

Purificação de antagonista de prolactina expresso em bactérias *Escherichia coli*

Larissa Andrade Almeida e Carlos Roberto Jorge Soares
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

A prolactina humana (hPRL) é um hormônio polipeptídico protéico, da família das citocinas com massa molecular de 23 kDa e 199 aminoácidos. Ela é secretada pela hipófise anterior e regulada pelo hipotálamo. A expressão é aumentada principalmente durante a lactação [1]. Entre os antagonistas de prolactina, uma das mais promissoras é a delta 1-9 G129R- hPRL [2], que além da substituição da glicina na posição 129 pela arginina que impede a ligação da molécula ao segundo receptor de prolactina, teve deletado os primeiros 9 aminoácidos, anulando qualquer atividade proliferativa residual mesmo em concentrações 10 vezes maiores que a da prolactina circulante. O antagonista é importante para impedir a ligação da prolactina aos receptores presentes em alguns tecidos como o da mama e tumores em que há superexpressão destes receptores, apresentando desta forma uma ação antiproliferativa local. Entretanto, foi realizado os processos de purificação, quantificação (RP-HPLC) e caracterização (HPSEC) do delta 1-9 G129R- hPRL pelos sistemas de cromatografia.

OBJETIVO

Purificar o antagonista de prolactina Δ 1-9 G129R-hPRL produzido no espaço periplásmico de bactérias *E. coli* geneticamente modificadas.

METODOLOGIA

O antagonista Δ 1-9 G129R-hPRL secretado para o periplasma das bactérias e obtido por choque osmótico foi purificado utilizando técnicas cromatográficas em duas etapas: a primeira por afinidade a metais, com a Hisprep FF 16/10, e a segunda etapa, uma resina de gel filtração Sephacryl S100, ambas empacotadas em colunas de vidro. Estas colunas foram conectadas no equipamento ÄKTA Purifier (GE Healthcare, LC, Inglaterra).

Antes de entrar na coluna, o fluido periplásmico foi dialisado para retirada de EDTA em membrana de diálise (SnakeSkin, poro de 3,5 kDa, Thermo-Fisher Scientific) utilizando o tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0 (3 trocas de 1 L).

Na primeira etapa, as frações de 5 ml contendo o Δ 1-9 G129R-hPRL foram agrupadas e concentradas por centrifugação (Amicon[®] Ultra – 15 *Centrifugal Filters Ultracel[®] 10K* Merck, Tullagreen, CO, Irlanda), a 4 °C, a 1500 g por 20 minutos.

O material concentrado foi aplicado na coluna de cromatografia por exclusão molecular Sephacryl S100 utilizando o tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 com cloreto de sódio 0,15 M. As frações de 2 ml contendo o Δ 1-9 G129R-hPRL foram agrupadas e o produto purificado final foi analisado por RP-HPLC e HPSEC.

RESULTADOS

Na primeira etapa de purificação o $\Delta 1-9$ G129-hPRL eluiu nas frações de #54 a #62, que corresponde no gradiente de Imidazol à concentração de 83 mM no pico da Figura 1A. A segunda etapa realizada por meio de cromatografia de exclusão molecular o antagonista de prolactina foi eluído, nas frações de #28 a #38 no pico da Figura 1B.

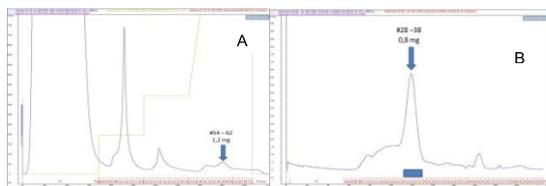


Figura 1 – (A) Cromatograma da 1ª. Etapa de purificação do $\Delta 1-9$ G129-hPRL por cromatografia de afinidade a metais. (B) Cromatograma da 2ª. Etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular. Ambos acoplados ao equipamento AKTA.

Efetuada as duas etapas de purificação foram realizadas as análises por HPLC. Na Figura 2A, observamos em RP-HPLC o pico indicado pela seta que se refere à proteína antes da purificação, cujo tempo de retenção é de 19,17 min. Na figura 2B, observamos em HPSEC o pico da proteína no tempo de retenção de 15,96 min, após a primeira etapa de purificação. Na figura 2C, a proteína depois da segunda etapa de purificação, com o tempo de retenção de 16,03 min, praticamente pura. Para quantificar a proteína a área sob o pico foi comparada ao padrão interno de prolactina. Assim, a partir de 3 litros de caldo de bactérias, na primeira etapa foi obtido 1160 μg de $\Delta 1-9$ G129R-hPRL e na segunda etapa 884 μg com 96,5 % de pureza.

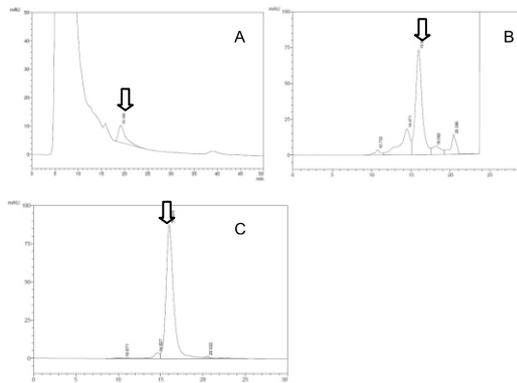


Figura 2 - Cromatogramas da análise em HPLC:(A) Análise por RP-HPLC de 100 μL de fluido periplásmico. (B) Análise por HPSEC do pool coletado da 1ª. Etapa de purificação (C) Análise por HPSEC de amostra do pool coletado da 2ª. Etapa de purificação. As setas indicam a posição da proteína $\Delta 1-9$ G129-hPRL.

CONCLUSÕES

A purificação seguindo protocolos padronizados para hPRL, IMAC e exclusão molecular, permitiram obter 800 μg de $\Delta 1-9$ G129R-hPRL com aproximadamente 96% de pureza, a partir de 3 l de caldo de bactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SINHA, Y. N. Structural variants of prolactin - occurrence and physiological significance. *Endocr Rev*, v. 16, n. 3, p. 354-369, 1995.
- [2] BERNICHTEIN, S. et al. New homologous bioassays for human lactogens show that agonism or antagonism of various analogs is a function of assay sensitivity. *Endocrine*, v. 20, n.1-2, p. 177-189, 2003.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq/ PIBIC