

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA LOPACINSKI

**PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE UM FAB ANTI-EPR E DE EPR, EGF E TGF α
PARA TESTAR A FUNCIONALIDADE DE ANTICORPOS CONTRA MEMBROS DA
FAMÍLIA DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL**

CURITIBA

2017

AMANDA LOPACINSKI

**PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE UM FAB ANTI-EPR E DE EPR, EGF E TGF α
PARA TESTAR A FUNCIONALIDADE DE ANTICORPOS CONTRA MEMBROS DA
FAMÍLIA DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL**

Monografia apresentada à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II como requisito parcial à conclusão do Curso de Bacharelado em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens

Co-orientador: Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

CURITIBA

2017

RESUMO

O câncer é atualmente um problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morte dentre a população. Dentre os diferentes tipos de neoplasias, o câncer de pulmão possui um dos maiores índices de incidência e mortalidade. Um dos mecanismos moleculares relacionados com o seu desenvolvimento decorre de mutações no receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), o qual modula vias de sinalização envolvidas com a proliferação e sobrevivência celular. Além disso, estudos demonstraram que alguns dos seus ligantes também estão envolvidos com o desenvolvimento de alguns tipos de neoplasias, dentre elas o câncer de pulmão. Um exemplo é o fator de crescimento epidermal (EGF), o principal ligante do EGFR, o fator de crescimento transformador α (TGF α) e a epiregulina (EPR). Apesar destas evidências, estudos avaliando o papel desses fatores como potenciais biomarcadores para o câncer de pulmão ainda são escassos e seu valor prognóstico, para este tipo de câncer, também permanece a ser determinado. Uma etapa fundamental para a validação desses ligantes como tal, é o aprimoramento dos métodos utilizados para a quantificação dos seus níveis sorológicos. Os métodos existentes atualmente são baseados no reconhecimento dessas proteínas através de anticorpos. Porém, devido à alta similaridade estrutural entre os ligantes dessa família de fatores de crescimento, os anticorpos disponíveis não apresentam níveis de detecção satisfatórios. Com o intuito de desenvolver anticorpos que apresentem maior seletividade entre os membros da família de fatores de crescimento epidermal, um anticorpo anti-EGF recombinante está sendo desenvolvido pelo Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas do Instituto Carlos Chagas. Para que sua seletividade e funcionalidade possam ser testadas, é necessário também o desenvolvimento do seu antígeno. O objetivo deste trabalho então foi produzir o EGF recombinante, bem como mais dois ligantes da sua família, a EPR e o TGF α , para a realização desses testes. Além disso, outro objetivo deste trabalho foi produzir e testar a seletividade e afinidade do fragmento Fab de um anticorpo anti-EPR. Primeiramente, foi realizada a amplificação por PCR dos genes do EGF, TGF α e EPR, seguido da clonagem dos amplicons no vetor pET28a-TEV-GFP, em fusão C-terminal com a proteína GFP. Essa fusão pode ser utilizada como marcador para os ensaios de interação entre os ligantes e o Fab. Após transformação da cepa DH5 α de *E. coli* com os plasmídeos, foram testadas 30 colônias para confirmar se havia a presença dos insertos de interesse. Entretanto, nenhum clone foi confirmado. Além disso, também foi testada a expressão da EPR fusionada a tiorredoxina em pET32a na cepa BL21 Star (DE3) de *E. coli*. Após testes de indução, a expressão da proteína foi detectada e a mesma foi purificada através de cromatografia de afinidade a níquel seguida de uma purificação por congelamento. As cadeias leve (EL) e pesada (EH) do Fab anti-EPR foram clonadas nos vetores para expressão em levedura pPICZ α e pPIC9K respectivamente. Após cotransformação desses plasmídeos em *Pichia pastoris*, 52 clones transformantes foram selecionados. Testes de expressão foram realizados, porém não foi possível detectar a expressão do anticorpo.

Palavras-chave: EGFR, EGF, TGF α , EPR, câncer de pulmão.

ABSTRACT

Cancer is currently a public health problem, being one of the main causes of death among the population. Among the different types of neoplasms, lung cancer has one of the highest incidence and mortality rates. One of the molecular mechanisms related to its development stems from mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR), which modulates signaling pathways involved with cell proliferation and survival. In addition, studies have shown that some of its ligands are also involved in the development of some types of neoplasms, among them lung cancer. An example is epidermal growth factor (EGF), the major ligand of EGFR, transforming growth factor α (TGF α) and epiregulin (EPR). Despite this evidence, studies evaluating the role of these factors as potential biomarkers for lung cancer are still scarce, and its prognostic value for this type of cancer also remains to be determined. A fundamental step for the validation of these ligands as potential biomarkers is the improvement of the methods used for the quantification of their serological levels. Existing methods are based on the recognition of these proteins through antibodies. However, due to the high structural similarity between the ligands of this family of growth factors, the available antibodies do not present satisfactory levels of detection. In order to develop antibodies that show greater selectivity among members of the family of epidermal growth factors, a recombinant anti-EGF antibody is being developed by the Laboratory of Proteomics and Protein Engineering of the Carlos Chagas Institute. In order for its selectivity and functionality to be tested, it is also necessary to develop its antigen. The objective of this work was to produce the recombinant EGF, as well as two other ligands of the family, RPE and TGF α , to perform these tests. In addition, another objective of this work was to produce and test the selectivity and affinity of the Fab fragment of an anti-EPR antibody. First, PCR amplification of the EGF, TGF α and EPR genes was performed, followed by cloning of the amplicons in the pET28a-TEV-GFP vector, in C-terminal fusion with the GFP protein. This fusion can be used as a marker for the interaction assays between the ligands and Fab. After transformation of the *E. coli* strain DH5 α with the plasmids, 30 colonies were tested to confirm the presence of the inserts of interest. However, no positive clones were found. In addition, the expression of thioredoxin- EPR was also tested in *E. coli* strain BL21 Star (DE3). After induction, protein expression was detected and purified by nickel affinity chromatography followed by freeze-purification. The light (EL) and heavy (EH) chains of the anti-EPR Fab were cloned in the yeast expression vectors pPICZ α and pPIC9K respectively. After co-transformation of these plasmids into *Pichia pastoris*, 52 transforming clones were selected. Expression tests were performed but antibody expression could not be detected.

Keywords: EGFR, EGF, TGF α , EPR, lung cancer.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
1.1	FAMÍLIA DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL.....	7
1.1.1	Receptor do fator de crescimento epidermal.....	9
1.2	LIGANTES DOS RECEPTORES DA FAMÍLIA DO EGFR.....	11
1.2.1	Principais ligantes do EGFR.....	13
1.2.1.1	EGF.....	13
1.2.1.2	TGF α	14
1.2.1.3	EPR.....	15
1.3	CÂNCER.....	15
1.3.1	EGFR e o câncer.....	16
1.3.1.1	Câncer de pulmão.....	17
1.3.1.2	Fatores de crescimento da família do EGF como biomarcadores para o câncer de pulmão.....	19
1.3.1.3	Quantificação.....	20
1.3.1.4	Anticorpos.....	21
1.4	JUSTIFICATIVA.....	22
2	OBJETIVOS.....	24
2.1	OBJETIVO GERAL.....	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	SOLUÇÕES E TAMPÕES UTILIZADOS.....	25
3.2	MEIOS DE CULTURA.....	25
3.2.1	Meios de cultura de bactéria.....	25
3.2.2	Meios de cultura de levedura.....	26
3.3	ANTIBIÓTICOS.....	26
3.4	LINHAGENS CELULARES.....	27
3.4.1	<i>Escherichia coli</i>	27
3.4.2	<i>Pichia pastoris</i>	27
3.5	MARCADORES MOLECULARES.....	27
3.5.1	DNA.....	27
3.5.2	Proteína.....	27
3.6	VETORES.....	28
3.6.1	pPIC9K.....	28

3.6.2 pPICZ α A.....	29
3.6.4 pET32a.....	30
3.6.5 pET28a-TEV-GFP	30
3.7 OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS.....	31
3.8 SEQUÊNCIA DOS GENES DA CADEIA PESADA E LEVE DO FAB ANTI-EPR	33
3.9 REAÇÕES DE DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	33
3.10 REAÇÕES DE LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA	33
3.11 ELETROFORESE DE DNA.....	33
3.12 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA DO GEL DE AGAROSE	34
3.13 TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. coli</i> POR CHOQUE TÉRMICO.....	34
3.14 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDEAL EM PEQUENA ESCALA.....	34
3.15 TRANSFORMAÇÃO DE <i>P. pastoris</i> COM CLORETO DE LÍTIO	35
3.16 TESTES DE EXPRESSÃO EM <i>Pichia pastoris</i>	36
3.17 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	37
3.18 TESTES DE EXPRESSÃO EM <i>Escherichia coli</i>	37
3.19 SELEÇÃO DE TRANSFORMANTES	38
3.20 EXTRAÇÃO DNA GENÔMICO DE <i>P. pastoris</i>	38
3.21 PCR DO DNA GENÔMICO DE <i>P. pastoris</i>	38
3.22 PRECIPITAÇÃO COM ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA)	39
3.23 CROMATOGRAFIA.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 OTIMIZAÇÃO DOS GENES DA CADEIA PESADA E LEVE DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-EPR.....	41
4.2 CLONAGEM DOS GENES DAS CADEIAS LEVE E PESADA DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-EPR EM VETORES PARA EXPRESSÃO EM LEVEDURA.....	43
4.3 CONFIRMAÇÃO DOS CLONES POSITIVOS: pPIC9K-EH E pPICZ α A-EL.....	46
4.4 TRANSFORMAÇÕES DOS PLASMÍDEOS pPIC9K-EH E pPICZ α A-EL EM <i>P. pastoris</i>	48
4.5 SELEÇÃO DE COLÔNIAS DE <i>P. pastoris</i> QUE CONTINHAM OS GENES EH E EL INTEGRADOS NO GENOMA.....	49
4.6 REAÇÕES DE PCR PARA CONFIRMAR A PRESENÇA DOS GENES DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-EPR NO GENOMA DE <i>P. pastoris</i>	50
4.7 TESTES DE EXPRESSÃO DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-EPR EM <i>P. pastoris</i>	51
4.8 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPR EM FUSÃO COM A TIORREDOXINA	52

4.8.1 Testes de Indução.....	53
4.8.2 Testes de purificação	55
4.9 CONSTRUÇÃO DO VETOR pET28a-TEV-GFP	58
4.10 AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS DO EGF, TGF α E EPR.....	59
4.11 PCR PARA CONFIRMAR A PRESENÇA DOS GENES DO EGF, TGF α E EPR NO VETOR pET28a-TEV-GFP	59
5 CONCLUSÕES	61
6 REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL

A família do receptor do fator de crescimento epidermal é uma família de proteínas com atividade tirosina quinase constituída por quatro membros: EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2/neu, HER3/ErbB3 e HER4/ErbB4. Esses receptores são encontrados nas membranas celulares de mamíferos e expressos em praticamente todas as células epiteliais, mesenquimais, cardíacas e neuronais desses organismos (ROSKOSKI, 2014; APPERT-COLLIN *et al.*, 2015).

Todos os receptores compartilham a mesma estrutura molecular (figura 1), a qual consiste de um domínio extracelular altamente glicosilado, um segmento transmembrana hidrofóbico de 19-25 resíduos de aminoácidos e uma porção intracelular de cerca de 540 resíduos de aminoácidos. Essa porção intracelular é formada por uma região justamembrana (40 resíduos), um domínio tirosina quinase altamente conservado (270 resíduos) e uma cauda carboxiterminal contendo múltiplos resíduos de tirosina (230 resíduos). O domínio extracelular é dividido em quatro partes: domínios I e III, segmentos ricos em leucina que participam na ligação dos ligantes, e domínios II e IV, os quais são formados por uma grande quantidade de resíduos de cisteína e que participam na formação de pontes dissulfeto (LEMMON *et al.*, 2014; ROSKOSKI, 2014).

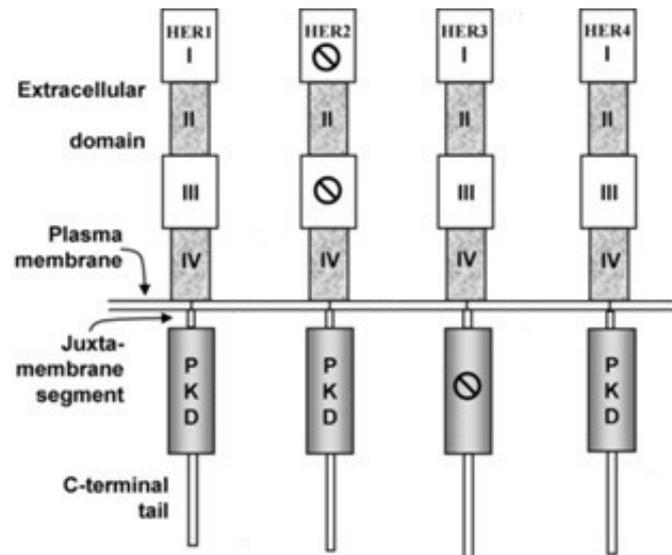


FIGURA 1 - ORGANIZAÇÃO DOS RECEPTORES DA FAMÍLIA ErbB/HER. Cada receptor é composto por uma região extracelular, um segmento transmembrana e um domínio intracelular. A região extracelular é formada por quatro domínios (I-IV), sendo os domínios I e III importantes na ligação dos ligantes, exceto no receptor HER2. A região intracelular contém o domínio tirosina quinase e a cauda carboxiterminal, a qual é formada por resíduos de tirosina. O receptor HER3 possui um domínio tirosina quinase com atividade reduzida (Adaptado de ROSKOSKI, 2014).

Quando inativos, os receptores encontram-se em uma conformação monomérica. Porém, a ligação dos respectivos fatores de crescimento nos receptores ErbB1/3/4 promove a sua homo ou heterodimerização, levando a mudanças conformacionais nos seus domínios tirosina quinase. Essas mudanças causam a ativação desses domínios, o que resulta na autofosforilação de resíduos de tirosina específicos presentes na cauda carboxiterminal. Esses resíduos fosforilados servem de sítios de interação, recrutamento e ancoragem para uma gama de proteínas citoplasmáticas envolvidas em cascatas de sinalização celular (WILSON *et al.*, 2009; BREWER *et al.*, 2010; KOLCH & PITT, 2010; APPERT-COLLIN *et al.*, 2015).

O receptor ErbB3 possui uma atividade tirosina quinase bastante reduzida, em comparação aos demais membros da família, e por isso depende da transfosforilação de seus resíduos de tirosina por outros receptores. Com relação ao receptor ErbB2, este não possui um ligante solúvel conhecido. Porém, ele tem se mostrado o parceiro de interação preferencial na formação de heterodímeros devido a sua conformação inativa se assemelhar a do estado ativo, favorecendo assim a dimerização com outros receptores, diminuindo a dissociação dos ligantes e prolongando a ativação das vias de sinalização (NORMANNO *et al.*, 2006; HYNES & MACDONALD, 2009).

As proteínas tirosina quinases ErbB/HER estão entre as famílias de receptores mais estudadas na biologia, pois possuem um importante papel em diversos

processos celulares (como adesão celular, angiogênese, apoptose, progressão do ciclo celular e rearranjo do citoesqueleto) essenciais para a viabilidade de um organismo. Essa regulação é feita através da ativação de vias de sinalização celular envolvidas com a proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação das células, como a via fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K)/Akt, a via Ras/Raf/MEK/ERK1/2 e a via da fosfolipase C (PLC γ) por exemplo (HOLBRO & HYNES, 2004; ROSKOSKI, 2014; ZENG & HARRIS, 2014; JACOBI *et al.*, 2017).

Em células normais, a ativação desses receptores, e conseqüentemente dessas vias, é um processo extremamente controlado. A desregulação na sua atividade vem sendo associada ao desenvolvimento de diversos tipos de neoplasias, tornando essas proteínas interessantes biomarcadores e importantes alvos na terapia anticâncer (PRENZEL *et al.*, 2001).

1.1.1 Receptor do fator de crescimento epidermal

O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR/ErbB1) apresenta cerca de 170 kDa e está entre as proteínas com atividade tirosina quinase mais estudadas. Ele foi o primeiro membro da sua família a ser descrito e relacionado com o câncer (GSHWIND *et al.*, 2004; ROSKOSKI, 2014).

Entre os anos de 2002 e 2003 uma série de estruturas cristalográficas, da região extracelular do EGFR contendo ou não um dos seus ligantes, foram resolvidas (figura 2). Com isso foi possível compreender melhor como esse receptor funciona (LEMMON, 2010).

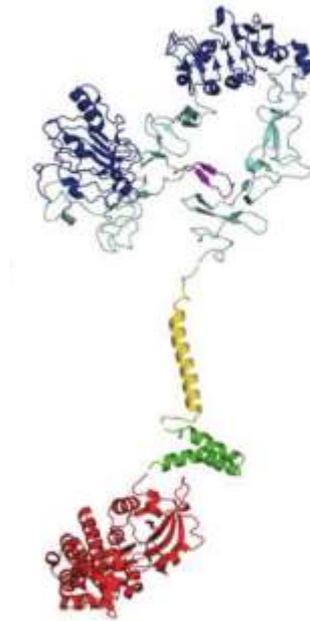


FIGURA 2 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO EGFR. As diferentes cores representam os diferentes domínios estruturais do receptor. Os domínios da região extracelular I e III estão representados em azul escuro e os domínios II e IV em azul claro; o domínio transmembrana em amarelo; o domínio justamembrana em verde e o domínio tirosina quinase em vermelho. Essas estruturas foram resolvidas por cristalografia de raio-X e ressonância magnética nuclear (APPERT-COLLIN *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos demonstraram que existem dois estados conformacionais distintos para o domínio extracelular do EGFR: um estado inativo e um estado ativo. O primeiro corresponde a sua conformação na ausência do ligante, onde o receptor se encontra em uma conformação monomérica compacta, devido a existência de uma interação entre os domínios II e IV. Esse estado autoinibido previne que as regiões I e III interajam, impedindo assim que o receptor seja ativado sem a presença de um ligante. Já na conformação ativa, a interação do ligante faz com que a estrutura se torne mais aberta, pois não existe mais a interação entre os domínios II e IV, resultando em uma grande mudança conformacional e na exposição do braço de dimerização do domínio II e subsequente dimerização do receptor (figura 3) (FERGUSON *et al.*, 2003; HYNES & LANE, 2005; ROSKOSKI, 2014; APPERT-COLLIN *et al.*, 2015).

Depois que a homo ou heterodimerização ocorre, o domínio tirosina quinase intracelular é autoativado, resultando na fosforilação de resíduos de tirosina (onde um membro do dímero media a fosforilação do outro membro). Esses resíduos criam sítios para interação de proteínas adaptadoras ou enzimas, levando a ativação de cascatas

de sinalização celular (HOLBRO *et al.*, 2003; ROSKOSKI, 2014; APPERT-COLLIN *et al.*, 2015).

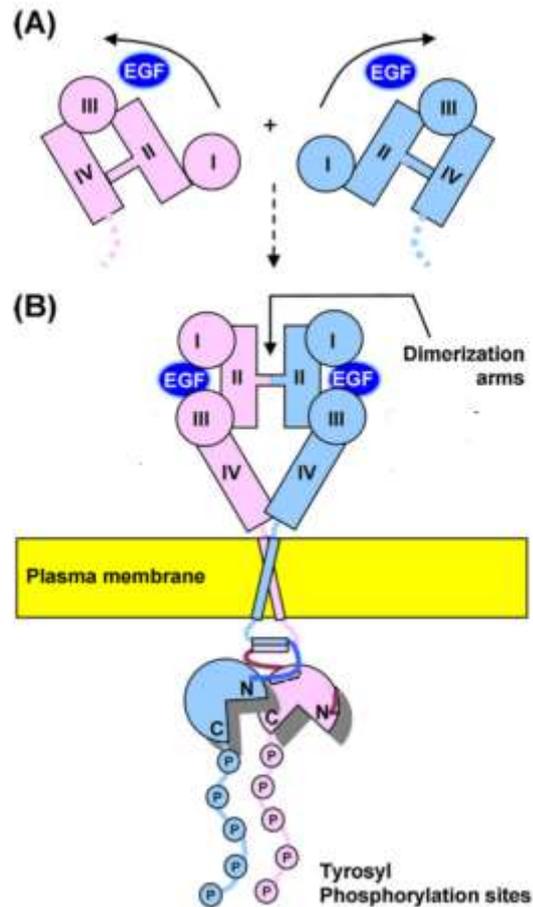


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DA ATIVAÇÃO E DIMERIZAÇÃO DO EGFR. A ligação do ligante (por exemplo EGF) causa uma mudança conformacional nos domínios extracelulares. Essa mudança favorece a interação e dimerização com outros receptores através do braço de dimerização contido no domínio II da porção extracelular do receptor (Modificado de ROSKOSKI, 2014).

