

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

PRODUÇÃO DE PROINSULINA RECOMBINANTE EM *Pichia pastoris*
UTILIZANDO O PROMOTOR DO GENE PGK

MANAUS
2015

ENEDINA NOGUEIRA DE ASSUNÇÃO

PRODUÇÃO DE PROINSULINA RECOMBINANTE EM *Pichia pastoris*
UTILIZANDO O PROMOTOR DO GENE PGK

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas, como requisito
para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Spartaco Astolfi Filho

MANAUS

2015

ENEDINA NOGUEIRA DE ASSUNÇÃO

PRODUÇÃO DE PROINSULINA RECOMBINANTE EM *Pichia pastoris*
UTILIZANDO O PROMOTOR DO GENE PGK

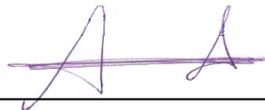
Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multi-
Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas, como requisito
para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Qualificação da Tese: 26/09/2015

BANCA EXAMINADORA



Dr. Spartaco Astolfi Filho (orientador)



Dr. Andre Luis Willerding



Dr. Adolfo José da Mota



Dr. Edmar Vaz de Andrade



Dra. Sonia Maria da Silva Carvalho

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A851p Assuncao, Enedina Nogueira de
Produção de proinsulina recombinante em *Pichia pastoris* utilizando o promotor do gene *pgk* / Enedina Nogueira de Assuncao. 2015
138 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. proinsulina. 2. *P. pastoris*. 3. codóns otimizados. 4. vetor expressão/secreção. 5. *pgk*. I. Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

A minha família!!!

Ofereço

Aos meus pais, pelo futuro que
sonharam para mim, que eu possa
continuar concretizando.

(in memoriam)

Dedico

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao admirável Dr. Spartaco Astolfi Filho (professor, orientador, chefe e amigo)
dedico um agradecimento especial.

A pessoa que me ofereceu a primeira oportunidade de ingressar no mundo científico e
que me passou todos os ensinamentos de engenharia genética.

Um pesquisador na essência da palavra, pessoa que dedica suas idéias, seu
tempo, seu trabalho e sua sabedoria à pesquisa.

Pelos grandes ensinamentos e sincera dedicação.

Meus sentimentos de gratidão.

Muito obrigada professor Spartaco!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela realização de mais uma etapa importante na minha vida.

A minha família por sempre acreditarem em mim, por todo o apoio e incentivo, por aceitarem pacientemente a minha ausência em momentos de confraternização.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, pela orientação, pelos ensinamentos, pela experiência compartilhada, pelo carinho e pela amizade.

Aos coordenadores da PPG-BIOTEC Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva e Edmar Vaz de Andrade pelas contribuições, empenho e dedicação.

Aos professores Fernando Araripe (grupo Brasília), Andre Luis Willerding (CEPLAN-CTI), Cristina Santos, Adolfo José da Mota e Andrea Ghelfi (UFAM) pela colaboração em momentos importantes deste trabalho.

A Elen Bethleen por ser uma pessoa tão especial minha vida, por sua bondade, solidariedade, pelo apoio e incentivo, pelo carinho, por ter me contagiado com o seu amor pela Biologia e principalmente pela sua amizade.

Ao pessoal do Laboratório de Tecnologias do DNA e Proteoma Anita, Julio Nino, Mauricio, Luciana, Leissandra, Márcia Neiva, Elza, Patrícia, Edson, Ivanete, Luciana, Lorena, Andressa, Diego, Tiago, pessoal do IGEM (Maria, Adriane, Marcos Laís e Marcelo) e aos colegas do CAM: Ângela, Izabel e Roberto.

Aos amigos Ed, Gugu, Raquel, Melissa e Marcelo pelo apoio, amizade compartilhada, alegria e pelas reuniões descontraídas em momentos de estresse!!!

Aos amigos (pessoas admiráveis) Alêssandra Kariza, Vera, Thana, Diana Rolo, Evelyn, Aldi, Ítalo, Kemilla e Janice, pelo apoio, incentivo, amizade e principalmente por serem sempre presentes na minha vida mesmo distantes/ausentes fisicamente!!

