

# Influência da temperatura na expressão do antagonista de prolactina humana delta 1-9 G129R-hPRL recombinante em bactérias *Escherichia coli*

Stephanie Angelo Pomin e Miriam Fussae Suzuki  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

## INTRODUÇÃO

A prolactina humana (hPRL) é um hormônio proteico da família das citocinas, que possui massa molecular de 23 kDa, além de 199 aminoácidos e três pontes dissulfeto entre as cisteínas 4-11, 58-114 e 191-199 [1]. É secretada pela adenohipófise e sua principal função é estimular a produção de leite nas glândulas mamárias no período gestacional [2]. Distúrbios em sua concentração sérica estão associados ao desenvolvimento de cânceres de mama e de próstata, além de artrite reumatóide, fibrose cística, entre outros. Alguns órgãos podem produzir esse hormônio localmente, e essa produção local, quando aumentada, resulta no desencadeamento de processos patológicos anteriormente citados. A molécula  $\Delta$  1-9 G129R-hPRL tem seus 9 primeiros aminoácidos deletados, além de possuir uma arginina (R) na posição 129, no lugar de uma glicina (G), e o mesmo impede a ligação da prolactina com seu segundo receptor, e anula quaisquer atividades proliferativas residuais em concentrações de prolactina até 10 vezes maiores.

## OBJETIVO

Avaliar e comparar as melhores condições de cultivo e melhor temperatura de expressão da proteína  $\Delta$  1-9 G129R-hPRL, produzida no periplasma da bactéria *E. coli* cepa BL21(DE3) utilizando o vetor pET25b(+).

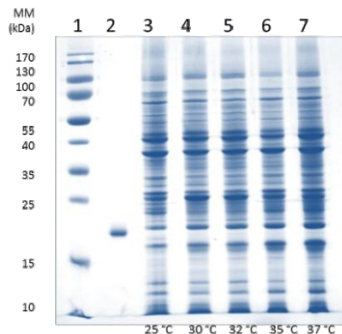
## METODOLOGIA

A produção do antagonista foi feita na cepa BL21(DE3) de bactérias *Escherichia coli*, transformadas através do método de choque térmico, com o vetor pET25b(+) contendo o cDNA da proteína  $\Delta$  1-9 G129R-hPRL e o peptídeo sinalizador DsbA para transporte para o espaço periplasmático bacteriano. O inóculo da cepa transformada foi feito em meio de cultura Luria Bertani (LB) com crescimento a 30 °C overnight, e com cinco diferentes temperaturas de expressão estudadas, respectivamente 25 °C, 30 °C, 32 °C, 35 °C e 37 °C. O IPTG foi adicionado em concentrações de 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM e 0,8 mM. A obtenção da proteína antagonista produzida em periplasma foi feita através do choque osmótico com solução de Tris-HCl sacarose 20% - pH de 7,5 (solução hipertônica), solução de EDTA 0,5 M - pH de 8,8 e tampão Tris-HCl - pH de 7,5 (solução hipotônica). Como métodos de caracterização da proteína, foi feito eletroforese em gel de poliacrilamida 15% com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), além da caracterização por *Western blotting* com a técnica de transferência semi-seca para a membrana de nitrocelulose. A cromatografia líquida de alto desempenho na fase reversa foi realizada com a utilização de uma coluna C4 Vydac 214TP54 (25 cm x 4,6 mm) com poros de diâmetro de 300 Å e partículas de diâmetro

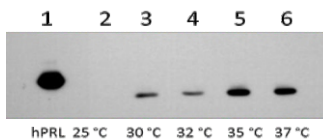
de 5 µm. O tampão utilizado foi Tris 0,05 M pH 7,5 e 28% N-propanol, fluxo de 0,5 ml/min, leitura em 220 nm, temperatura da coluna 45 °C.

## RESULTADOS.

As amostras do fluido periplásmico em diferentes temperaturas de expressão, obtidas por choque osmótico, foram analisadas em SDS-PAGE e *Western blotting* para identificar o antagonista (Figura 1 e 2). A temperatura de 35 °C foi a que apresentou banda mais intensa, e melhor resultado.



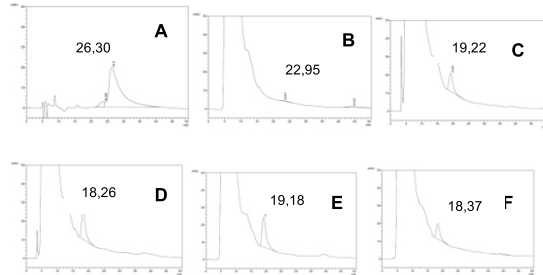
**Figura 1** – SDS-PAGE com amostras do fluido periplásmico da proteína antagonista  $\Delta$ 1-9 G129-hPRL obtidas através de diferentes temperaturas de ativação.



**Figura 2** - *Western Blotting* com amostras do fluido periplásmico da proteína antagonista  $\Delta$ 1-9 G129-hPRL obtidas através de diferentes temperaturas de ativação.

As amostras de fluido periplásmico foram analisadas em RP-HPLC. Como padrão foi aplicado 5 µg de hPRL (padrão interno, produzido em *E. coli*, purificação 40). Nas corridas seguintes, foram aplicadas 100 µL

de cada amostra, obtidas em diferentes temperaturas de ativação. Foram utilizados dois tampões, Tampão A - 71,4% Tris 0,05M pH 7,5 e Tampão B - 28,6% N-propanol (Merck) com fluxo de 0,5 mL por minuto, e a temperatura da coluna em 45 °C. O cromatograma **E** da Figura 3, referente à temperatura de 35 °C foi o que apresentou o pico de maior área.



**Figura 3.** Exemplo de análises no RP-HPLC de amostras do fluido periplásmico da proteína antagonista  $\Delta$ 1-9 G129-hPRL, em diferentes temperaturas de ativação. (A) Padrão interno de referência de hPRL 5 µg em 50 µL. (B) Amostra de fluido periplásmico obtido na temperatura de 25 °C (C) 30 °C. (D) 32 °C. (E) 35 °C. (F) 37 °C

## CONCLUSÕES

O estudo avaliou e comparou cinco temperaturas de expressão diferentes. Em suma, a temperatura de ativação de 35 °C foi a que obteve melhores resultados para expressão da proteína antagonista.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SINHA, Y. N. 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev*, 16, 354-69.
- [2] BERNICHTEIN, S., TOURAINE, P. & GOFFIN, V. 2010. New concepts in prolactin biology. *J Endocrinol*, 206, 1-11.

## APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNEN/CNPq/ PROBIC.