1.2 LIGANTES DOS RECEPTORES DA FAMÍLIA DO EGFR

Os ligantes dos receptores da família ErbB/HER são fatores de crescimento pertencentes a família do fator de crescimento epidermal. Em mamíferos, fazem parte desta família 11 ligantes: o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento transformador α (TGF α), o EGF de ligação a heparina (HB-EGF), a betacelulina (BTC), a anfiregulina (ARG), a epiregulina (EPR), o epigen (EPG) e as neuroregulinas (NRGs) 1-4 (SINGH *et al.*, 2016; JACOBI *et al.*, 2017).

Grande parte destes ligantes são sintetizados inicialmente como proteínas transmembrana do tipo I, as quais são inseridas na membrana celular. Em seguida, os domínios extracelulares são clivados proteoliticamente por proteínas da família ADAM (uma Proteína Desintegrina e Metaloproteinase), liberando as formas maduras dos fatores de crescimento. O processamento proteolítico é um mecanismo pós-traducional importante na regulação da atividade destes ligantes, tendo em vista que é um processo necessário para torná-los solúveis e ativos (FULLER *et al.*, 2008; SCHNEIDER & WOLF, 2009; PURBA *et al.*, 2017).

Além disso, os polipeptídeos liberados da membrana podem interagir com proteoglicanos presentes na superfície celular, formando uma espécie de reservatório de ligantes, os quais estarão disponíveis para ligação aos receptores quando necessário. Entretanto, os ligantes podem também permanecer ligados a membrana das células ficando a sua ação restrita e dependente de contatos intracelulares (FULLER *et al.*, 2008; WILSON *et al.*, 2009).

Existem diferenças na especificidade e afinidade de ligação ao receptor dentre os diferentes ligantes. Essas diferenças podem ocorrer devido a alguns fatores, como tempo e padrão de expressão em diferentes tecidos, diferenças nas clivagens e no processamento pós-traducional e modulação das concentrações dessas proteínas. Além disso, existem diferenças também nas funções que cada ligante desempenha quando se liga a um mesmo receptor (PRENZEL *et al.*, 2001; HYNES & MACDONALD, 2009; WILSON *et al.*, 2009).

Os 11 fatores de crescimento, de acordo com a sua especificidade de ligação com os diferentes receptores, podem ser agrupados em 4 grupos (figura 4). O primeiro grupo consiste do EGF, EPG, TGF α e ARG, e todos se ligam ao EGFR. O segundo grupo é formado pela BTC, HB-EGF e EPR, sendo que estes são capazes de interagirem tanto com o EGFR quanto com o receptor ErbB4. No terceiro grupo estão a NRG1 e a NRG2, as quais se ligam ao ErbB3 e ao ErbB4. O último grupo é constituído pela NRG3 e NRG4, ligantes que interagem apenas com o receptor ErbB4 (LEMMON *et al.*, 2014; APPERT-COLLIN *et al.*, 2015).

Cada ligante possui uma sequência consenso, chamada de domínio do tipo EGF, formada por seis resíduos de cisteína espacialmente conservados (CX7 CX4–5 CX10–13 CXCX8 C), os quais formam três pontes dissulfeto intramoleculares: C1-C3, C2-C4 e C5-C6 originando uma estrutura secundária em forma de loops. O domínio do tipo EGF é o domínio responsável pela ligação e ativação dos receptores, e mesmo

sendo conservado entre os diferentes fatores de crescimento, pequenas variações em sua sequência são suficientes para alterar a especificidade e seletividade da ligação com os diferentes receptores (HARRIS *et al.*, 2003; SCHNEIDER & WOLF, 2009; LEMMON *et al.*, 2014; ZENG & HARRIS, 2014).

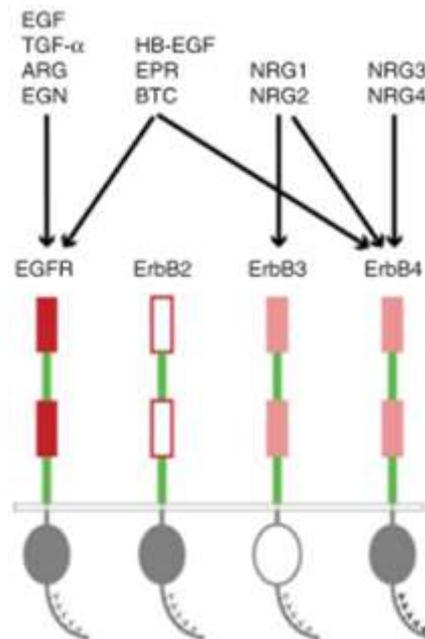


FIGURA 4 – OS RECEPTORES DA FAMÍLIA ErbB/HER E SEUS LIGANTES. O EGFR é ativado pelo EGF (fator de crescimento epidermal), TGF α (fator de crescimento transformador α), ARG (anfiregulina) e EPG (epigen). O receptor ErbB2 não possui um ligante conhecido; ambos os receptores ErbB3 e ErbB4 interagem com NRG1 e NRG2 (neuroregulinas 1 e 2) e o ErbB4 também interage com NRG3 e NRG4 (neuroregulinas 3 e 4). Além disso, o EGFR e o ErbB4 são ativados por: HB-EGF (EGF de ligação a heparina), EPR (epiregulina) e pela BTC (betacelulina) (Modificado de LEMMON *et al.*, 2014).

1.2.1 Principais ligantes do EGFR

O EGFR pode ser ativado por sete diferentes ligantes: EGF, TGF α , ARG, EPG, BTC, HB-EGF e EPR. Os três primeiros interagem exclusivamente com este receptor enquanto que os demais ligantes também interagem com o ErbB4 (FULLER *et al.*, 2008).

1.2.1.1 EGF

O EGF é o principal ligante do EGFR e foi descoberto em 1962 pelo bioquímico americano Stanley Cohen. Devido a sua capacidade de estimular a proliferação de

células epiteliais, esse polipeptídeo recebeu o nome de fator de crescimento epidermal (GSHWIND *et al.*, 2004; ZENG & HARRIS, 2014).

A forma madura do EGF possui 53 aminoácidos (aproximadamente 6 kDa) e participa na regulação de diversos processos fisiológicos, como no desenvolvimento de órgãos, crescimento e regeneração tecidual. Além disso, ela também está presente em diversos fluídos corporais como: leite, saliva, urina, plasma e líquido amniótico (OGISO *et al.*, 2002; SCHNEIDER & WOLF, 2009; ZENG & HARRIS, 2014).

Em seres humanos, os maiores níveis são encontrados nos fluídos da próstata e na urina, respectivamente. Os níveis de expressão do EGF também variam entre os diferentes estágios do desenvolvimento bem como em diferentes condições biológicas e patológicas, como por exemplo em neoplasias (GANN *et al.*, 1999; ZENG & HARRIS, 2014).

Maiores níveis de expressão do EGF são responsáveis por um aumento na atividade do seu receptor (EGFR). Essa condição foi observada em uma grande variedade de tumores incluindo o glioblastoma, câncer de pescoço, de mama, coloretal, de ovário, próstata, pancreático e no câncer de pulmão de células não-pequenas (FERGUSON *et al.*, 2003; LEMMON *et al.*, 2014; PURBA *et al.*, 2017).

Além disso, níveis de EGF mais elevados estão correlacionados com a progressão e metástase dos tumores devido ao: aumento na proliferação e migração das células tumorais (ativação das vias Ras/Raf/MEK/ERK e PI3K/AKT), desregulação da atividade autofágica e estimulação da expressão de diversas metaloproteínas (facilitando a invasão e a metástase) (ZENG & HARRIS, 2014).

1.2.1.2 TGF α

Outro ligante, que se liga ao EGFR com alta afinidade assim como o EGF, é o TGF α . Sua forma ativa é formada por cerca de 50 resíduos de aminoácidos, o equivalente a uma proteína de aproximadamente 5.3 kDa (FERRER *et al.*, 1996).

Esse fator de crescimento desempenha uma ampla variedade de funções biológicas como a renovação de epitélios, desenvolvimento das glândulas mamárias e sobrevivência de células neuronais embrionárias (FERRER *et al.*, 1996; HUMPHREYS & HENNIGHAUSEN, 2000; BADAWY *et al.*, 2016).

A superexpressão do TGF α está associada ao desenvolvimento de neoplasias da bexiga, mama, ovário, rim, pâncreas, cólon, pulmão e fígado. Estudos demonstram

que estes maiores níveis de expressão estimulam o crescimento celular através de uma maior ativação da via de sinalização PI3K/Akt, promovem carcinogênese através da ativação da via TGF α -EGFR-RAS-MAPK e aumentam a migração e invasão celular através da via (PLC γ) (HOU *et al.*, 2014; BADAWY *et al.*, 2016).

1.2.1.3 EPR

A EPR é um ligante do EGFR que tem sido muito estudado ao longo dos anos. A sua forma madura possui cerca de 46 aminoácidos e desempenha diversas funções tanto em condições biológicas normais quanto em estados patológicos (KADO, *et al.*; SUNAGA & KAIRA, 2015).

Em condições biológicas a EPR é expressa em níveis muito baixos na maioria dos tecidos. Ela está envolvida no processo de angiogênese, reparo e regeneração de células do fígado, reações inflamatórias (principalmente na pele), cicatrização de feridas e na reprodução. Evidências também apontam que este fator de crescimento participa na regulação da diferenciação e proliferação de células epiteliais das vias respiratórias (RIESE & CULLUM, 2014; SUNAGA & KAIRA, 2015).

Já em condições patológicas, estudos demonstram que a EPR encontra-se superexpressa em alguns tipos de câncer como o câncer de bexiga, mama, fígado, gástrico, colorretal e de pulmão. Devido a isso, este fator de crescimento pode ser um alvo de intervenção terapêutica interessante (RIESE & CULLUM, 2014; IJIMA *et al.*, 2017).

1.3 CÂNCER

Câncer, ou tumor maligno, é o termo utilizado para designar mais de 100 diferentes tipos de patologias. Apesar de heterogêneas, estas possuem uma característica em comum: a proliferação de células anormais de maneira descontrolada, resultando na invasão de outros tecidos ou órgãos (INCA; WHO, 2016).

O desenvolvimento e a proliferação das células cancerígenas são resultado de múltiplos e sucessivos eventos genéticos, os quais conferem habilidades essenciais para o estabelecimento, crescimento e sobrevivência do tumor (figura 5). Esses

eventos desregulam vias de sinalização celular importantes no controle da diferenciação, proliferação, sobrevivência e migração das células (NICHOLSON *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2008).

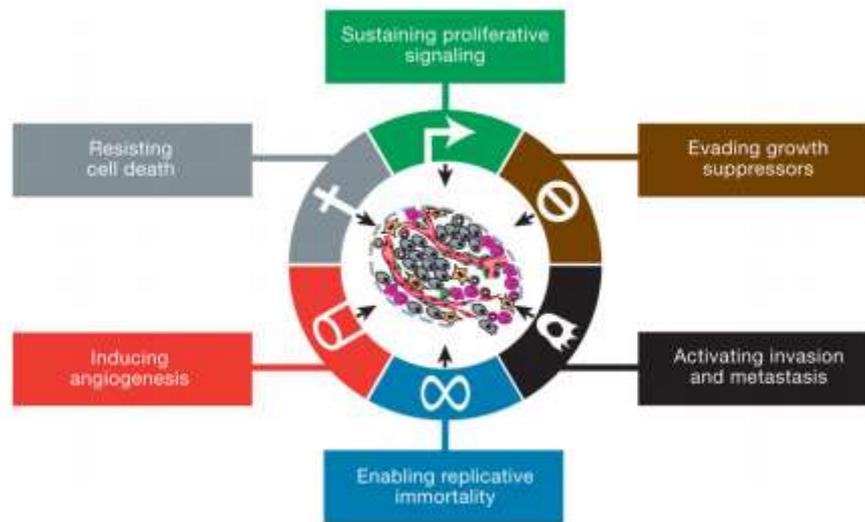


FIGURA 5 – CARACTERÍSTICAS DO CÂNCER. As seis capacidades adquiridas durante o processo de desenvolvimento de tumores são: imortalidade, indução da angiogênese, resistência a morte celular, invasão e metástase, evasão de supressores de crescimento e sinais de proliferação autossustentados (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Atualmente, o câncer é um problema de saúde pública. Em 2012, a Organização Mundial de Saúde (WHO) estimou o surgimento de 14 milhões de novos casos e cerca de 8 milhões de mortes pela doença. No Brasil, o câncer é a segunda maior causa de mortes dentre a população, com 600 mil novos casos estimados para o biênio 2016-2017 (INCA, 2015).

Devido a isso, entender os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento das neoplasias se torna fundamental para o desenvolvimento de tratamento mais eficazes, e também para identificar possíveis biomarcadores para a detecção do câncer em estágios mais iniciais.

1.3.1 EGFR e o câncer

Um dos fatores envolvidos no processo de carcinogênese é a ativação de oncogenes, como por exemplo o EGFR. A relação do EGFR com o câncer surgiu pela primeira vez da observação de que o vírus da eritroblastose aviária expressava uma forma aberrante desse receptor, a qual causava tumores em aves. Já na década de

1980, identificou-se que os níveis de expressão do EGFR encontravam-se aumentados em diversos tumores de origem epitelial, demonstrando que a desregulação da sua atividade possuía um importante papel no desenvolvimento de câncer também em seres humanos (DE BONO & ROWINSKY, 2002; GSHWIND *et al.*, 2004; ARTEAGA & ENGELMAN, 2014).

Desde então, foram identificados outros mecanismos que podem ocasionar a desregulação da ativação do EGFR. Estes incluem: maiores níveis de expressão dos seus ligantes, mutações que levam a sua autoativação, deficiências na sua *downregulation* e a sua superexpressão (PURBA *et al.*, 2017).

Entre os tipos de câncer correlacionados com essa atividade desregulada encontram-se: o câncer da bexiga, colo do útero, endométrio, células germinativas, glioblastoma, pescoço, fígado, pâncreas e o de pulmão. Tumores que possuem uma ativação aberrante do EGFR tendem a ser mais agressivos, resultando em um pior prognóstico clínico aos pacientes (HYNES & LANE, 2005; SHARMA *et al.*, 2007; SASAKI *et al.*, 2013; ZENG & HARRIS, 2014).

1.3.1.1 Câncer de pulmão

Dentre os diferentes tipos de câncer, o câncer de pulmão é um dos mais incidentes e o que possui o maior índice de mortalidade. De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), houveram cerca de 24.490 mortes (14.811 homens e 9.675 mulheres) no Brasil em 2013 decorrentes da doença e, 28.220 novos casos de câncer de pulmão (17.330 homens e 10.890 mulheres) foram estimados para o ano de 2016.

A sobrevida de pacientes com câncer de pulmão em um período de cinco anos é baixa, devido principalmente a agressividade de alguns tumores e também ao diagnóstico ser feito em estágios mais avançados da doença, e varia entre 10 a 15% (INCA, 2016). Todos esses dados evidenciam o quão urgente e necessário se faz a busca por tratamentos mais efetivos.

Considerando suas características anatopatológicas, o câncer de pulmão pode ser classificado em dois grandes grupos: carcinoma de pulmão de células pequenas e carcinoma de pulmão de células não pequenas (CNPC), sendo este último responsável por cerca de 85% de todos os casos de câncer de pulmão. Dentre os

diferentes tipos de CNPC, os mais comuns são: o adenocarcinoma (45%), o carcinoma de células escamosas (35%) e o carcinoma de grandes células (SIBILIA *et al.*, 2007; SAKASHITA *et al.*, 2014; ROSKOSKI, 2014; INCA, 2016).

A principal forma de tratamento do câncer de pulmão não-metastático é através da remoção cirúrgica dos tumores. Porém, em apenas 23% dos casos o diagnóstico é realizado antes das metástases ocorrerem, ou seja, a maioria dos pacientes (cerca de 77%) são diagnosticados em estágios mais avançados da doença (LEMOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2007; ROSKOSKI, 2014).

Nesses casos, a terapia consiste na combinação de radioterapia e quimioterapia. Apesar de aumentar a sobrevivência dos pacientes, a sobrevivência em 5 anos permanece menor que 15%. Neste contexto, a busca por novos tratamentos levou ao desenvolvimento de medicamentos mais direcionados as características histológicas e/ou moleculares de cada tipo de câncer de pulmão (SHARMA *et al.*, 2007; NENINGER *et al.*; 2009; ROSKOSKI, 2014).

A expressão do EGFR está associada a uma redução na taxa de sobrevivência dos pacientes e a uma menor resposta a quimioterapia. Além disso, as mutações nesse receptor também são de grande interesse, pois alteram a responsividade dos pacientes ao tratamento. Devido a isso, o EGFR têm sido um importante alvo terapêutico nestas neoplasias (HOLBRO *et al.*, 2003; HERBST, 2004; BURGESS, 2008).

De acordo com Garcia e colaboradores (2008), em cerca de 70% dos casos de CNPC o EGFR encontra-se superexpresso. Com relação a mutações nesses receptores, em pacientes asiáticos elas podem variar entre 10-40% enquanto que em caucasianos essa taxa é de aproximadamente 10%. A incidência de amplificações do gene do EGFR em CNPC são muito raras e praticamente não são observadas (ROSKOSKI, 2014; GUO *et al.*, 2015).

Levando em consideração essas características, medicamentos específicos tendo como alvo o EGFR foram lançados. Entre eles estão o erlotinib, gefitinib e afatinib, os quais consistem de pequenas moléculas inibidoras do domínio tirosina-quinase do EGFR e anticorpos monoclonais (mAbs), como o bevacizumab e pemetrexed, que têm como alvo o domínio extracelular desses receptores impedindo a ligação dos seus ligantes (GSHWIND *et al.*, 2004; SAKASHITA *et al.*, 2014; APPERT-COLLIN *et al.*, 2015; CODONY-SERVAT *et al.*, 2017).

Entretanto, devido ao câncer ser uma doença complexa e multifatorial, muitos pacientes acabam não respondendo ao tratamento ou adquirindo resistência após um certo tempo de terapia. Nesse contexto, surge a necessidade da busca por novos alvos terapêuticos mais efetivos, como por exemplo os ligantes do EGFR (GARCIA *et al.*, 2008; WHEELER *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2015; JACOBI *et al.*, 2017).

Níveis elevados desses fatores de crescimento têm sido identificados e correlacionados ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, dentre eles o câncer de pulmão. Anticorpos capazes de neutralizar essas moléculas, se apresentam então como candidatos interessantes a serem empregados na terapia antitumoral (LEMMON *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2016; IJIMA *et al.*, 2017).

1.3.1.2 Fatores de crescimento da família do EGF como biomarcadores para o câncer de pulmão

A coexpressão do EGFR com o TGF α ou com o EGF, bem como a superexpressão dessas proteínas, está relacionada a um pior prognóstico em pacientes com CPNC. O tratamento muitas vezes não é eficaz, tornando a expectativa de vida desses pacientes baixa (em média de 3 a 12 meses dependendo do estágio em que a doença se encontra). Níveis elevados de TGF α no soro de pacientes com CPNC, por exemplo, estão associados a não responsividade ao tratamento com o quimioterápico Gefitinibe (inibidor do EGFR) (ISHIKAWA *et al.*, 2005; LEMOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2007; SHARMA *et al.*, 2007; SIBILIA *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2008; CODONY-SERVAT *et al.*, 2017).

