336-46.
- Kopchick, J.J., List, E.O., Kelder, B., Gosney, E.S., Berryman, D.E. 2014. Evaluation of growth hormone (GH) action in mice: discovery of GH receptor antagonists and clinical indications. *Mol Cell Endocrinol*, 386, 34-45.
- Landgraf, R., Landraf-Leurs, M.M., Weissmann, A., Horl, R., Von Werder, K., Scriba, P.C. 1977. Prolactin: a diabetogenic hormone. *Diabetologia*, 13, 99-104.
- Langenheim, J.F., Tan, D., Walker, A.M., Chen, W.Y. 2006. Two wrongs can make a right: dimers of prolactin and growth hormone receptor antagonists behave as agonists. *Mol Endocrinol*, 20, 661-74.
- Oliveira, J.E., Soares, C.R., Peroni, C.N., Gimbo, E., Camargo, I.M., Morganti, L., Bellini, M.H., Affonso, R., Arkaten, R.R., Bartolini, P., Ribela, M.T.C.P. 1999. High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in *Escherichia coli* periplasmic space. *J Chromatogr A*, 852, 441-50.
- Soares, C.R., Glezer, A., Okazaki, K., Ueda, E.K., Heller, S.R., Walker, A.M., Goffin, V., Bartolini, P. 2006. Physico-chemical and biological characterizations of two human prolactin analogs exhibiting controversial bioactivity, synthesized in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Protein Expr Purif*, 48, 182-94.
- Soares, C.R., Gomide, F.I., Ueda, E.K., Bartolini, P. 2003. Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the lambda PL promoter: use of HPLC for product quantification. *Protein Eng*, 16, 1131-8.
- Soares, C.R., Ueda, E.K., Oliveira, T.L., Gomide, F.I., Heller, S.R., Bartolini, P. 2008. Distinct human prolactin (hPRL) and growth hormone (hGH) behavior under bacteriophage lambda PL promoter control: temperature plays a major role in protein yields. *J Biotechnol*, 133, 27-35.