

Expressão e caracterização da tireotrofina humana (hTSH) recombinante em células CHO cultivadas em suspensão

Amanda Luiza Silva e Carlos Roberto Jorge Soares
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

O grupo de pesquisa dos Hormônios Hipofisários do Centro de Biotecnologia (CEBIO) do IPEN, possui uma valiosa experiência na expressão e caracterização de hormônios hipofisários em células de mamíferos, tais como: células de ovário de Hamster Chinês (CHO) e células de rim de embrião humano (HEK293) [1-3]. A tireotrofina humana (hTSH) é um hormônio heterodimérico, formado por duas subunidades (α e β) não covalentemente ligadas. O hTSH promove um papel fundamental na regulação da atividade metabólica das células da tireoide (captação do iodo), bem como no crescimento da glândula e síntese e secreção dos hormônios tireoidianos (Triiodonina-T3 e Tetraiodonina-T4) [4].

OBJETIVO

Expressão e caracterização do hTSH produzido em células CHO cultivadas em suspensão.

METODOLOGIA

Os plasmídeos contendo as subunidades α ou β do hTSH, foram previamente construídos no nosso laboratório utilizando o vetor pcDNA 3.4 TOPO[®]. Para realizar a transfecção transiente foi utilizada uma solução contendo 12 μ g de cada plasmídeo e 74 μ L de agente transfectante ExpiFectamine[™] para transfectar $1,5 \times 10^8$ células ExpiCHO-S[™], em 24 mL de meio ExpiCHO[™] Expression Medium, em um erlenmeyer de 125 mL. No decorrer de 16 horas da transfecção, foram adicionados

150 μ L de *enhancer* e 6 mL de *Feed*. A cultura foi mantida por 8 dias, em incubadora a 37 °C, com 8% de CO₂ e sob agitação orbital de 120 rpm. Foram coletadas alíquotas de todos os dias da produção. As alíquotas foram armazenadas a -40°C para posterior caracterização. Foram realizadas análises por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) em condição não-reduzida e reduzida; e análise em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC). O hTSH expresso em células ExpiCHO[™] foi comparado com o hTSH produzido por células Expi293F[™] e o produto comercial também derivado de células CHO (Thyrogen[®], Genzyme).

RESULTADOS

As alíquotas coletadas do meio condicionado foram analisadas em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) (**Figura 1A**), nota-se o aumento da intensidade da banda referente ao hTSH (28-30 kDa) no decorrer da produção. É possível notar também que o meio condicionado das células ExpiCHO-S[™] apresenta pouca impureza. Para confirmação da natureza heterodimérica do hTSH foi realizada uma SDS-PAGE em condições redutoras, comparando o padrão comercial Thyrogen[®], uma preparação interna de hTSH recombinante e amostras do meio condicionado do 3° dia da produção de hTSH em células Expi293F[™] e em células ExpiCHO-S[™]. Devido ao agente redutor foi possível identificar em todas as amostras a diminuição da banda referente a proteína heterodimérica e o surgimento de duas outras bandas correspondentes às

subunidades β -hTSH e α -hTSH, respectivamente (Figura 1B).

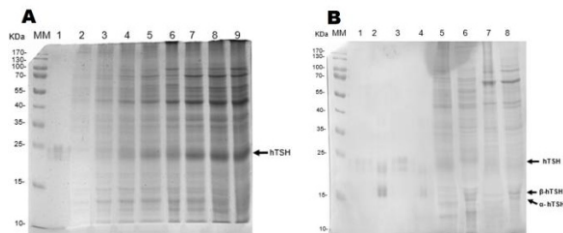


Figura 1: **A)** SDS-PAGE do meio condicionado das células ExpiCHO-STM. MM) Marcador de massa molecular; 1) padrão comercial de hTSH (Thyrogen[®], Genzyme); 2-9) alíquotas dos dias 1 a 8 após transfecção, respectivamente. **B)** SDS-PAGE em condições não redutoras e redutoras das diferentes preparações de hTSH recombinante: MM) Marcador de massa molecular; 1) padrão comercial de hTSH (Thyrogen[®], Genzyme) não reduzido; 2) padrão comercial de hTSH (Thyrogen[®], Genzyme) reduzido; 3) padrão interno hTSH-IPEN não reduzido; 4) padrão interno hTSH-IPEN reduzido; 5) meio condicionado Expi293FTM, não reduzido; 6) meio condicionado Expi293FTM, reduzido; 7) meio condicionado ExpiCHO-STM não reduzido; 8) meio condicionado ExpiCHO-SFTM, reduzido.

A fração coletada no 8^o dia de produção foi analisada em RP-HPLC. O pico de interesse possui tempo de retenção semelhante ao do hTSH referência Genzyme[®]. Os diferentes picos podem estar associados com possíveis isoformas do hTSH e, além disso, como as subunidades (α e β) são transfectadas em plasmídeos separados, é possível que tenham sido expressas isoladamente ou formando homodímeros (Figura 2).

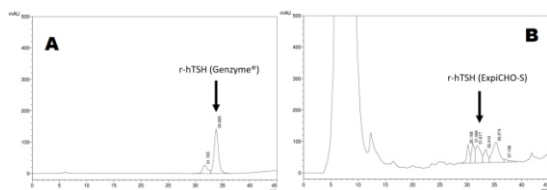


Figura 2: Cromatografia do meio condicionado do 8^o dia de produção do hTSH em células ExpiCHO-STM: **A)** referência comercial de hTSH (Thyrogen[®], Genzyme); **B)** Amostra do meio condicionado do 8^o dia.

Com base em três produções de 30 mL cada, obtivemos um valor médio de 27 μ g/mL de hTSH, aproximadamente 2,4 mg de hTSH. Vale ressaltar que foram

transfectadas o dobro de células em relação ao sistema Expi293F; e a quantidade de DNA (24 μ g) utilizada também é menor em relação à utilizada no sistema Expi293F (30 μ g).

CONCLUSÕES

A expressão transiente em células ExpiCHO-STM cultivadas em suspensão foi eficiente na expressão do hormônio hTSH. Esses são os primeiros dados relatando a expressão de hTSH em células CHO cultivadas em suspensão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] PERONI, N. C. *et al.* High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in Chinese hamster ovary cells by co-transfection of dicistronic expression vectors followed by a dual-marker amplification strategy. **Biotechnol Appl Biochem**, v.35, n. 1, p. 19-26, 2002.
- [2] RIBELA, M. *et al.* N-glycoprofiling analysis for carbohydrate composition and site-occupancy determination in a polyglycosylated protein: human thyrotropin of different origins. **International journal of molecular sciences**, v.18, n. 2, p.131. 2017.
- [3] SANT'ANA, M. *et al.* Human thyroid-stimulating hormone synthesis in human embryonic kidney cells and related N-glycoprofiling analysis for carbohydrate composition determination. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 3, p. 1215-1228, 2018.
- [4] SZKUDLINSKI, M. *et al.* Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. **Physiological reviews**, v. 82, p. 473-502, 2002.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq/PIBIC; FAPESP.