A expressão da EPR também se encontra aumentada no CPNC, principalmente em estágios mais avançados da doença. Além disso, foi observada que a sua expressão, nesse tipo de câncer, está correlacionada com uma diminuição na taxa de sobrevivência dos pacientes (ZHANG, *et al.*, 2008; BAUER *et al.*, 2016).

Os níveis de expressão do EGF têm sido correlacionados com o desenvolvimento de metástases e a progressão tumoral, indicando seu potencial como um possível biomarcador, tanto para ser utilizado no prognóstico clínico quanto na escolha do tipo de tratamento que será utilizado (RAMOS *et al.*, 2006; AKHTAR & BENTER, 2013; JACOBI *et al.*, 2017).

Da mesma forma, a análise dos níveis sorológicos de EGFR e dos outros ligantes, TGF α e EPR, também pode ser um marcador interessante no prognóstico e no acompanhamento dos pacientes durante o tratamento, analisando a sua eficácia por exemplo. Apesar disso, ainda existem poucos estudos investigando o papel desses ligantes como marcadores para o câncer de pulmão, principalmente no caso do EGF (LEMONS-GONZÁLEZ *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2016).

Em 2007, uma pesquisa realizada por Lemos-González e colaboradores, comparou os níveis séricos de EGF encontrados em voluntários saudáveis com os de pacientes com CPNC, demonstrando que havia uma redução na concentração sorológica deste ligante neste último grupo. Já em outro estudo, realizado em 2008, foi observada uma correlação na redução dos níveis séricos de EGF, em pacientes que haviam tomado uma vacina anti-EGF, com o aumento da expectativa de vida dos mesmos (RAMOS *et al.*, 2006).

Esses estudos demonstram que os fatores de crescimento EGF, EPR e TGF α podem ser potenciais biomarcadores para o câncer de pulmão, mas que devido à escassez de pesquisas nessa área, ainda precisam ser melhor estudados para poderem ser validados como tal.

1.3.1.3 Quantificação

Atualmente, os métodos existentes para quantificação de proteínas no soro são principalmente ensaios do tipo ELISA e ensaios multiplex com base em matrizes de esferas (*beads-array*). Ambos os métodos dependem da interação dos fatores de crescimento presentes no soro do paciente com um anticorpo contra eles, o qual será reconhecido por um anticorpo secundário acoplado a uma molécula repórter como, por exemplo, um cromóforo (DE CASTRO, 2016; ARIGO, 2017).

Porém, estes testes possuem limitações, sendo o principal problema encontrado a alta similaridade estrutural que membros da família dos fatores de crescimento possuem entre si, o que diminuí a especificidade dos ensaios e pode gerar resultados equivocados em relação a quantificação dessas proteínas (DE CASTRO, 2016).

Devido a isso, o aprimoramento das técnicas de detecção e quantificação sorológica do EGF, TGF α e EPR se faz necessário, principalmente para estudos visando a validação dos mesmos como marcador sorológico para o câncer.

1.3.1.4 Anticorpos

A seletividade de ligação a um determinado alvo faz dos anticorpos uma ferramenta biotecnológica com aplicações em diversas áreas, como na detecção de doenças, na terapia, em técnicas de biologia molecular, dentre outras (GOLDMAN, 2000; NELSON, 2010).

A maioria dos vertebrados possui anticorpos hetero-oligoméricos, os quais são formados por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas conectadas entre si. As cadeias leves possuem um domínio constante e um domínio variável cada. Já as cadeias pesadas, são constituídas de três a quatro domínios constantes e um domínio variável (ABBAS *et al.*, 2011).

Existem dois métodos principais de produção de anticorpos: a partir de um hibridoma e através de técnicas de engenharia biotecnológica. O método clássico, utilizando um hibridoma, é altamente dispendioso e permite o isolamento e caracterização de apenas um certo número de anticorpos (BETHELL & HOWARD, 2000; ALVARENGA *et al.*, 2014).

Por outro lado, a produção de anticorpos através de alterações biotecnológicas possibilita a geração de diversos tipos de moléculas e estruturas, cada uma com suas particularidades e vantagens. Alguns exemplos são os fragmentos de domínios variáveis de cadeia única ou scFv (do inglês *single-chain variable domain antibody fragment*), os quais possuem apenas as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas unidas entre si por conectores ou pontes dissulfeto (dsFv), os fragmentos de anticorpos de domínio único ou sdAf (do inglês *single-domain antibody fragment*), formados por um domínio variável da cadeia pesada e os Fabs (do inglês *fragment antigen-binding*) ou fragmentos de ligação ao antígeno, compostos por um domínio variável e um domínio constante de cada cadeia (figura 6) (HUDSON & SOURIAU, 2003; QUIROZ & SINCLAIR, 2010; MUYLDERMANS, 2013).

Devido a sua estrutura simples, o fragmento Fab tem aproximadamente um terço do tamanho de uma imunoglobulina G intacta (cerca de 48 kDa), esse tipo de

anticorpo é uma alternativa atrativa para produção em sistemas menos complexos e de fácil manipulação, como bactérias e leveduras (BETTER, *et al.*, 1988).

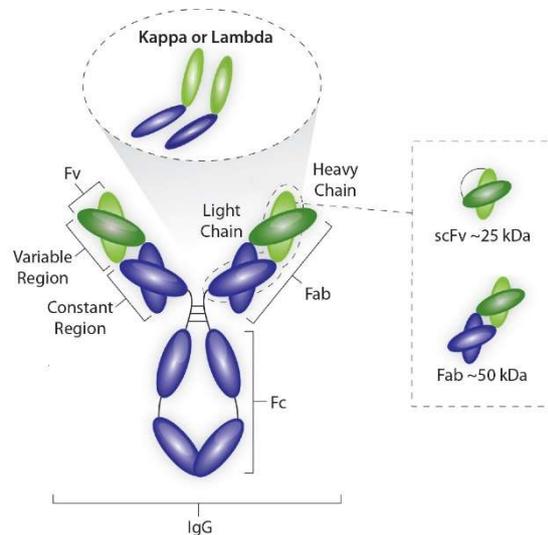


FIGURA 6 – ESQUEMA DA ESTRUTURA DE UMA IMUNOGLOBULINA G E DOS FRAGMENTOS scFv E Fab (Modificado de ROYCE, 2016).

1.3.1.5 *Pichia pastoris*

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* vem se tornando um organismo importante para a produção de proteínas recombinantes, tanto a nível experimental quanto industrial. Dentre as características que a tornam um sistema de expressão em ascensão estão: a capacidade de utilizar metanol como sua única fonte de carbono, conseguir crescer até altas densidades celulares, é de fácil manipulação genética e possui um eficiente sistema de secreção (KRAINER, *et al.*, 2012; AHMAD *et al.*, 2014).

Além disso, a *P. pastoris* é uma alternativa para sistemas de expressão bacterianos, devido a sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais, as quais são cruciais para a estrutura e função de proteínas mais complexas ou que contenham pontes dissulfeto (KRAINER, *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2016).

1.4 JUSTIFICATIVA

Os fatores de crescimento da família do fator de crescimento epidermal possuem uma alta similaridade estrutural entre si. Devido a isso, os anticorpos a

serem utilizados para quantificação sorológica dessas proteínas precisam ser testados quanto à afinidade e especificidade de ligação em relação ao seu alvo, visando determinar se reconhecem também outros ligantes.

Portanto, para a validação do EGF, TGF α e EPR como possíveis biomarcadores para o câncer, é necessário que haja primeiramente o aprimoramento das técnicas utilizadas para sua detecção e quantificação.

Tendo isso em vista, o Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas do Instituto Carlos Chagas está desenvolvendo inicialmente um fragmento Fab de um anticorpo anti-EGF capaz de reconhecer somente o EGF. Porém, para testar a sua seletividade é necessária a produção de outros fatores de crescimento da família do EGF. Por isso, este trabalho teve como objetivo produzir, em *Escherichia coli*, os reagentes EGF, TGF α e EPR, os quais serão utilizados em ensaios do tipo ELISA para avaliar o anticorpo recombinante.

Além disso, outro objetivo deste trabalho foi expressar, em *Pichia pastoris*, um fragmento Fab de um anticorpo anti-EPR, baseado no trabalho desenvolvido por Kado e colaboradores em 2015, e testar a sua seletividade frente à EPR. No referido estudo, apenas o reconhecimento da EPR pelo Fab foi testado.

Devido ao fato de apenas o reconhecimento da EPR pelo Fab ter sido testado no estudo mencionado, este projeto também visou testar a seletividade do Fab frente aos outros dois membros da família de fatores de crescimento, EGF e TGF α , para avaliar se esse fragmento de anticorpo apresenta, ou não, uma alta especificidade para a EPR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente projeto foi produzir um fragmento Fab do anticorpo anti-EPR e reagentes para testar tanto a sua funcionalidade e seletividade quanto a do anticorpo recombinante anti-EGF.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ **Meta 1:** Expressar os fatores de crescimento EPR, EGF e TGF α em *Escherichia coli* e o fragmento Fab do anticorpo anti-EPR em *Pichia pastoris*;
 - **1.1** - Subclonar as cadeias leve (EL) e pesada (EH) do Fab anti-EPR nos vetores para expressão em levedura pPICZ α A e pPIC9K, respectivamente.
 - **1.2** - Subclonar os fatores de crescimento EGF, TGF α e EPR em fusão com o gene da GFP (do inglês “*green fluorescent protein*”), no vetor de expressão pET28a-TEV-GFP.
 - **1.3** - Transformar os vetores pET28a-EPR-GFP, pET28a-EGF-GFP, pET28a-TGF α -GFP em *Escherichia coli*.
 - **1.4** - Co-transformar os vetores pPICZ α A-EL e pPIC9K-EH em *Pichia Pastoris*.
 - **1.5** – Realizar testes de indução para determinar as melhores condições de expressão das proteínas recombinantes.

- ✓ **Meta 2:** Padronizar a purificação dos fatores de crescimento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SOLUÇÕES E TAMPÕES UTILIZADOS

- Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x: Tris-base 400 mM, ácido acético 190 mM e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 10 mM pH 7,6.
- Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose 6x: azul de bromofenol 0,1% (m/v), xileno cianol 0,1% (m/v) e Ficoll tipo 400 15% (m/v).
- Tampão de amostra para SDS-PAGE 4x: Tris-HCl 1 mM pH 6,8, SDS (sódio duodecil sulfato) 10% (m/v), azul de bromofenol 0,5% (m/v), glicerol 50% (v/v) e β -mercaptoetanol 14,3 mM.
- Tampão Tris-Glicina para SDS-PAGE 1x: 25 mM Tris-base, 192 mM glicina e 0,1% SDS 10%.
- Solução GET: 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0 e 1% glicose (m/v).
- Solução de lise alcalina: 200 mM NaOH e 1% de SDS (v/v).
- Solução de acetato de potássio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$): 8,6 mL de ácido acético glacial 3 M, 45 mL de acetato de potássio 5 M e 21,4 mL de água destilada.
- Solução corante *Coomassie Brilliant Blue R-250*: *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1% (m/v), metanol 45% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e água destilada 45% (v/v).
- Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranosídeo (IPTG): Solução estoque 1 M, concentração para uso em meios líquidos 0,5 mM.
- Tampão de lise para bactérias: 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 0,2 mM NaCl.
- Tampão de Corrida: 20mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl e 20 mM Imidazol.
- Tampão de Eluição: 20mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl e 500 mM Imidazol.

3.2 MEIOS DE CULTURA

3.2.1 Meios de cultura de bactéria

- Meio líquido LB (Luria Bertani): Triptona 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v) e NaCl 1% (m/v).
- Meio sólido LB-ágar: Meio LB e ágar 1,5% (m/v).

3.2.2 Meios de cultura de levedura

- Meio líquido BMMY: Extrato de levedura 1% (m/v), peptona 2% (m/v), 100 mM K_2HPO_4 pH 6,0, base nitrogenada de levedura 1,34% (m/v), biotina 5% (m/v) e metanol 0.5%.
- Meio líquido BMGY: Extrato de levedura 1% (m/v), peptona 2% (m/v), 100 mM K_2HPO_4 pH 6,0, base nitrogenada de levedura 1,34% (m/v), biotina 5% (m/v) e glicerol 1%.
- Meio líquido YPD: Extrato de levedura 1% (m/v), peptona 2% (m/v) e dextrose 2% (v/v).
- Meio sólido YPD-ágar: Extrato de levedura 1% (m/v), peptona 2% (m/v), dextrose 2% (v/v) e ágar 2% (m/v).
- Meio sólido MD-ágar: Base nitrogenada de levedura 1,34% (m/v), biotina 5% (m/v), dextrose 2% (v/v) e ágar 2% (m/v).

3.3 ANTIBIÓTICOS

- Canamicina: concentração estoque 25 mg/mL, concentração de uso em meios líquidos e sólidos 50 mg/mL.
- Zeocina™ (Invitrogen): concentração estoque 100 mg/mL, concentração de uso em meio líquido e meio sólido de bactéria 50 mg/mL e concentração de uso em meio sólido de levedura 1 mg/mL.
- Ampicilina: concentração estoque 25 mg/mL, concentração de uso em meios líquidos e sólidos 50 mg/mL.
- G418 (Geneticina®): concentração estoque 50 mg/mL, concentração de uso em meio sólido de levedura 1 mg/mL.

3.4 LINHAGENS CELULARES

3.4.1 *Escherichia coli*

Para as etapas de clonagem e também expressão do EGF, TGF α e EPR, foram utilizadas as seguintes cepas:

- *DH5 α* : genótipo dlacZ Delta M15 Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1
- *BL21 Star (DE3)*: genótipo F-ompT hsdSB (rB-, mB-) galdcmrne131 (DE3)

3.4.2 *Pichia pastoris*

Para expressão do Fab anti-EPR foi utilizada a cepa de *P. pastoris* GS115 (Invitrogen) descrita abaixo:

- Genótipo: his4
- Fenótipo: Mut⁺ (crescimento rápido em metanol como única fonte de carbono)
- His⁺ (marca auxotrófica para histidina)

3.5 MARCADORES MOLECULARES

3.5.1 DNA

- *DNA GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus* (Fermentas);
- *MassRuler™ DNA Ladder, Mix, ready-to-use* (Fermentas);
- *1 kb Molecular Ruler* (BIO-RAD).

3.5.2 Proteína

- *Plus Protein™ Standard Unstained* (BIO-RAD);
- *SDS-PAGE Molecular Weight Standarts, Broad Range* (BIO-RAD).

3.6 VETORES

3.6.1 pPIC9K

O vetor pPIC9K (Invitrogen), representado na figura 7, foi utilizado para a clonagem do gene da cadeia pesada do Fab anti-EPR para expressão em *P. pastoris*. Este plasmídeo contém 9.276 nucleotídeos, o gene que confere resistência a ampicilina para seleção em bactérias, o gene *HIS4* para produção do aminoácido histidina e o gene da canamicina, o qual confere resistência a G418 (Genitocina[®]), como marcas de seleção em leveduras. Além dessas características, também se encontram o promotor do gene *AOX1*, o qual é induzível por metanol, o sinal de secreção de proteínas fator α e os sítios para anelamento dos oligonucleotídeos 5'AOX1 e 3'AOX1.

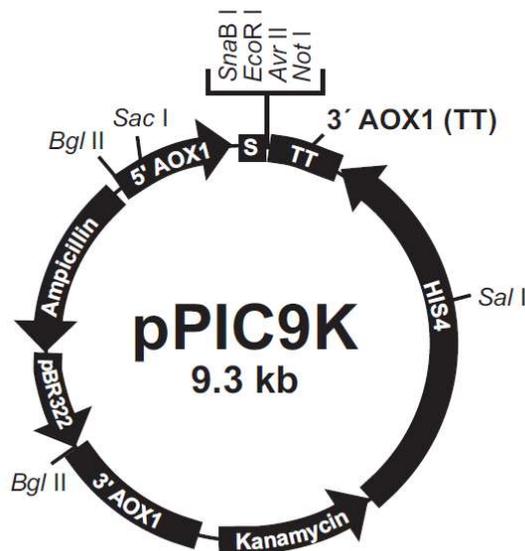


FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DO VETOR PARA EXPRESSÃO EM LEVEDURA pPIC9K. O pPIC9K possui um tamanho de aproximadamente 9.3 kilobases (kb), e foi utilizado para a clonagem da cadeia pesada do fragmento Fab do anticorpo anti-EPR. Legenda: Ampicillin (gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina em bactérias), *HIS4* (gene da enzima histidinol desidrogenase), Kanamycin (gene que confere resistência ao antibiótico G418 em leveduras), pBR322 (origem de replicação), 3' AOX1 TT (fragmento da sequência do gene do promotor AOX1), 3' AOX1 (terminador do gene AOX1) e 5' AOX1 (promotor do gene AOX1) (INVITROGEN, 2010).

3.6.2 pPICZ α A

O vetor pPICZ α A (Invitrogen), representado na figura 8, foi utilizado para a clonagem do gene da cadeia leve do Fab anti-EPR para expressão em *P. pastoris*. Este plasmídeo contém 3.593 nucleotídeos e o gene que confere resistência a Zeocina™, para seleção tanto em bactérias quanto em leveduras. Além disso, também estão presentes o promotor do gene *AOX1*, o qual é induzível por metanol, o sinal de secreção de proteínas fator α , os sítios para anelamento dos oligonucleotídeos 5'*AOX1* e 3'*AOX1*, uma cauda de hexahistidina e o epítipo c-myc (que pode ser utilizado em ensaios para detecção da proteína).

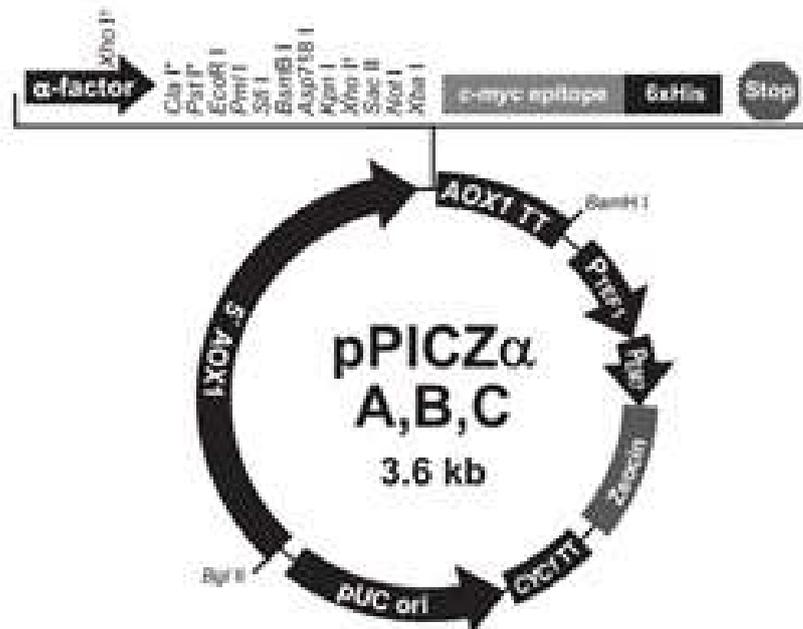


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DO VETOR PARA EXPRESSÃO EM LEVEDURA pPICZ α A. O pPICZ α A possui um tamanho de aproximadamente 3.6 kilobases (kb), e foi utilizado para a clonagem da cadeia leve do fragmento Fab do anticorpo anti-EPR. Legenda: Zeocin (gene que confere resistência ao antibiótico Zeocina), pUC ori (origem de replicação), *AOX1 TT* (terminador do gene *AOX1*), 5' *AOX1* (promotor do gene *AOX1*), PTEF1 e PEM7 (promotores), *CYC1 TT* (região de terminação da transcrição), α -factor (sinal de secreção do fator α), c-myc epitope (epítipo da proteína c-myc) e 6xHis (sequência de seis histidinas) (INVITROGEN, 2010).

3.6.4 pET32a

O vetor pET32a (Novagen), representado na figura 9, foi utilizado pela empresa *Genscript*. para a clonagem do gene da EPR em fusão com a tiorredoxina. Este plasmídeo contém 5.900 nucleotídeos e o gene que confere resistência a ampicilina para seleção em bactérias. Além disso, também estão presentes o promotor *T7*, o qual é induzível por IPTG e duas caudas de hexahistidina (para a clonagem na região C ou N-terminal da proteína).

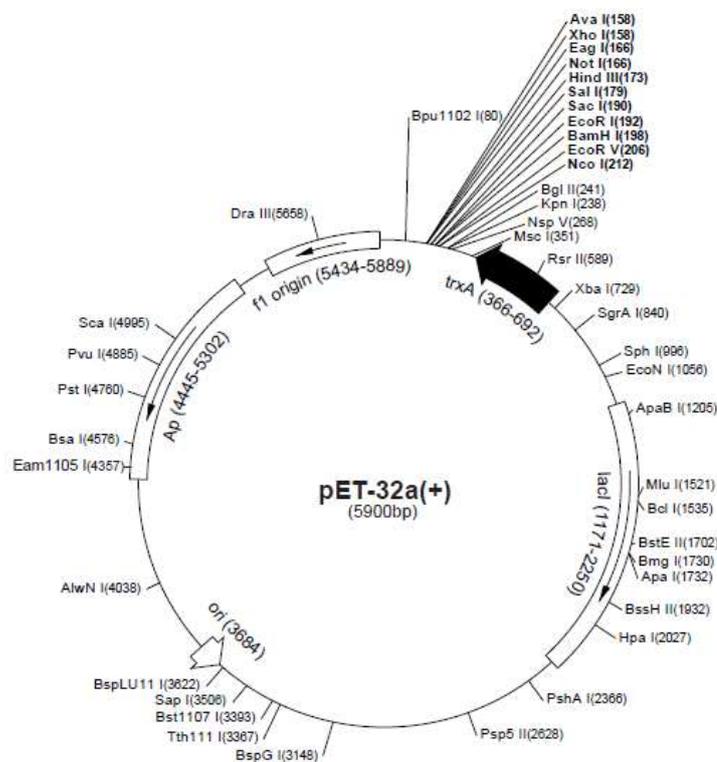


FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO DO VETOR PARA EXPRESSÃO EM *E. coli* pET32a. O pET32a possui um tamanho de aproximadamente 5900 pares de base (pb), e foi utilizado para a clonagem da EPR. Legenda: Ap (gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina), ori (origem de replicação), *lacI* (repressor *lac*) e *trxA* (tiorredoxina) (NOVAGEN).

3.6.5 pET28a-TEV-GFP

O plasmídeo pET28a-TEV-GFP, representado na figura 10, foi construído e gentilmente cedido pela aluna de mestrado do Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas Elisa Franquetto Andrade. Ele foi utilizado para a clonagem

dos genes da EPR, TGF α e EGF em fusão C-terminal com a GFP. Este plasmídeo contém 6059 nucleotídeos e o gene que confere resistência a canamicina para seleção em bactérias. Além disso, também estão presentes o promotor T7, o qual é induzível por IPTG, uma cauda hexahistidina e o sítio de clivagem TEV.

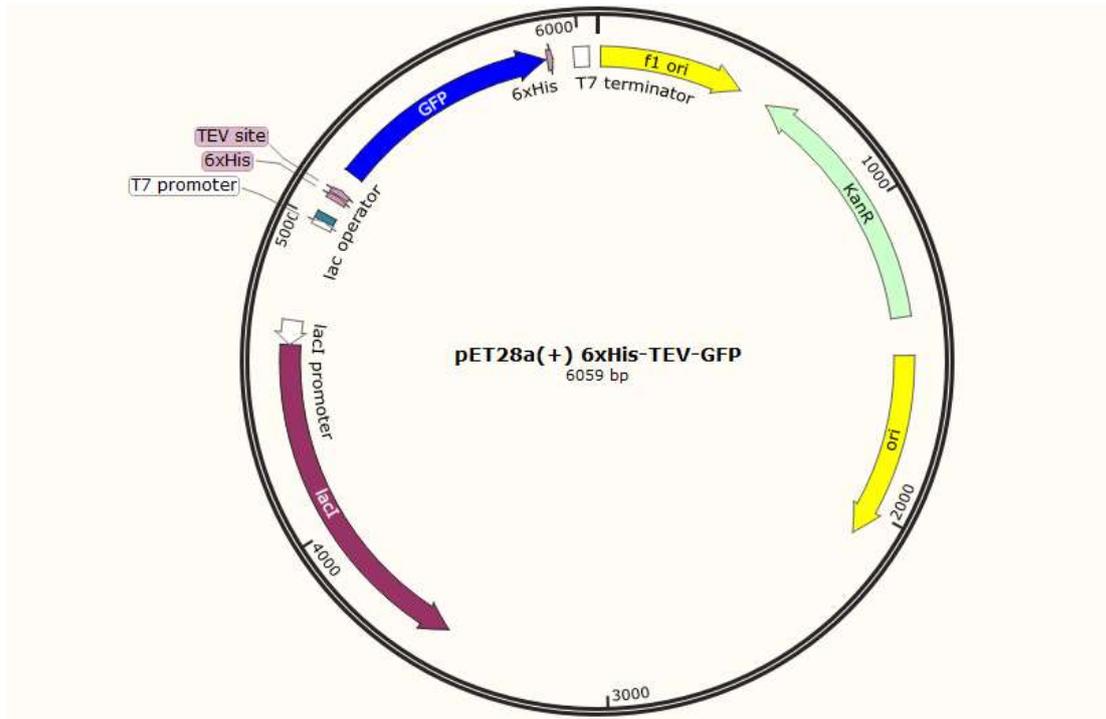


FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO DO VETOR PARA EXPRESSÃO EM *E.coli* pET28a-TEV-GFP. O pET28a-TEV-GFP possui um tamanho de 6059 pares de base (pb), e será utilizado para a clonagem da EPR, EGF e TGF α em fusão com a GFP. Legenda: f1 ori (origem de replicação), GFP (do inglês *green fluorescent protein*), ori (origem de replicação), *lacI* (repressor *lac*), T7 promoter (promotor T7), *lac operator* (operador *lac*), 6xHis (cauda hexahistidina), TEV site (sítio TEV), T7 terminator (terminador T7) KanR (gene de resistência a canamicina) e *lacI* promoter (promotor *lac*) (O AUTOR, 2017).

3.7 OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS

Foram utilizados diversos oligonucleotídeos para a realização das clonagens dos genes da cadeia leve e pesada do Fab anti-EPR em vetores para expressão em leveduras, dos fatores de crescimento TGF α , EPR e EGF em fusão com a GFP e também para confirmar a presença dos insertos de interesse após as etapas de clonagem. Todos os oligonucleotídeos foram desenhados pelo Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin, pesquisador do Instituto Carlos Chagas-FIOCRUZ/PR, e sintetizados pela

empresa Sigma-Aldrich. O Quadro 1 mostra a identificação, sequência e aplicação de cada um deles.

NOME DO INICIADOR	SEQUÊNCIA (5' → 3')	APLICAÇÃO
EH-Forward	CCAAAACAACCTCCACCTTCTGTATA	Iniciador de PCR para amplificação da cadeia EH a partir da extremidade 5'
EL-Forward	TACTATTACGTGTAAGGCTTCGCA	Iniciador de PCR para amplificação da cadeia EL a partir da extremidade 5'
3' AOX 1	CTCAGGCAAATGGCATTCTGACATCC	Iniciador de PCR para amplificação da cadeia EH e EL a partir da extremidade 3' da região do promotor AOX1
EGF-Forward	TATACCATGGGAAATAGTGATTCTGAG TGTCCTTATC	Iniciador de PCR para amplificação do EGF a partir da extremidade 5'
EGF-Reverse	TATAAAGCTTTCGAAGTCCCACCACT TCAGGTC	Iniciador de PCR para amplificação do EGF a partir da extremidade 3'
TGF α -Forward	TATACCATGGTAGTCTCCCACCTTCAAC GATTGTC	Iniciador de PCR para amplificação do TGF α a partir da extremidade 5'
TGF α -Reverse	TATACCATGGTAGTCTCCCACCTTCAAC GATTGTC	Iniciador de PCR para amplificação do TGF α a partir da extremidade 3'
EPR-Forward	TATAAAGCTTAGCAAGTAAGTCAGCGT GCTCACA	Iniciador de PCR para amplificação da EPR a partir da extremidade 5'. Também insere o sítio de restrição para <i>NcoI</i> .
EPR-Reverse	ATAAAGCTTCAGGAAAAAGTGCTCGCA GCGAAC	Iniciador de PCR para amplificação da EPR a partir da extremidade 3'. Também insere o sítio de restrição para <i>HindIII</i> .
GFP 13-7 Reverse	CTAGCTCGAGGGCTTTATACAGTTCAT CCATGCCCAGC	Iniciador de PCR para amplificação da GFP a partir da extremidade 3'

QUADRO 1 – IDENTIFICAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS, SUAS SEQUÊNCIAS E APLICAÇÃO

FONTE: O autor (2017)

3.8 SEQUÊNCIA DOS GENES DA CADEIA PESADA E LEVE DO FAB ANTI-EPR

As sequências de DNA dos genes da cadeia leve e da cadeia pesada do Fab anti-EPR, utilizadas neste projeto, são provenientes do trabalho publicado por Kado e colaboradores em 2015 e encontram-se disponíveis no Banco de Dados de Proteína (do inglês *Protein Data Bank – PDB*) sob o código de identificação 5AZ2.

Os genes de cada cadeia foram sintetizados e inseridos separadamente no vetor pUC57, através do sítio de clonagem *SmaI*, pela empresa *Genscript*.

3.9 REAÇÕES DE DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Para as digestões diagnósticas foi utilizada uma unidade de enzima de restrição (New England BioLabs), até 1 µg de DNA plasmideal, tampão recomendado pelo fabricante na concentração final de 1x e água ultrapura para um volume final de 10 µL. As reações foram incubadas por 16 horas a 37 °C.

Para obtenção de DNA para ligação foram utilizadas as mesmas condições mencionadas acima com exceção do volume final das reações utilizado, que foi de 25 µL.

3.10 REAÇÕES DE LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

As reações de ligação inserto-vetor foram realizadas utilizando uma razão molar de DNA de 3:1 respectivamente, 0,5 µL da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), tampão de ligação (Invitrogen) na concentração final de 1x e água ultrapura para um volume final de 15 µL. As reações foram incubadas por 16h à 4 °C por 16h.

3.11 ELETROFORESE DE DNA

Para verificar a integridade dos DNAs plasmideais, confirmar as digestões com enzimas de restrição e verificar a amplificação das sequências de DNA submetidas a reações de PCR, foram realizadas corridas de eletroforese em gel de agarose 1% de acordo com protocolo estabelecido em manual de laboratório (SAMBROOK e

RUSSELL, 2001). As amostras foram diluídas em tampão de amostra para uma concentração final de 1x, a eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X a 100 V e o tempo de corrida foi de aproximadamente uma hora. Os géis foram expostos a solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 10 minutos e visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador. O perfil eletroforético foi registrado em sistema de vídeo documentação L-PIX EX (Loccus).

3.12 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA DO GEL DE AGAROSE

Os DNAs utilizados para as subclonagens foram digeridos e aplicados em gel de agarose conforme especificações do item 3.11 desta seção. Após confirmação visual do perfil de restrição, as bandas referentes aos insertos ou vetores digeridos foram cortadas do gel e purificadas utilizando o kit *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen).

3.13 TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli* POR CHOQUE TÉRMICO

As transformações de *E. coli*, foram realizadas utilizando as cepas DH5α e BL21 Star (DE3). Para o processo, foi adicionada quantidade correspondente a 50 ng de DNA plasmideal, ou 15 µL da reação de ligação, em uma solução contendo 70 µL de células termocompetentes. Em seguida, a solução foi incubada no gelo por 15 minutos, seguido de choque térmico a 42°C por 60 segundos e retorno ao gelo por mais 2 minutos. Por fim, foi adicionado 1 mL de meio LB sem antibiótico a cada tubo de células transformadas, as quais foram mantidas a 37° C sob agitação de 200 rpm por 1 hora, para recuperação da membrana celular das bactérias. Em seguida, foram plaqueados 100 µL do volume do tubo em placas de meio LB-ágar contendo os antibióticos adequados. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

3.14 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDEAL EM PEQUENA ESCALA

Para confirmação dos clones positivos, o DNA plasmideal foi purificado a partir do método de lise alcalina. Bactérias contendo o plasmídeo de interesse foram

inoculadas em 4 mL de meio LB, contendo o antibiótico adequado, e cultivadas por 16 horas a 37° C sob uma agitação de 200 rpm. Então, os 4 mL de cultura foram transferidos para microtubos de 2 mL e centrifugados a 10.000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 250 µL do tampão GET. Em seguida, foram adicionados 250 µL do tampão de lise e a solução foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Após a lise, foram adicionados 250 µL da solução de acetato de potássio (CH₃CO₂K) gelado e as amostras foram mantidas no gelo por mais 3 minutos e centrifugadas por 15 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um microtubo novo onde foram adicionados 360 µL de isopropanol. A mistura foi mantida no gelo por 15 minutos e então centrifugada por mais 10 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante foi então descartado e 1 mL de etanol 70% foi adicionado ao pellet, seguido de uma etapa de centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos. Por último, o sobrenadante foi descartado e os microtubos foram deixados abertos a temperatura ambiente até secarem. Os pellets foram ressuspensos em 30 µL de água ultrapura.

Para outras finalidades, o DNA plasmideal foi extraído através do kit *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen).

3.15 TRANSFORMAÇÃO DE *P. pastoris* COM CLORETO DE LÍTIO

Afim de facilitar os eventos de recombinação homóloga, para a geração de transformantes em *P. pastoris*, é importante realizar a transformação com o vetor na sua forma linear. As reações de linearização foram realizadas com a enzima *SacI* (ThermoFisher Scientific). Aproximadamente 10 µg do DNA plasmideal foram submetidos a reação de digestão por aproximadamente 2h a 37 °C. Foram utilizadas 10 unidades da enzima em um volume final de reação de 100 µL.

As transformações de *P. pastoris*, cepa GS115, foram realizadas seguindo o protocolo de transformação por cloreto de lítio descrito no manual do fabricante do vetor de expressão "*Pichia Expression Kit for expression of recombinant proteins in Pichia pastoris*" (Invitrogen). Primeiramente, para a preparação de células quimiocompetentes, uma cultura de 50 mL de *P. pastoris* foi cultivada em meio YPD a 30° C e sob agitação de 200 rpm até atingir uma DO₆₀₀ entre 0,8 e 1,0. Em seguida, as células foram centrifugadas a uma velocidade de 3.000 x g por 10 minutos, lavadas

com 25 mL de água estéril e centrifugadas novamente. As células foram então ressuspendidas em 1 mL de cloreto de lítio 100 mM, centrifugadas e ressuspendidas em 400 μ L de cloreto de lítio 100 mM. Para cada transformação, 50 μ L dessa solução foram centrifugados e o cloreto de lítio removido. Foram adicionados, nesta ordem, 240 μ L de polietileno glicol (PEG-3350) 50%, 36 μ L de cloreto de lítio 1 M, 25 μ L de DNA de esperma de salmão desnaturado (2 mg/mL) e 10 μ g de DNA plasmideal de ambos os vetores, pPIC9K e pPICZ α A, para ressuspende as células. Então, a reação foi imediatamente incubada a 30°C por 30 minutos e em seguida a 42°C por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados a 8.000 x g e o pellet ressuspendido em 1 mL de água estéril. Por fim, 200 μ L da transformação foram plaqueados em placas MD contendo 1 mg/mL de Zeocina™ e as placas foram incubadas por três dias a 30°C.

3.16 TESTES DE EXPRESSÃO EM *Pichia pastoris*

Os testes de expressão do Fab anti-EPR foram realizados seguindo orientação do manual do fabricante do vetor de expressão "*Pichia expression kit for expression of recombinant proteins in Pichia pastoris*" (Invitrogen). Colônias dos clones transformantes foram inoculadas em 25 mL do meio BMGY, a 30° C e sob agitação de 200 rpm, até a cultura atingir uma DO₆₀₀ entre 2,0 e 6,0. As células então foram centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, o pellet foi ressuspendido em meio BMMY para uma DO₆₀₀ de 1,0 e as culturas retornaram à incubação a 30° C e agitação de 200 rpm. A expressão foi induzida com a adição de metanol 100% a cada 24 horas, para uma concentração final de 0,5%, durante quatro dias. Foram coletadas amostras de 1 mL ao final do quarto dia de indução, as quais foram posteriormente centrifugadas a fim de separar o meio das células. Como os vetores utilizados possuem o peptídeo sinal para secreção das proteínas para o meio (fator α), as proteínas do meio foram precipitadas com o ácido tricloroacético (TCA), item 3.22 desta seção, e analisadas através de gel desnaturante de poliácridamida 13%.

3.17 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

As amostras de proteínas precipitadas foram ressuspensas em 50 µl de tampão de amostra para proteína 4x e aquecidas a 95° C por 10 minutos. As amostras foram então aplicadas em gel de poliacrilamida (13% ou 15%) e a corrida foi realizada em tampão de eletroforese para SDS-PAGE. Foi aplicada uma voltagem de 180 V por 50 minutos e após a corrida, o gel foi corado com *Comassie brilliant blue* R-250 por 20 minutos e descorado, utilizando a solução descorante, para visualização das bandas.

3.18 TESTES DE EXPRESSÃO EM *Escherichia coli*

Para os testes de expressão da EPR, EGF e TGF α as colônias isoladas de células transformadas foram inoculadas em 5 mL de meio líquido LB, contendo o antibiótico adequado, e incubadas sob agitação a 37 °C por 16-18 horas. No dia seguinte, as culturas foram diluídas numa proporção de 1:100 (volume final de 50 mL) e crescidas a 37 °C sob agitação, até atingirem uma absorbância, a 600 nm (A_{600}), de aproximadamente 0,6. Em seguida, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado às culturas para uma concentração final de 0,5 mM. A partir desta etapa, as culturas foram submetidas a diferentes tempos de cultivo e temperaturas, 15 °C, 25 °C e 37 °C por 24 horas, 16 horas e 4 horas respectivamente, a fim de se encontrar a condição para melhor nível de expressão das proteínas.

Para analisar a solubilidade das proteínas recombinantes, os precipitados bacterianos resultantes dos testes de expressão foram ressuspensos em 3 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,2 mM NaCl) e as células lisadas através da adição de lisozima (200 µg/mL). As frações solúveis e insolúveis dos produtos foram separadas por centrifugação durante 20 minutos a velocidade de 10.000 rpm e temperatura de 4 °C. Visualizaram-se as amostras obtidas em gel desnaturante de poliacrilamida 13%.

3.19 SELEÇÃO DE TRANSFORMANTES

Após a primeira etapa de seleção dos clones transformantes, clones que continham os DNAs de ambas as cadeias do anticorpo Fab anti-EPR, através da placa MD com 1 mg/mL de Zeocina™, foram realizadas mais três etapas de seleção por antibiótico, com o intuito de selecionar as colônias que continham um maior número de cópias dos insertos integrados no genoma da *P. pastoris*. Em cada rodada, as colônias foram replaqueadas em placas MD contendo 1 mg/mL de Zeocina™ e 1mg/mL de G418.

3.20 EXTRAÇÃO DNA GENÔMICO DE *P. pastoris*

Foram coletados 200 µL da cultura de levedura cultivada em meio MD a uma DO₆₀₀ de 0,4, e centrifugada a 3.000 x g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e as células foram então ressuspensas em 10 µl de uma solução de acetato de lítio 200 mM + 1% SDS. Em seguida, as amostras foram incubadas a 70° C por 5 minutos. Então, foram adicionados 300 µL de etanol 96% e agitado em vórtex por 30 segundos. As células foram centrifugadas a 13.000 x g por 5 minutos e, em seguida, lavadas com 300 µL de etanol 70% e centrifugado novamente a 13.000 x g por mais 3 minutos. O pellet então foi dissolvido em 100 µl de água ultrapura e seguida de uma breve centrifugação de 15 segundos. Foram usados 5 µl do sobrenadante para a reação de PCR.

3.21 PCR DO DNA GENÔMICO DE *P. pastoris*

Além da seleção por meio de antibióticos, também foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction- PCR*) para determinar se os genes de interesses realmente haviam sido integrados no genoma da *P. pastoris*. As reações de amplificação foram feitas em termociclador *ProFlex™ 3 x 32-well PCR System* (Applied Biosystems®) e os sistemas de reação continham 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase (IBMP), 5 µL de tampão de PCR 10X (Invitrogen®), 1 µL de uma mistura contendo 100 mM de dNTPs (25 mM de cada), 5 µL de DNA

genômico, 2,5 μ M dos primers iniciador 5' AOX1 e iniciador 3' AOX1 e água ultrapura para um volume final de 50 μ L. Os parâmetros de ciclos de amplificação utilizados foram: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos, 35 ciclos de etapas consecutivas de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento 55° C durante 1 minuto e extensão 72° C por 1 minuto e após esses ciclos uma etapa de extensão final a 72° C por 7 minutos.

3.22 PRECIPITAÇÃO COM ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA)

Foram adicionados 5% de TCA nas alíquotas de 1 mL de meio de cultivo coletadas durante os testes de expressão em *P. pastoris*. Em seguida, as amostras foram mantidas em gelo durante 30 minutos e após esse período foram centrifugadas a 20.000 x g em uma temperatura de 4° C por mais 30 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o pellet foi lavado com 1 mL de acetona 100% gelada. Essa etapa de lavagem foi repetida por mais duas vezes e ao final os pellets foram deixados secando até que a acetona evaporasse completamente. Uma vez secos, os pellets foram ressuspensos em 50 μ L de tampão de amostra para proteína 4x. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 95 °C antes de serem aplicadas no gel.

3.23 CROMATOGRAFIA

Os testes de purificação da EPR foram realizados através de cromatografia de afinidade a níquel seguida de cromatografia por troca iônica. Para a cromatografia de afinidade foram utilizados 40mL da fração solúvel do lisado de cultura de *E. coli*, a coluna HiTrap HP 1mL (GE Healthcare) e o sistema de purificação ÄKTA (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com 5 CV (volumes de coluna) do tampão de corrida (20mM Tris-HCl pH 7.4, 300mM NaCl, 20mM Imidazol), a proteína foi eluída com 10 CV de tampão de eluição (20mM Tris-HCl pH 7.4, 300mM NaCl, 500mM Imidazol) e foram coletadas frações de 1mL do eluato. Para finalizar, a coluna foi reequilibrada com o tampão de corrida, e as diversas frações coletadas foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 13%.

A cromatografia de troca iônica por sua vez, foi realizada utilizando-se quatro resinas diferentes: DEAE-Sepharose, Q-Sepharose, SP-Sepharose, Heparina-

Sepharose, sendo as duas primeiras aniônicas e as duas últimas catiônicas. Primeiramente, cerca de 30 µg de proteína das amostras provenientes da cromatografia de afinidade foram incubadas em 50µL de resina. Em seguida, foram realizadas três lavagens com tampão A e posteriormente duas eluições com tampão B (quadro 2). As frações obtidas foram analisadas em gel de SDS-PAGE 13%.

Tampão A resinas DEAE e Q	20mM Tris-HCl pH=8.0, 50mM NaCl, 7mM β-mercaptoetanol
Tampão A resinas SP e Heparina	20mM tampão fosfato pH=6.8, 50mM NaCl, 7mM β-mercaptoetanol
Tampão B resinas DEAE e Q	Tampão A + 1 M NaCl
Tampão B resinas SP e Heparina	Tampão A + 1 M NaCl

QUADRO 2 - COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS NA CROMATOGRÁFIA DE TROCA IÔNICA

FONTE: O autor (2017)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DOS GENES DA CADEIA PESADA E LEVE DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-EPR

Para a expressão heteróloga das cadeias leve e pesada do fragmento Fab do anticorpo anti-EPR em *P. pastoris*, tendo em vista que as sequências de DNA são de origem murina, ambos os genes sintéticos foram primeiramente otimizados pelo professor Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin, pesquisador do Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR, através do software Leto 1.2.14 – Entelechon. Os parâmetros das sequências otimizados foram: repetições em tandem de códons, o uso de códons ótimos, estruturas secundárias do RNA, distribuição das bases nitrogenadas GC e pautas de leitura aberta (do inglês *ORF - Open reading frame*) secundárias.

Após a otimização, os genes de cada cadeia foram sintetizados e inseridos separadamente no vetor pUC57, através do sítio de clonagem *SmaI*, pela empresa *Genscript*. As construções receberam as seguintes denominações: pUC57-EL para o gene da cadeia leve e pUC57-EH para o gene da cadeia pesada (figuras 11 e 12).

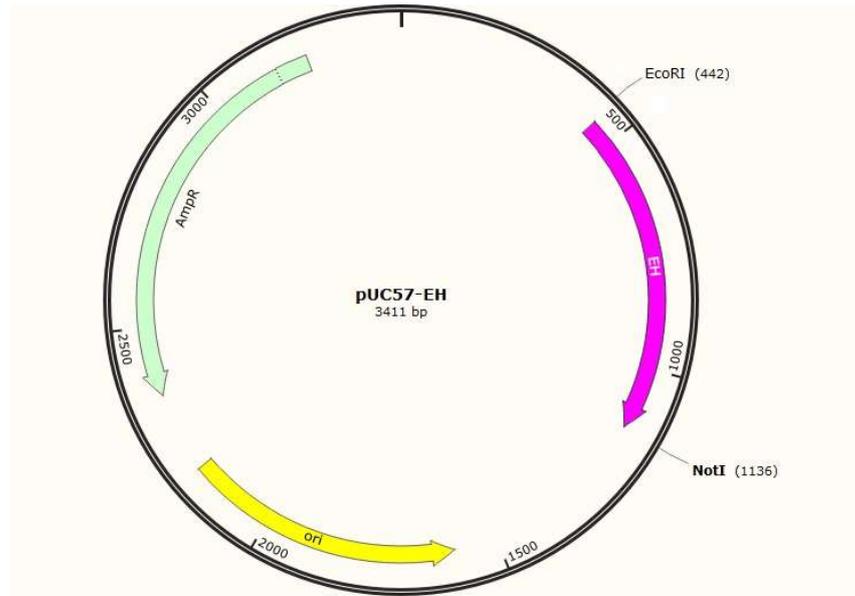


FIGURA 11 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO PLASMÍDEO pUC57-EH. O gene sintético da cadeia pesada do fragmento Fab do anticorpo anti-EPR (EH) foi subclonado no vetor comercial pUC57, gerando uma construção contendo 3411 pares de base. Os sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* foram utilizados para clonar o inserto no vetor de expressão em leveduras pPIC9K. Legenda: ori (origem de replicação), AmpR (gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina) (O AUTOR, 2017).

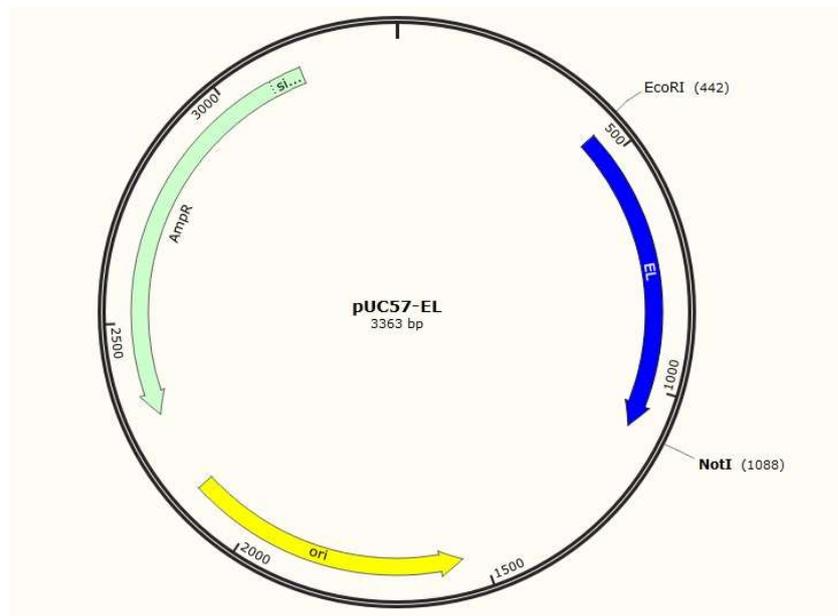


FIGURA 12 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO PLASMÍDEO pUC57-EL. O gene sintético da cadeia leve do fragmento Fab do anticorpo anti-EPR (EL) foi subclonado no vetor comercial pUC57, gerando uma construção contendo 3363 pares de base. Os sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* foram utilizados para clonar o inserto no vetor de expressão em leveduras pPICZαA. Legenda: ori (origem de replicação), AmpR (gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina) (O AUTOR, 2017).

4.2 CLONAGEM DOS GENES DAS CADEIAS LEVE E PESADA DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-EPR EM VETORES PARA EXPRESSÃO EM LEVEDURA

Os genes da cadeia leve e pesada do fragmento Fab do anticorpo anti-EPR foram retirados do vetor pUC57, através da digestão dos plasmídeos pUC57-EH e pUC57-EL com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*, para serem clonados em vetores para expressão em *P. pastoris*.

Após a reação de digestão enzimática, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% e o perfil eletroforético resultante pode ser observado na figura 13. Os fragmentos de DNA liberados, correspondentes as cadeias leve (EL) e pesada (EH), possuem o tamanho esperado de 646 e 649 pares de base respectivamente.

Já os fragmentos referentes ao vetor pUC57 sem os insertos, pode ser observado na parte superior da imagem, e possuem o tamanho esperado de 2.717 pares de base. Esse resultado confirma também que as construções sintéticas encomendadas estavam corretas. Após confirmação, o DNA dos insertos foi extraído do gel de agarose e purificado.

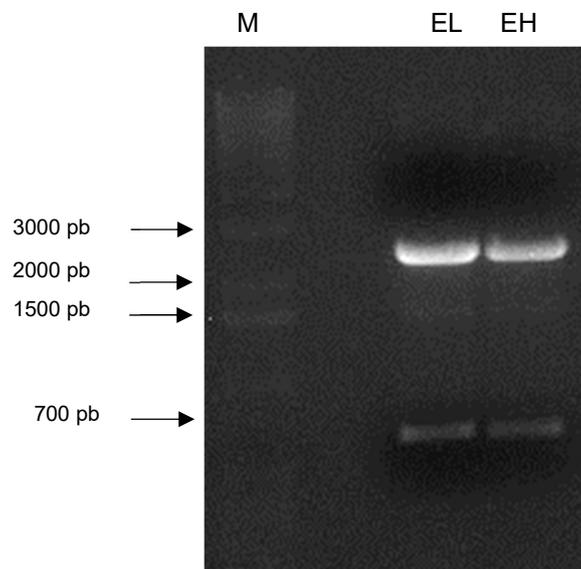


FIGURA 13 - ANÁLISE ELETROFORÉTICA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pUC57-EL E pUC57-EH PARA CLONAGEM DOS GENES DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-EPR EM VETOR DE EXPRESSÃO DE LEVEDURAS. Gel de agarose 1% das amostras pUC57-EL (EL) e pUC57-EH (EH) digeridas com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. Os fragmentos de DNA referentes aos genes da cadeia leve e pesada encontram-se próximo a banda do marcador de DNA de 700 pares de base (pb), possuindo o tamanho esperado de 646 e 649 pb respectivamente. O fragmento de DNA correspondente ao vetor pUC57 pode ser observado entre as bandas do marcador de DNA de 2000 e 3000 pb, e possui o tamanho esperado de 2717 pb.

O próximo passo no processo de clonagem foi a inserção dos insertos purificados nos vetores para expressão em *P. pastoris*, os quais também foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* (figura 14), gerando assim extremidades complementares para possibilitar a ligação inserto-vetor.

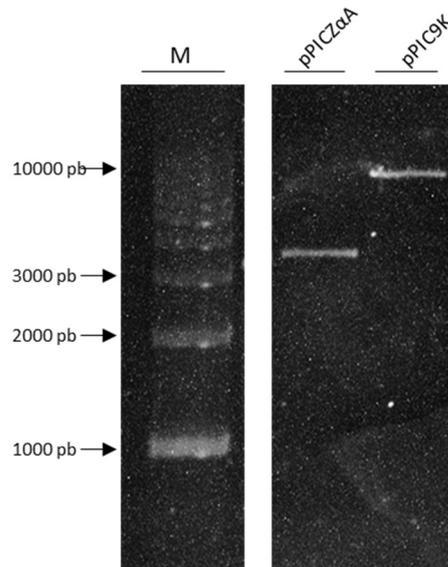


FIGURA 14 – ANÁLISE ELETROFORÉTICA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DOS VETORES pPICZ α A e pPIC9K. Gel de agarose 1% dos plasmídeos pPICZ α A e pPIC9K digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. As bandas visualizadas no gel correspondem aos tamanhos esperados de 3500 e 9200 pares de base (pb) aproximadamente. O marcador de DNA está representado pela letra M.

O gene da cadeia pesada foi clonado no vetor pPIC9K e o da cadeia leve no vetor pPICZ α A. Ambos os vetores foram escolhidos por possuírem o sinal de secreção do fator α , o qual direciona o anticorpo para secreção no meio de cultivo. Além disso, os vetores possuem marcas de seleção diferentes (quadro 3), tornando possível selecionar apenas os clones que contenham as duas cadeias.

Vetor	Organismo de seleção	Marca de seleção
pPIC9K	Bactéria	Resistência a ampicilina
	Levedura	Resistência a G418 e marca de auxotrofia para histidina
pPICZ α A	Bactéria	Resistência a Zeocina [™]
	Levedura	

QUADRO 3 – MARCAS DE SELEÇÃO DOS VETORES pPIC9K e pPICZ α A

FONTE: Invitrogen (2017)

Após a etapa de ligação dos fragmentos, as novas construções passaram a ser denominadas: pPIC9K-EH e pPICZ α -EL (figura 15 e 16).

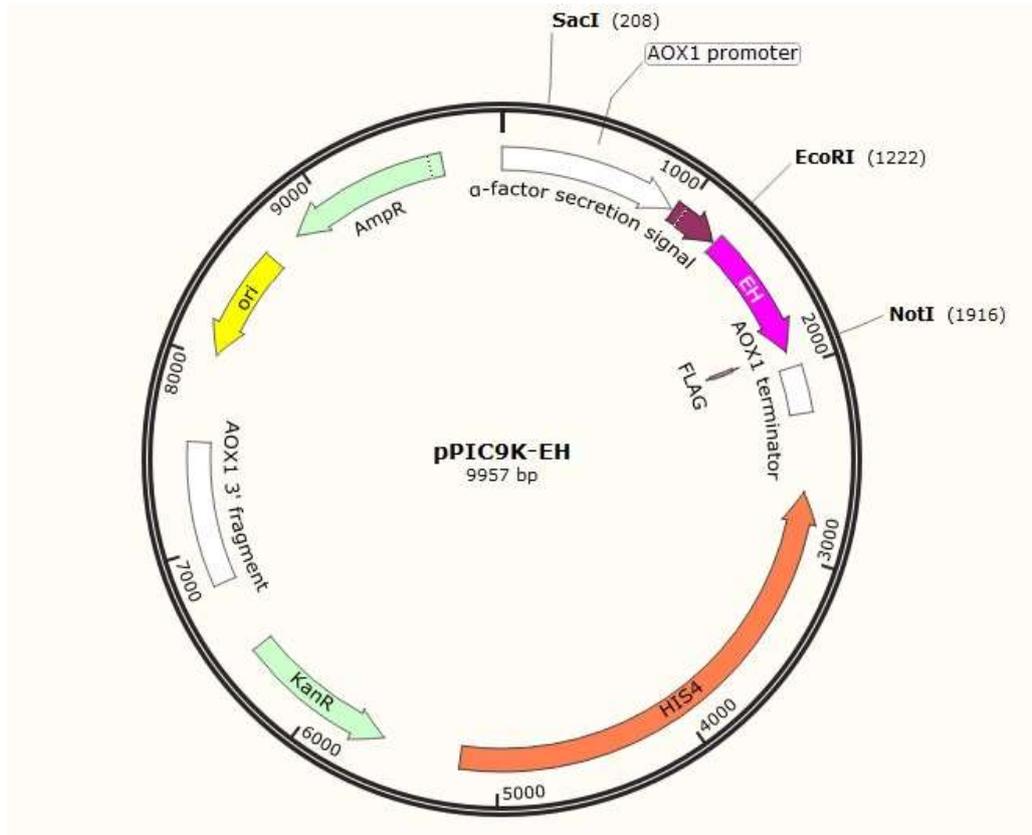


FIGURA 15 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO PLASMÍDEO pPIC9K-EH. O gene sintético da cadeia pesada do Fab anti-EPR (EH) foi clonado no vetor comercial pPIC9K, gerando uma construção contendo 9957 pares de base (pb). Os sítios das enzimas de restrição utilizados na clonagem foram os de *EcoRI* e *NotI*. Legenda: ori (origem de replicação), AmpR (gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina em bactérias), HIS4 (gene da enzima histidinol desidrogenase), KanR (gene que confere resistência ao antibiótico G418 em leveduras), AOX1 3' fragment (fragmento da sequência do gene do promotor AOX1), FLAG (polipeptídeo de fusão utilizado como tag), AOX1 terminator (terminador do gene AOX1), AOX1 promoter (promotor do gene AOX1) e α -factor secretion signal (sinal de secreção do fator α).

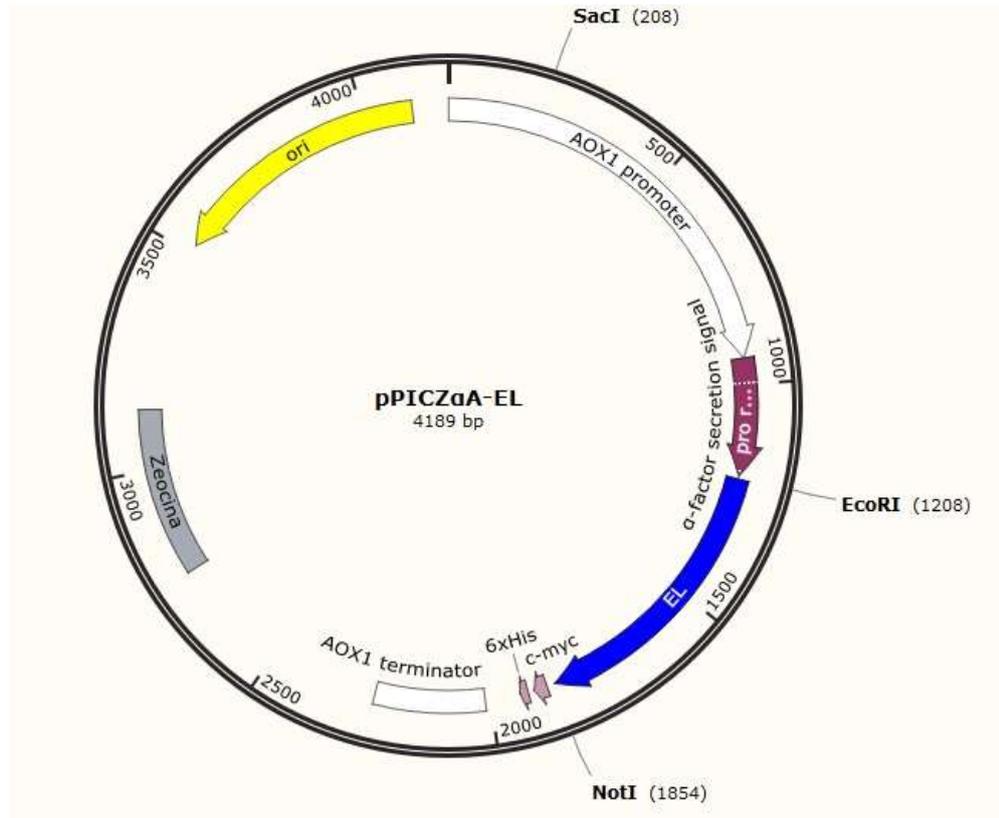


FIGURA 16 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO PLASMÍDEO pPICZ α A-EL. O gene sintético da cadeia pesada do Fab anti-EPR (EH) foi subclonado no vetor comercial pPICZ α A, gerando uma construção contendo 4189 pares de base. Os sítios das enzimas de restrição utilizados na clonagem foram os de *EcoRI* e *NotI*. Legenda: ori (origem de replicação), Zeocina™ (gene que confere resistência ao antibiótico Zeocina™), AOX1 terminator (terminador do gene AOX1), AOX1 promoter (promotor do gene AOX1), α -factor secretion signal (sinal de secreção do fator α), c-myc (epítipo da proteína c-myc) e 6xHis (sequência de seis histidinas).

Em seguida, os plasmídeos foram transformados em *E. coli* cepa DH5 α e, a seleção dos transformantes foi realizada em meio contendo ampicilina, para a construção pPIC9K-EH, e Zeocina™ para a construção pPICZ α A-EL.

4.3 CONFIRMAÇÃO DOS CLONES POSITIVOS: pPIC9K-EH E pPICZ α A-EL

Com o intuito de confirmar quais colônias possuíam os vetores com os insertos, foram selecionadas oito colônias de cada placa para extração e digestão do DNA plasmideal.

As colônias foram inoculadas em meio de cultivo LB por 16 horas. Após esse período, o DNA plasmideal foi extraído e submetido a uma digestão diagnóstica com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. Os clones positivos, ou seja, aqueles que contém os insertos correspondentes aos genes EL e EH, liberam fragmentos de 646 e 694 pares de base respectivamente.

As figuras 17 e 18 demonstram o resultado das digestões diagnósticas, tendo sido confirmados seis clones para a construção da cadeia leve e oito clones para a construção da cadeia pesada.

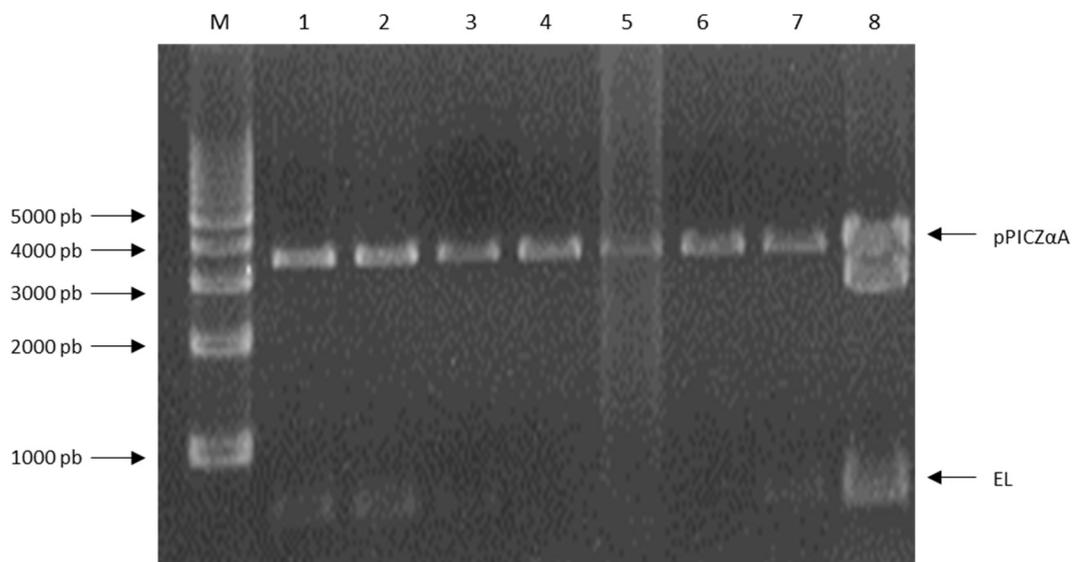


FIGURA 17 – ANÁLISE ELETROFORÉTICA DO GENE DA CADEIA LEVE DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-EPR EM VETOR DE EXPRESSÃO DE LEVEDURA pPICZαA. Gel de agarose 1% da digestão do DNA do plasmídeo pPICZαA-EL com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. Foram testados oito clones (1-8) sendo que destes, seis (1-4, 7 e 8) liberaram o inserto, correspondente ao gene da cadeia leve (EL), no tamanho esperado de aproximadamente 646 pares de base (pb). As bandas visualizadas na parte superior do gel correspondem ao vetor pPICZαA (3543 pb). O marcador de DNA corresponde a letra M.

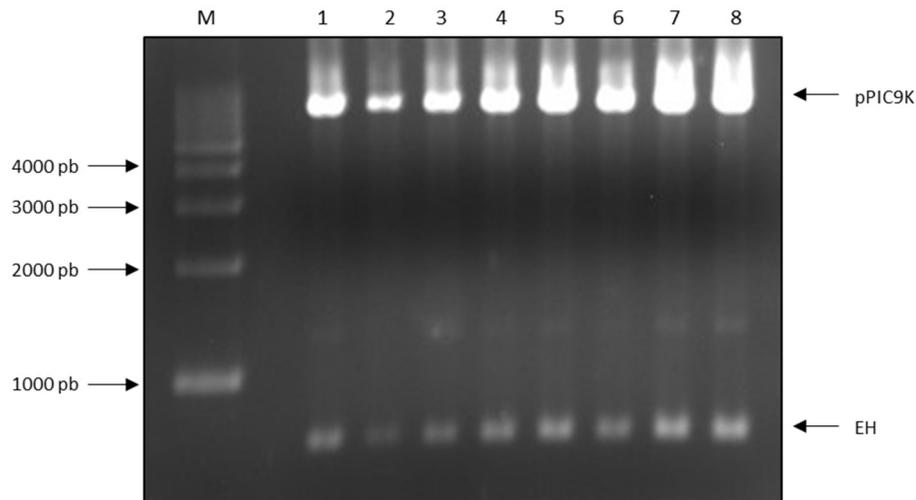


FIGURA 18 – ANÁLISE ELETROFORÉTICA DO GENE DA CADEIA PESADA DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-EPR EM VETOR DE EXPRESSÃO DE LEVEDURA pPIC9K. Gel de agarose 1% da digestão do DNA do plasmídeo pPIC9K-EH com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. Foram testados oito clones (1-8) sendo que todos liberaram o inserto, correspondente ao gene da cadeia leve (EH), no tamanho esperado de aproximadamente 649 pares de base (pb). As bandas visualizadas na parte superior do gel correspondem ao vetor pPIC9K (9308 pb). O marcador de DNA corresponde a letra M.

Após a confirmação dos clones positivos através das reações diagnósticas, foram selecionados o clone 2, contendo a cadeia leve, e o clone 7, contendo a cadeia pesada, para serem utilizados nos experimentos em *P. pastoris*. O DNA de ambos os clones foi sequenciado e as sequências de nucleotídeos obtidas encontravam-se corretas.

4.4 TRANSFORMAÇÕES DOS PLASMÍDEOS pPIC9K-EH E pPICZ α A-EL EM *P. pastoris*

Primeiramente, afim de facilitar e estimular os eventos de recombinação homóloga para integração do DNA plasmideal no genoma de *P. pastoris*, o DNA das construções pPICZ α A-EL e pPIC9K-EH foi linearizado através da enzima de restrição *SacI*. A linearização com essa enzima promove a inserção na região 5' do promotor *AOX1*, gerando transformantes com fenótipo His⁺ Mut⁺ (item 3.4.2) em células da cepa GS115.

Após confirmação de que os plasmídeos foram linearizados (figura 19), ambos foram cotransformados em células da cepa GS115 competentes, através do protocolo de transformação (item 3.15 da seção materiais e métodos).

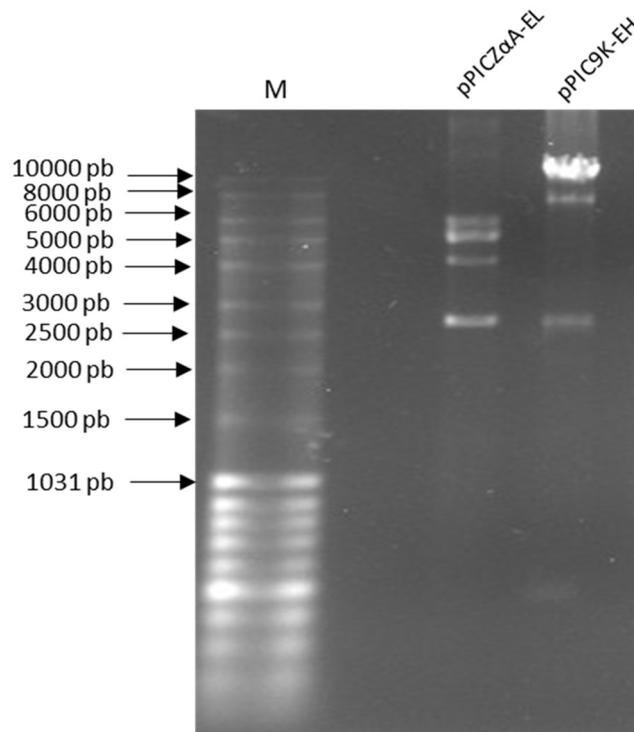


FIGURA 19 - ANÁLISE ELETROFORÉTICA DA LINEARIZAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES pPICZ α A-EL E pPIC9K-EH. Gel de agarose 1% da digestão das construções pPICZ α A-EL e pPIC9K-EH com a enzima de restrição *SacI*. A digestão com essa enzima promove a linearização dos vetores, como pode ser observado na figura (bandas correspondentes a 4189 e 9957 pares de base (pb) respectivamente) para transformação em *P. pastoris*. O marcador de DNA corresponde a letra M.

4.5 SELEÇÃO DE COLÔNIAS DE *P. pastoris* QUE CONTINHAM OS GENES EH E EL INTEGRADOS NO GENOMA

A *P. pastoris* é capaz de integrar múltiplas cópias do DNA transformado em seu genoma. Apesar de os mecanismos exatos de como isso acontece ainda não serem conhecidos, sabe-se que esses múltiplos eventos de recombinação ocorrem em regiões de homologia entre a sequência de DNA e o genoma da levedura (AHMAD *et al.*, 2014).

Bons níveis de expressão de proteínas recombinantes dependem da utilização de clones que possuam múltiplas cópias do gene de interesse. Com o intuito de selecionar as colônias que continham um maior número de cópias dos insertos

integrados no genoma de *P. pastoris*, foram realizadas três rodadas de seleção por antibiótico. Em cada rodada as colônias foram plaqueadas em placas MD contendo 1 mg/mL de zeocina e 1mg/mL de G418 (figura 20).

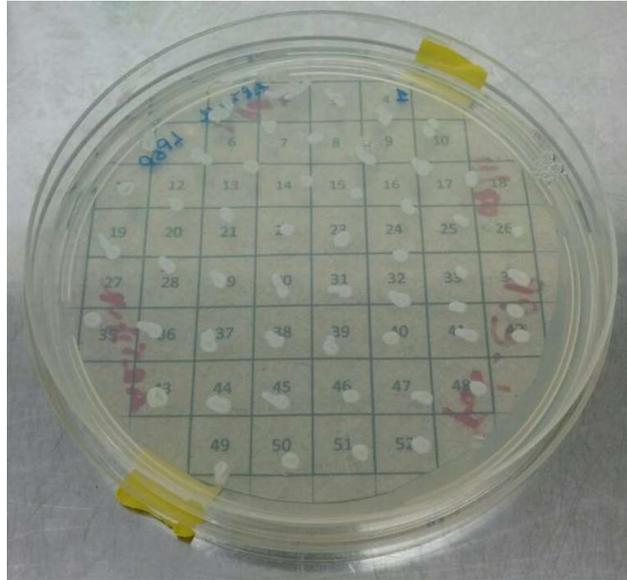


FIGURA 20 - PLACA DOS CLONES DE *P. pastoris* TRANSFORMADOS COM OS PLASMÍDEOS pPICZ α A-EL E PPIC9K-EH. As colônias de *P. pastoris* transformadas com os plasmídeos pPICZ α A-EL E PPIC9K-EH foram submetidas a três rodadas de seleção por antibiótico. Em cada etapa elas foram plaqueadas em placas contendo 1mg/mL de G418 e 1mg/mL de Zeocina™.

4.6 REAÇÕES DE PCR PARA CONFIRMAR A PRESENÇA DOS GENES DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-EPR NO GENOMA DE *P. pastoris*

Ao final da terceira rodada de seleção, o DNA genômico de 06 clones (que foram escolhidos de forma aleatória) foi extraído para confirmação da presença dos genes da EH e EL utilizando a técnica de PCR.

Conforme demonstra a figura 21, quatro dos seis clones testados apresentavam os genes de ambas as cadeias integrados em seu genoma.

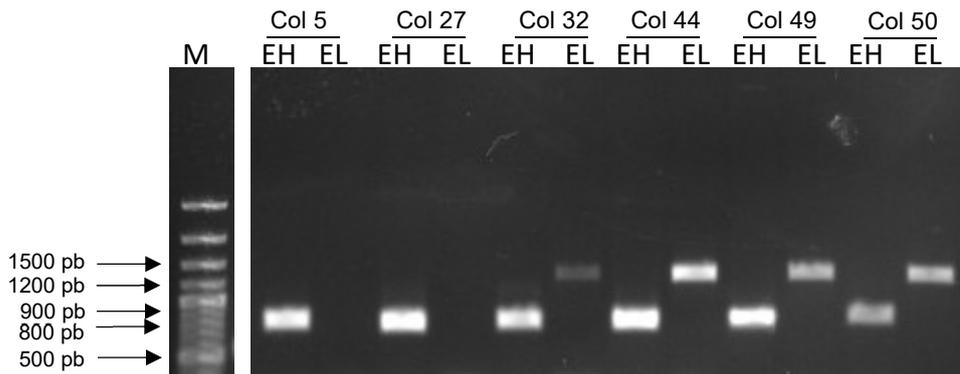


FIGURA 21 – ANÁLISE ELETROFORÉTICA DAS REAÇÕES DE PCR PARA CONFIRMAR A PRESENÇA DOS GENES DAS CADEIAS LEVE E PESADA DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-EPR NO GENOMA DE *P. Pastoris*. Foram testadas através de PCR as cadeias pesadas (EH) e leves (EH) de seis colônias de *P. pastoris* (Col 5, 27, 32, 44, 49 e 50), onde quatro (Col 32, 44, 49 e 50) apresentaram os amplicons para as duas cadeias do tamanho esperado. O marcador de DNA está representado em M.

4.7 TESTES DE EXPRESSÃO DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-EPR EM *P. pastoris*

Após confirmação das colônias que continham os genes do Fab, foram iniciados os testes de expressão. A figura 22 mostra o teste de expressão realizado a 30°C, durante 4 dias e com a adição de 0.5% de metanol no meio de cultivo, para indução da expressão, a cada 24 horas. Como o Fab possui uma sequência sinal para secreção, esperava-se encontrar a proteína no meio de cultura. Por isso, ao final do quarto dia de indução, o meio foi coletado e as proteínas foram precipitadas com TCA (item 3.22).

No controle positivo (clone expressando o fragmento Fab do anticorpo Palavizumabe) representado por ++, pode observar-se a banda referente ao anticorpo expresso próximo a massa molecular de 40 kDa. Entretanto, para os clones testados (32, 44, 49 e 50) a banda referente ao Fab anti-EPR de tamanho aproximado de 23 kDa não é observada, indicando que possivelmente não houve a secreção da proteína.

Devido ao promotor AOX, utilizado para a indução da expressão, ser considerado um promotor forte, a proteína pode ter sido produzida em grandes quantidades, sobrecarregando o retículo endoplasmático das células de levedura. Esse estresse pode ter levado a formação de proteínas mal dobradas e a ativação de

vias de degradação proteica, sendo este um possível motivo pelo qual a expressão do Fab não foi detectada.

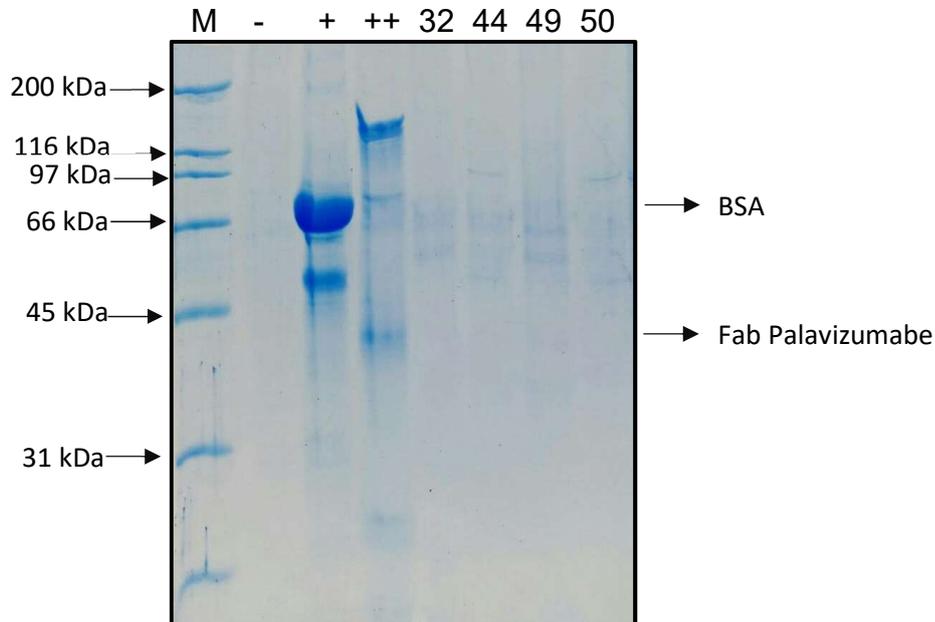


FIGURA 22 - TESTE DE EXPRESSÃO DO FRAGMENTO Fab DO ANTICORPO ANTI-EPR EM *Pichia pastoris*. Gel de poliacrilamida 13%, corado com *Coomassie Blue*, representando o teste de expressão do Fab. Foi utilizada a cepa GS115, cultivo a 30°C e indução com 0,5% de metanol a cada 24 horas por um período de 4 dias. Não foi observada banda no tamanho de aproximadamente 23 kDa correspondente a expressão da proteína. M representa o marcador de massa molecular em kilodaltons (kDa), (-) o controle negativo, (+) a albumina sérica bovina (BSA) como controle positivo, ++ controle positivo do fragmento Fab do anticorpo Palivizumabe e 32/44/49 e 50 os clones testados.

4.8 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPR EM FUSÃO COM A TIORREDOXINA

O gene da EPR foi sintetizado pela empresa *Genscript* no vetor comercial pET32a. Este vetor foi escolhido por possuir a proteína de fusão tiorredoxina, a qual auxilia no correto enovelamento proteico, favorecendo a formação de pontes dissulfeto. Além disso, a tiorredoxina também contribui para uma maior solubilidade das proteínas. Devido a essas características, a EPR foi clonada no vetor pET32a em fusão N-terminal com a tiorredoxina. (Trx-EPR).

4.8.1 Testes de Indução

Com o intuito de determinar as melhores condições para expressão da Trx-EPR, foram realizados ensaios de indução utilizando três temperaturas distintas: 15°C, 25°C e 37°C. Uma colônia da placa, proveniente da transformação do pET32a-Trx-EPR em BL21 Star (DE3), foi inoculada em meio Luria Bertani (LB) e submetida ao protocolo de indução da expressão. Após o ensaio, correu-se um gel de poliacrilamida 15% para avaliar os resultados obtidos nos diferentes tempos e temperaturas de indução. As frações não-induzidas com IPTG foram utilizadas como controles negativos destes experimentos e a proteína L-GFP foi utilizada como controle positivo do teste de expressão. A solubilidade da proteína também foi avaliada, através da separação das frações solúveis e insolúveis provenientes da lise das células bacterianas.

Analisando-se os géis (figura 23) é possível observar que houve a expressão da Trx-EPR (banda com aproximadamente 19 kDa) em todas as temperaturas de indução, porém, a proteína em geral encontra-se em maior quantidade nas frações insolúveis (figura 23 B). Além disso, o nível de expressão nas frações solúveis (figura 23 A) foi maior a 15°C, ficando esta temperatura determinada como a melhor condição para a expressão, e posterior purificação, da proteína.

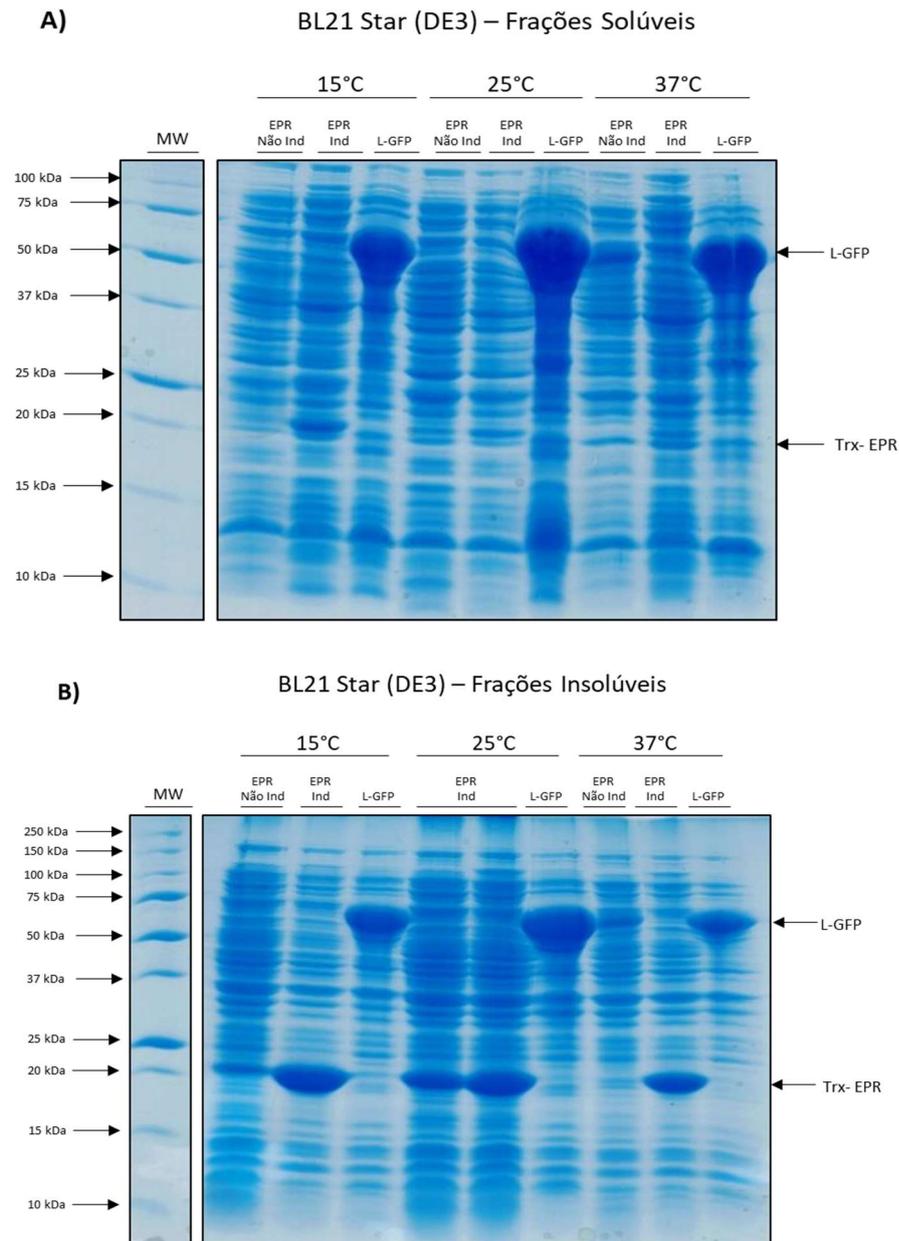


FIGURA 23 - Efeito da temperatura de indução na taxa de expressão da Trx-EPR na cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3). Gel de poliacrilamida 15%, corado com *Coomassie* Blue, representando a melhor condição para a superexpressão do produto do plasmídeo pET32a-Trx-EPR. A) Frações solúveis das amostras não-induzidas (Não Ind) e induzidas (Ind) com IPTG da proteína de fusão Trx-EPR (EPR) e da proteína L-GFP (controle positivo da expressão). B) Frações insolúveis das amostras não-induzidas (Não Ind) e induzidas (Ind) com IPTG da proteína de fusão Trx-EPR (EPR) e da proteína L-GFP (controle positivo da expressão). As bandas correspondentes a Trx-EPR possuem um tamanho de aproximadamente 19 kDa.

4.8.2 Testes de purificação

Após ser verificada a presença da Trx-EPR na fração solúvel do extrato de proteínas das bactérias, foi realizada a sua purificação através de uma cromatografia de afinidade a níquel, tendo em vista que o plasmídeo pPICZ α A possui uma cauda de hexahistidina. No cromatograma obtido (figura 24), é possível visualizar o pico referente ao início da eluição da proteína (em cerca de 25 % do tampão de eluição, 125 mM de imidazol). O método utilizado forneceu bons resultados, uma vez que quantidades significativas da proteína recombinante foram detectadas, em géis de SDS-PAGE 15%, nas frações de eluição (figura 25).

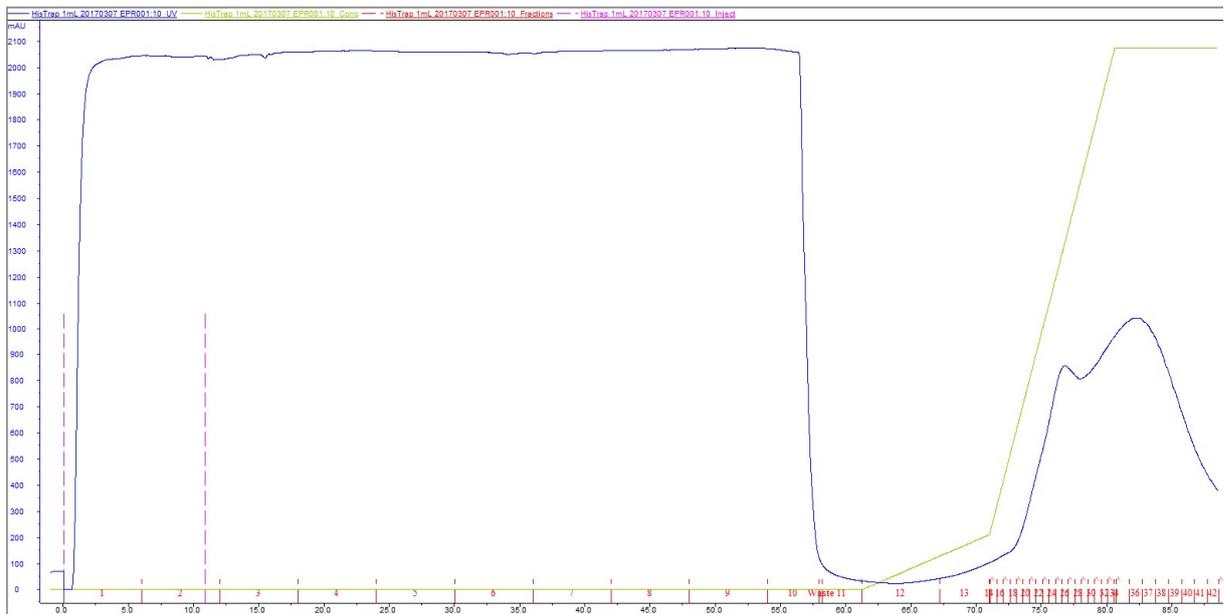


FIGURA 24 - PURIFICAÇÃO DA Trx-EPR POR CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE A NÍQUEL. Cromatograma obtido da cromatografia de afinidade realizada para purificar a Trx-EPR. O pico em azul corresponde à absorbância, na faixa da luz UV, das frações purificadas. A proteína começa a ser eluída em cerca de 25 % do tampão B, 125 mM de imidazol. Na base do pico estão representadas em vermelho o fracionamento dos eluatos.

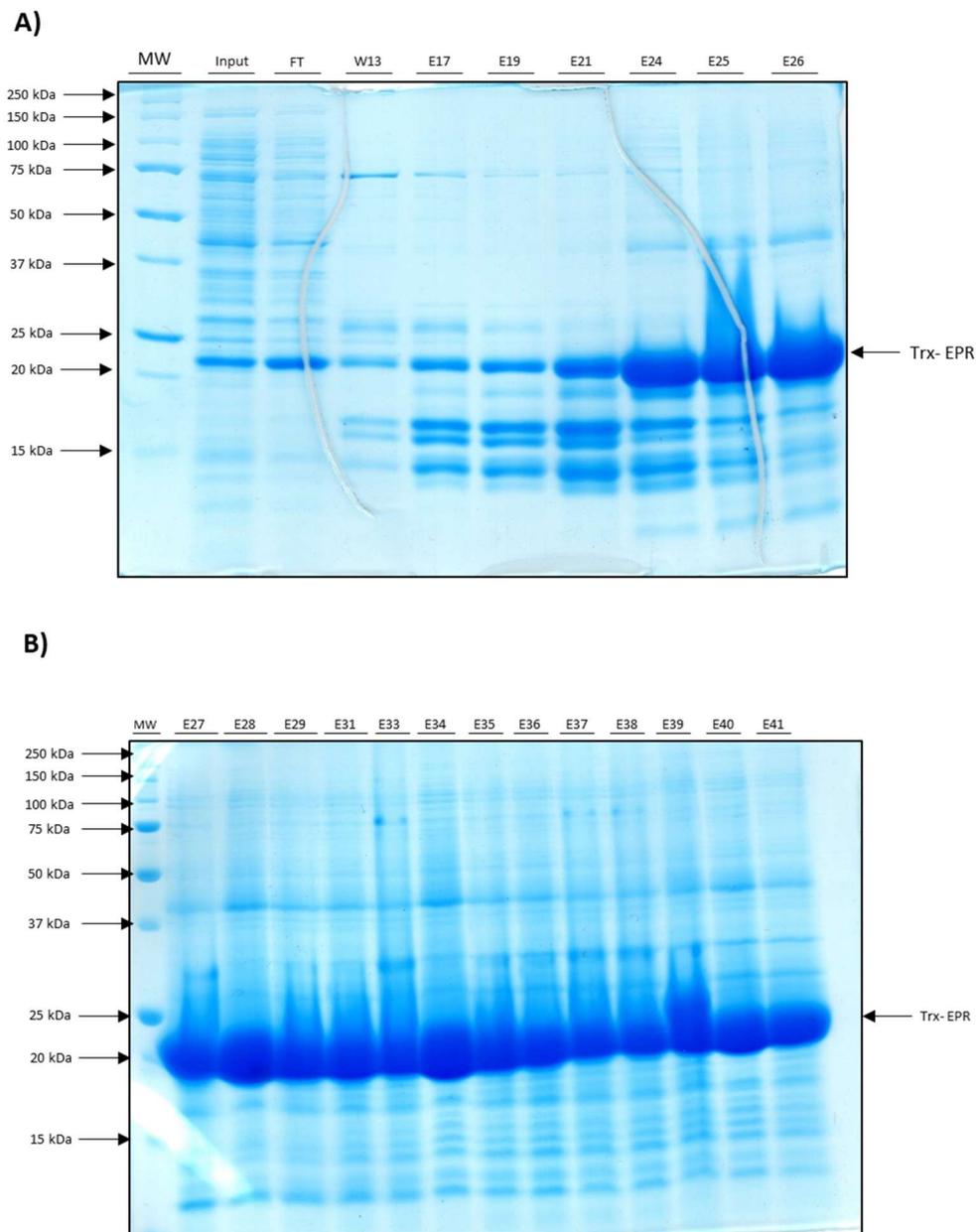
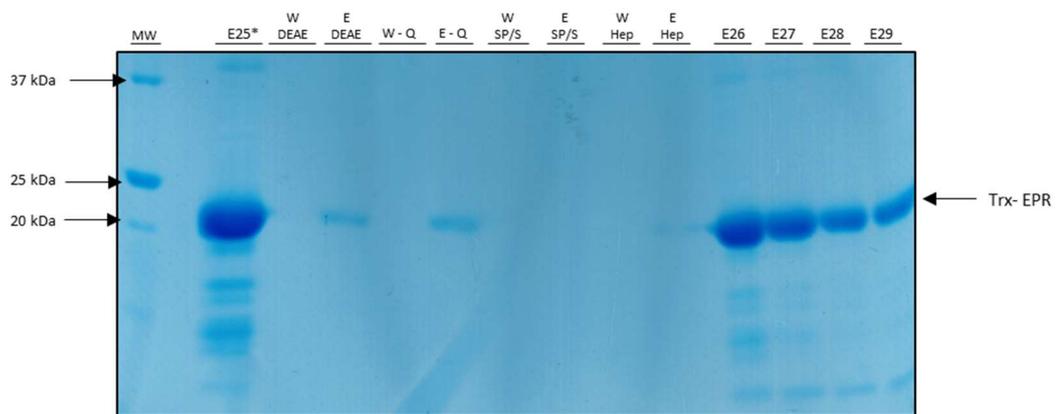


FIGURA 25 - PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Trx-EPR ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE. Amostras obtidas durante a cromatografia de afinidade a níquel e analisadas em gel SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie blue*. A) Pré-coluna (Input), flow-through (FT), lavagem (W13), frações de eluição (E17-26). B) Fracionamento dos eluatos E27 a E41. A banda de aproximadamente 20 kDa, referente a Trx-EPR, está presente em todos os eluatos, porém bandas maiores, indicando maiores concentrações da proteína, são observadas a partir do eluato E24. O marcador de massa molecular está representado por MW.

Entretanto, ainda havia a presença de bandas inespecíficas, o que exigia mais uma etapa de purificação. A figura 26 mostra o resultado da purificação através de cromatografia de troca iônica, onde foram testadas quatro resinas diferentes: duas

aniônicas – DEAE e Q Sepharose, e duas catiônicas – SP e Heparina Sepharose. A proteína foi eluída através das colunas aniônicas apenas e com alto grau de pureza. Além disso, nos mesmos géis de SDS-PAGE foram analisadas algumas frações de eluição obtidas na cromatografia de afinidade, e que foram congeladas afim de determinar se esse método de armazenamento era adequado para a Trx-EPR. Surpreendentemente, além do congelamento manter a proteína estável, ele parece ter tornado a amostra ainda mais pura, possivelmente pela precipitação dos contaminantes.

A)



B)

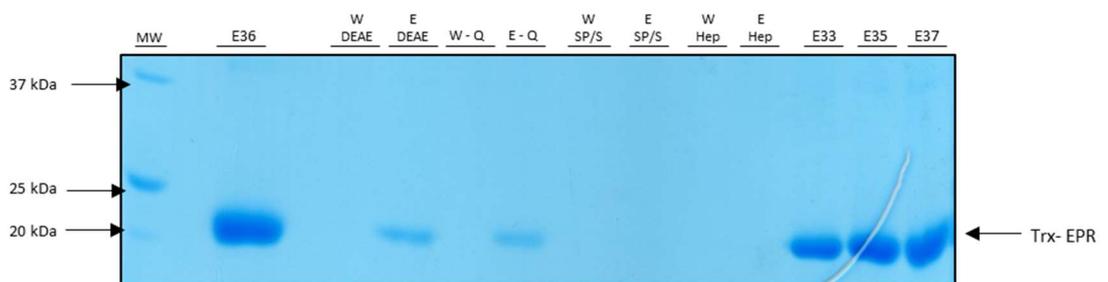


FIGURA 26 - PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Trx-EPR ATRAVÉS DE CROMATOGRÁFIA DE TROCA IÔNICA. Amostras da Trx-EPR obtidas após cromatografia de troca iônica e analisadas em gel SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie blue*. Amostras de eluatos da cromatografia de afinidade também foram analisadas após o seu congelamento, para testar a estabilidade da proteína a esse método de armazenamento. A) A amostra purificada por cromatografia de troca iônica foi o eluato 25. Eluatos (E25-E29), lavagens (W), eluições (E). B) A amostra purificada por cromatografia de troca iônica foi o eluato 36. Eluatos (E33-E37), lavagens (W) e eluições (E). Legenda: resinas aniônicas DEAE e Q Sepharose, resinas catiônicas SP e Heparina Sepharose, marcador de massa molecular (MW).

4.9 CONSTRUÇÃO DO VETOR pET28a-TEV-GFP

Para a expressão dos fatores de crescimento, a clonagem dos genes do EGF, EPR e TGF α foi realizada em fusão a GFP. O intuito de fusionar as proteínas deve-se ao fato de que a GFP poderia ser utilizada tanto para detecção das proteínas quanto como marcador para os ensaios de interação entre o Fab e os fatores de crescimento. Para isso, foi utilizado o plasmídeo pET28a-TEV-OPN-GFP, onde primeiramente foi necessário remover o gene da osteopontina (OPN) para isolar o vetor contendo somente a GFP.

Para isso, o plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *NcoI* e *HindIII* (figura 27) e o inserto contendo aproximadamente 900 pares de base referente a OPN, foi liberado. Então, o fragmento de DNA referente ao plasmídeo pET28a-TEV-GFP foi extraído do gel de agarose, purificado e armazenado a - 20°C até uso.

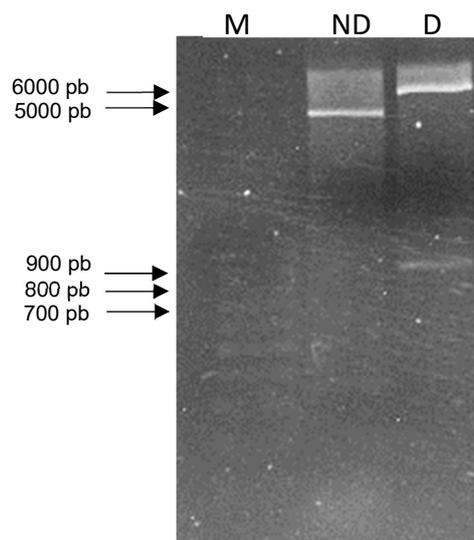


FIGURA 27 – ANÁLISE ELETROFORÉTICA DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DO VETOR pET28A-TEV-OPN-GFP DEMONSTRANDO A REMOÇÃO DO GENE DA OSTEOPONTINA. Gel de agarose 1% das amostras pET28a-TEV-OPN-GFP não digerido (ND) e pET28a-TEV-OPN-GFP digerido com as enzimas de restrição *NcoI* e *HindIII* (ND). Foi liberado um fragmento de DNA, correspondente a osteopontina (OPN), com o tamanho esperado de aproximadamente 900 pares de base (pb), e um fragmento de DNA correspondente ao vetor pET28a-TEV-GFP de aproximadamente 6000 pb. As setas indicam as bandas do marcador de DNA (M).

4.10 AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICADORAS DO EGF, TGF α E EPR

Os genes do EGF, TGF α e EPR foram amplificados (figura 28), a partir do DNA de genes sintéticos produzidos pela empresa *Genscript*, para serem clonados no vetor pET28a-TEV-GFP. Após a confirmação através de gel de eletroforese de DNA, os amplicons foram digeridos com as enzimas de restrição *NcoI* e *HindIII* e, foi realizada a ligação destes fragmentos no vetor.

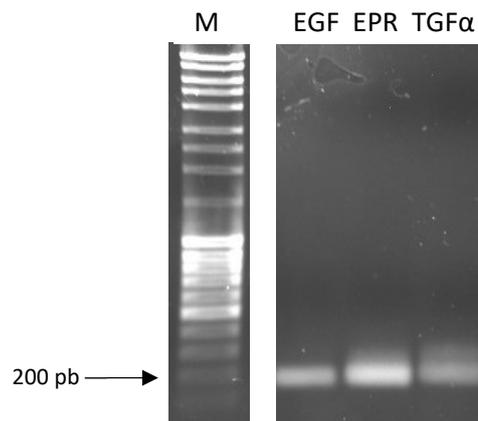


FIGURA 28 – ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS PRODUTOS DE PCR DOS GENES DO EGF, TGF α E EPR PARA CLONAGEM NO VETOR pET28a-TEV-GFP. Gel de agarose 1% dos amplicons dos genes do EGF, EPR e TGF α . As bandas estão de acordo com o tamanho esperado de aproximadamente 200 pares de base (pb). O marcador de DNA está representado pela letra M.

Após reação de ligação, as construções foram transformadas na cepa DH5 α de *E. coli*. Entretanto, para confirmar se os clones possuíam os plasmídeos com os insertos, foram selecionadas colônias para serem testadas através de uma reação de PCR.

4.11 PCR PARA CONFIRMAR A PRESENÇA DOS GENES DO EGF, TGF α E EPR NO VETOR pET28a-TEV-GFP

Para confirmar a presença dos genes dos fatores de crescimento em fusão com a GFP, 30 colônias de cada placa de transformação foram testadas através de reações de PCR. Entretanto, como mostram as figuras 29 e 30, não houve a amplificação do DNA correspondente ao tamanho esperado das fusões TGF α -GFP (902 pb), EGF-GFP (915 pb) e EPR-GFP (891 pb) em nenhuma das reações.

Uma possível explicação para os resultados encontrados seria uma baixa qualidade do DNA utilizado nas reações de ligação.

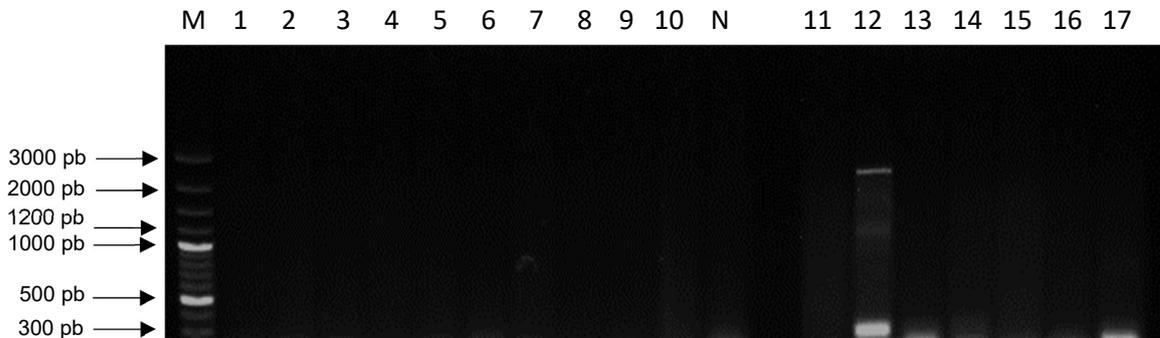


FIGURA 29 - ANÁLISE ELETROFORÉTICA DAS REAÇÕES DE PCR PARA CONFIRMAR A CLONAGEM DOS GENES DA EPR E DO TGF α EM FUSÃO COM A GFP. Gel de agarose 1% representado algumas das colônias testadas por PCR. Não foram observadas bandas dos amplicons no tamanho esperado de 891 pares de base (pb) para a fusão EPR-GFP (colônias 1-10) e de 902 pb para a fusão TGF α -GFP (colônias 11-17). O marcador de DNA está representado pela letra M e N representa o controle negativo da reação (reação sem DNA).

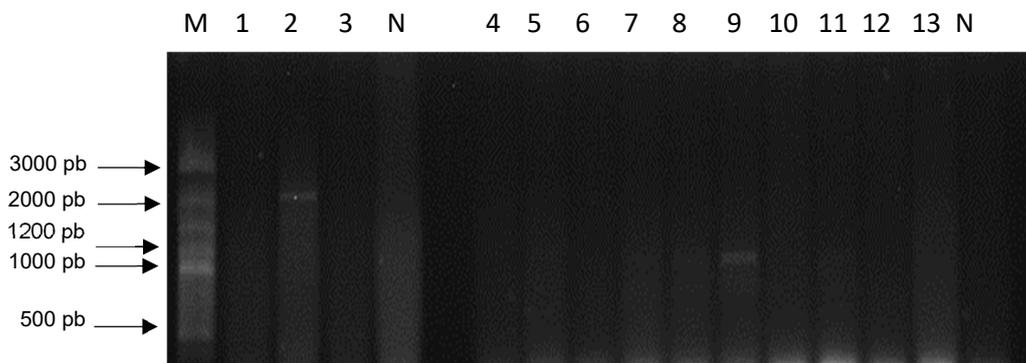


FIGURA 30 - ANÁLISE ELETROFORÉTICA DAS REAÇÕES DE PCR PARA CONFIRMAR A CLONAGEM DOS GENES DO TGF α E EGF EM FUSÃO COM A GFP. Gel de agarose 1% representado algumas das colônias testadas por PCR. Não foram observadas bandas dos amplicons no tamanho esperado de 902 pares de base (pb) para a fusão TGF α -GFP (colônias 1-3) e de 915 pb para a fusão EGF-GFP (colônias 4-13). O marcador de DNA está representado pela letra M, e N representa o controle negativo da reação (reação sem DNA).

5 CONCLUSÕES

- 1) A expressão e purificação do fator de crescimento EPR em fusão com a tiorredoxina foram padronizadas;
- 2) Os genes dos fatores de crescimento EGF, EPR e TGF α foram amplificados e inseridos no vetor pET28a-TEV-GFP. Entretanto, não foi detectado nenhum clone que continha o plasmídeo com o gene de interesse nas trinta colônias testadas através de reações de PCR;
- 3) As cadeias leve e pesada do Fab anti-EPR foram clonadas nos vetores para expressão em leveduras pPICZ α A e pPIC9K respectivamente;
- 4) Os plasmídeos pPICZ α A-EL e pPIC9K-EH foram cotransformados em *P. pastoris* e a seleção dos transformantes foi feita através de antibióticos e de reações de PCR. Foram identificados quatro clones que haviam integrado os genes da cadeia leve e pesada do fragmento Fab do anticorpo anti-EPR em seus genomas;
- 5) Foram realizados testes de expressão do anticorpo recombinante, porém a expressão da proteína não foi detectada.

Como perspectivas deste trabalho encontram-se a expressão e a purificação dos fatores de crescimento em fusão com a GFP e do fragmento Fab do anticorpo anti-EPR. Uma vez que todas as proteínas recombinantes forem obtidas, a funcionalidade e seletividade do anticorpo frente aos diferentes ligantes poderá ser avaliada.

6 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2014.

AKHTAR, S.; BENTER, I. F. The role of epidermal growth factor receptor in diabetes-induced cardiac dysfunction. **Bioimpacts**, v. 3, n. 1, p. 5–9, 2013.

ALVARENGA, L. M.; ZAHID, M.; DI TOMMASO, A.; JUSTE, M. O.; AUBREY, N.; BILLIALD, P.; MUZARDET, J. Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. **Toxins**, v. 6, n. 8, p. 2541–2567, 2014.

APPERT-COLLIN, A.; HUBERT, P.; CRÉMEL, G.; BENNASROUNE, A. Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 1–10, 2015.

ARTEAGA, C. L.; ENGELMAN, J. A. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. **Cancer Cell**, v. 25, n. 3, p. 282–303, 2014.

BADAWY, A. A. Expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in cancer bladder: schistosomal and non-schistosomal. **Current Urology**, p. 192–201, 2016.

BETHELL, D. R.; HOWARD, G. C. Basic methods in antibody production and characterization. 1a. ed. Florida: **CRC Press LLC**, 2000.

BETTER, M.; CHANG, C. P.; ROBINSON, R. R.; HORWITZ, A. H. Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. **Science**, v. 240, n. 4855, p. 1041, 1988.

BREWER, M. R.; CHOI, S. H.; ALVARADO, D.; MORAVCEVIC, K.; POZZI, A.; LEMMON, M. A.; CARPENTER, G. The juxtamembrane region of the EGFR functions as an activation domain. **Molecular Cell**, v. 34, n. 6, p. 641–651, 2010.

BURGESS, A. W. EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. **Growth Factors**, v. 26, n. 5, p. 263–274, 2008.

CODONY-SERVAT, C.; CODONY-SERVAT, J.; KARACHALIOU, N.; MOLINA, M. A.; CHAIB, I.; RAMIREZ, J. L.; DE LOS LLANOS, M.; SOLCA, F.; BIVONA, T. G.; ROSELL, R. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling in EGFR mutant non-small-cell lung cancer (NSCLC). **Oncotarget**, v. 3, 2017.

DE BONO, J. S.; ROWINSKY, E. K. The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 4, p. 19–26, 2002.

DE CASTRO, N. S. Relatório das atividades de pesquisa programadas e efetivamente realizadas do projeto “Estudo do domínio solúvel extracelular do receptor EGFR como molécula de captura do EGF”. **Instituto Carlos Chagas**, 2016.

FERGUSON, K. M.; BERGER, M. B.; MENDROLA, J. M.; CHO, H.; LEAHY, D. J.; LEMMON, M. A. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. **Molecular Cell**, v. 11, n. 2, p. 507-517, 2003.

FERRER, I.; ALCÁNTARA, S.; BALLABRIGA, J.; OLIVÉ, M.; BLANCO, R.; RIVERA, R.; CARMONA, M.; BERRUEZO, M.; PITARCH, S.; PLANAS, A.; M. Transforming growth factor- α (TGF- α) and epidermal growth factor-receptor (EGF-R) immunoreactivity in normal and pathologic brain. **Progress in neurobiology**, v. 49, p. 99-123, 1996.

FULLER, S. J.; SIVARAJAH, K.; SUGDEN, P. H. ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 44, n. 5, p. 831–854, 2008.

GANN, P. H.; KLEIN, K. G.; CHATTERTON, R. T.; ELLMAN, A. E.; GRAYHACK, J. T.; NADLER, R. B.; LEE, C. Growth factors in expressed prostatic fluid from men with prostate cancer, BPH, and clinically normal prostates. **Prostate**, p. 248–255, 1999.

GARCIA, B.; NENINGER, E.; DE LA TORRE, A.; LEONARD, I.; MARTÍNEZ, R.; VIADA, C.; GONZÁLEZ, G.; MAZORRA, Z.; LAGE, A.; CROMBET, T. Effective inhibition of the epidermal growth factor/epidermal growth factor receptor binding by anti-epidermal growth factor antibodies is related to better survival in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with the epidermal growth factor vaccine. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 3, p. 840–846, 2008.

GOLDMAN, R. D. Antibodies: indispensable tools for biomedical research. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 12, p. 593–595, 2000.

GSCHWIND, A.; FISCHER, O. M.; ULLRICH, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 5, p. 361–370, 2004.

GUO, G.; GONG, K.; WOHLFELD, B.; HATANPAA, K. J.; ZHAO, D.; HABIB, A. A. Ligand-independent EGFR signaling. **Cancer Research**, v. 75, n. 17, p. 3436–3441, 2015.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARRIS, R. C.; CHUNG, E.; COFFEY, R. J. EGF receptor ligands. **Experimental Cell Research**, v. 284, n. 1, p. 2–13, 2003.

HERBST, R. S. Review of epidermal growth factor receptor biology. **International Journal of Radiation, Oncology, Biology and Physics**, v. 59, n. 2, p. 21–26, 2004.
HOLBRO, T.; CIVENNI, G.; HYNES, N. E. The ErbB receptors and their role in cancer progression. **Experimental Cell Research**, v. 284, n. 1, p. 99–110, 2003.

HOLBRO, T.; HYNES, N. E. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 195–217, 2004.

HOU, C. H.; LIN, F. L.; TONG, K. B.; HOU, S. M.; LIU, J. F. Transforming growth factor alpha promotes osteosarcoma metastasis by ICAM-1 and PI3K/Akt signaling pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 89, n. 4, p. 453–463, 2014.

HUDSON, P. J.; SOURIAU, C. Engineered antibodies. *Nature Medicine*, v. 9, n. 1, p. 129–134, 2003.

HUMPHREYS, R. C.; HENNIGHAUSEN, L. Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer. **Oncogene**, p. 1085-1091, 2000.

HYNES, N. E.; LANE, H. A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 5, p. 341–354, 2005.

HYNES, N. E.; MACDONALD, G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 177–184, 2009.

IJIMA, M.; ANAI, M.; KODAMA, T.; SHIBASAKI, Y. Epiregulin-blocking antibody inhibits epiregulin-dependent EGFR signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 489, n. 1, p. 83–88, 2017.

INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br>>. Acesso em 19 de abril de 2017.

JACOBI, N.; SEEBOECK, R.; HOFMANN, E.; EGER, A. ErbB family signalling: a paradigm for oncogene addiction and personalized oncology. **Cancers**, v. 9, n. 4, p. 1–24, 2017.

KANG, Z.; HUANG, H.; ZHANG, Y.; DU, G.; CHEN, J. Recent advances of molecular toolbox construction expand *Pichia pastoris* in synthetic biology applications. **World J Microbiol Biotechnol**, 2016.

KOLCH, W.; PITT, A. Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signalling pathways in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 9, p. 618–629, 2010.

KRAINER, F. W.; DIETZSCH, C.; HAJEK, T.; HERWIG, C.; SPADIUT, O.; GLIEDER, A. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. **Microbial Cell Factories**, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Patologia Básica**. 8a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LEMMON, M. A. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. **Exp Cell Res**, v. 315, n. 4, p. 638–648, 2010.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J.; FERGUSON, K. M. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, n. 27918, p. 1–18, 2014.

LEMONS-GONZÁLEZ, Y.; RODRÍGUEZ-BERROCAL, F. J.; CORDERO, O. J.; GÓMEZ, C.; PÁEZ DE LA CADENA, M. Alteration of the serum levels of the epidermal growth factor receptor and its ligands in patients with non-small-cell lung cancer and head and neck carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 10, p. 1569–1578, 2007.

LIU, S.; YE, D.; XU, D.; LIAO, Y.; ZHANG, L.; LIU, L.; YU, W.; WANG, Y.; HE, Y.; HU, J.; GUO, W.; WANG, T.; SUN, B.; SONG, H.; YIN, H.; LIU, J.; WU, Y.; ZHU, H.; ZHOU, B. P.; DENG, J.; ZHANG, Z. Autocrine epiregulin activates EGFR pathway for lung metastasis via EMT in salivary adenoid cystic carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 18, 2016.

MUYLDERMANS, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, p. 775–797, 2013.

NELSON, A. L. Antibody fragments: hope and hype. **Landes Bioscience**, v. 2, n. 1, p. 77–83, 2010.

NENINGER, E.; VERDECIA, B. G.; CROMBET, T.; VIADA, C.; PEREDA, S.; LEONARD, I.; MAZORRA, Z.; FLEITES, G.; GONZÁLEZ, M.; WILKINSON, B.; GONZÁLEZ, G.; LAGE, A. Combining an EGF-based cancer vaccine with chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. **Journal of immunotherapy**, v. 32, n. 1, p. 92–99, 2009.

NICHOLSON, R. I.; GEE, J. M. W.; HARPER, M. E. EGFR and cancer prognosis. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 9–15, 2001.

NORMANNO, N.; DE LUCA, A.; BIANCO, C.; STRIZZI, L.; MANCINO, M.; MAIELLO, M. R.; CAROTENUTO, A.; DE FEO, G.; CAPONIGRO, F.; SALOMON, D. S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v. 366, n. 1, p. 2–16, 2006.

OGISO, H.; ISHITANI, R.; NUREKI, O.; FUKAI, S.; YAMANAKA, M.; KIM, J.; SAITO, K.; SAKAMOTO, A.; INOUE, M.; SHIROUZU, M.; YOKOYAMA, S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 775–787, 2002.

PRENZEL, N.; FISCHER, O. M.; STREIT, S.; HART, S.; ULLRICH, A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. **Endocrine-Related Cancer**, v. 8, n. 1, p. 11–31, 2001.

PURBA, E. R.; SAITA, E.; MARUYAMA, I. N. Activation of the EGF receptor by ligand binding and oncogenic mutations: the “rotation model”. **Cells**, p. 1–19, 2017.

QUIROZ, F. G.; SINCLAIR, S. M. Engineering antibody fragments: replicating the immune system and beyond. **Revista Ingeniería Biomédica**, v. 4, p. 39-51, 2010.

RAMOS, T. C.; VINAGERAS, E. N.; FERRER, M. C.; GARCIA, B. V.; LEONARD, I.; PÉREZ, L. M.; MARINELLO, G. G.; RODRÍGUEZ, R. P.; DÁVILLA, A. L. Treatment of NSCLC patients with an EGF-based cancer vaccine: report of a phase I trial. **Cancer Biology and Therapy**, v. 5, n. 2, p. 145–149, 2006.

RIESE, D. J.; CULLUM, R. L. Epiregulin: roles in normal physiology and cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 49–56, 2014.

ROSKOSKI, R. ErbB/HER protein-tyrosine kinases: structures and small molecule inhibitors. **Pharmacological Research**, v. 87, p. 42–59, 2014.

ROSKOSKI, R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. **Pharmacological Research**, v. 79, p. 34–74, 2014.

ROYCE, J. An industrial platform solution for antibody fragment purification. **Bioprocess International**, 2015.

SAKASHITA, S.; SAKASHITA, M.; SOUND TSAO, M. Genes and pathology of non-small-cell lung carcinoma. **Seminars in Oncology**, v. 41, n. 1, p. 28–39, 2014.

SAMBROOK, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular cloning: A Laboratory manual. SASAKI, T.; HIROKI, K.; YAMASHITA, Y. The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment. **BioMed Research International**, 2013.

SCHNEIDER, M. R.; WOLF, E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. **Journal of Cellular Physiology**, v. 218, n. 3, p. 460–466, 2009.

SHARMA, S. V.; BELL, D. W.; SETTLEMAN, J.; HABER, D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 3, p. 169–181, 2007.

SIBILIA, M.; KROISMAYR, R.; LICHTENBERGER, B. M.; NATARAJAN, A.; HECKING, M.; HOLCMANN, M. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. **Differentiation**, v. 75, n. 9, p. 770–787, 2007.

SINGH, B.; CARPENTER, G.; COFFEY, R. J. EGF receptor ligands: recent advances. **F1000Research**, v. 5, p. 2270, 2016.

SUNAGA, N.; KAIRA, K. Epiregulin as a therapeutic target in non-small-cell lung cancer. **Lung Cancer** (Auckl). vol. 6, p. 91-98, 2015.

WHEELER, D. L.; DUNN, E. F.; HARARI, P. M. Understanding resistance to EGFR inhibitors - impact on future treatment strategies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 7, n. 9, p. 493–507, 2010.

WHO. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em 20 de abril de 2017.

WILSON, K. J.; GILMORE, J. L.; FOLEY, J.; LEMMON, M. A.; RIESE, D. J. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 122, n. 1, p. 1–8, 2009.

YANG, J.; LI, S.; WANG, B.; WU, Y.; CHEN, Z.; LV, M.; LIN, Y.; YANG, J. Potential biomarkers for anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 9, p. 11645–11655, 2016.

ZENG, F.; HARRIS, R. C. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 2–11, 2014.