Os meus agradecimentos aos financiadores e apoiadores FAPEAM (projeto Universal), CAPES, CNPQ.

Agradeço em especial aos membros da banca examinadora Dr. Spartaco Astolfi Filho, Dra. Sonia Maria da Silva Carvalho, Dr. Edmar Vaz de Andrade, Dr. Andre Luis Willerding, e Dr. Adolfo José da Mota pela disposição em contribuir no engrandecimento desse trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Muitíssimo Obrigada!!

Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.

Roberto Shinyashiki

RESUMO

De acordo com os indicadores da Organização Mundial de Saúde (OMS) o diabetes mellitus deve alcançar 333 milhões de pessoas em 2025 no mundo e em 2030 na América Latina será a segunda causa de morte, por isso o aumento da produção de insulina torna-se uma necessidade para suprir as futuras demandas de mercado. Os sistemas de expressão em leveduras tipo *Pichia pastoris* tem sido cada vez mais utilizados e tem-se mostrado como atraentes alternativas para a expressão de proteínas para fins industriais. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo principal a produção de proinsulina humana por *Pichia pastoris* utilizando o promotor do gene PGK. O gene A1 que codifica o precursor da insulina foi sintetizado quimicamente com códons otimizados para a expressão em *P. pastoris*. Esse gene foi clonado em vetor de expressão/secreção sob controle do promotor PGK de *P. pastoris* e integrado no genoma de *P. pastoris* GS115. A produção de proinsulina recombinante foi realizada em meio líquido YPD em frascos agitados a 30°C, a 180 rpm. A análise da proinsulina expressa em *P. pastoris* foi realizada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida e Western-blotting e mostrou massa molecular de aproximadamente 7,5 kDa. O clone recombinante A140 que apresentou maior resistência a zeocina e sinal positivo mais intenso no imunodot-blotting foi utilizado para estabelecer condições melhores de expressão/secreção de proinsulina em planejamento fatorial estatístico experimental. As condições de cultivo que se mostraram melhores para a produção da proinsulina foram: composição do meio de cultivo (dextrose 7,5%, extrato de levedura 1% e peptona 0,15%), temperatura de 25°C e pH do meio igual a 7,0. O clone A140 nas melhores condições de cultivo atingiu biomassa total de 50g/L e nível de expressão de insulina de 0,83g/L em 72 horas de cultivo. A expressão de proinsulina em altos níveis utilizando o promotor PGK em *P. pastoris* faz esse sistema de expressão atrativo para produção da proinsulina humana e outras proteínas de interesse industrial.

Palavras-chave: proinsulina, *Pichia pastoris*, códons otimizados, vetor de expressão/secreção e promotor PGK.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), diabetes mellitus is expected to reach 333 million by 2025 and around 2030 is going to be the second cause of death in Latin America. Therefore, an insulin production increasing becomes a need to meet future market demands. The heterologous expression system in *Pichia pastoris* have been increasingly used and has proven to be an attractive alternative for over expressing human genes for biotechnological purposes. Thus, this work has as main objective to produce human proinsulin by *P. pastoris* using a PGK gene promoter. A1 gene codes for the insulin precursor and was chemically synthesized with optimized codons for *P. pastoris*. This gene was cloned into expression vector / secretion under control of PGK *P. pastoris* promoter and integrated into the genome of *P. pastoris* GS115. Transformant clones were selected for increased zeocin production and from dot-blotting. The production of recombinant proinsulin was performed in YPD liquid in shake flasks at 30 ° C, 180 rpm. The supernatant was clarified by centrifugation, and detection of recombinant proteins by ELISA, electrophoresis in denaturing polyacrylamide gel, Western-blotting and finally chromatography for size exclusion. Best conditions for expression / secretion of proinsulin were established through statistical experimental design detecting the expression level by ELISA. The amount of pre-proinsulin mRNA was determined from two samples of two contrasting conditions of A140 clone with the highest and lowest production of proinsulin using Real-Time PCR (qPCR). As results, the recombinant clones that had higher resistance to Zeocin also showed more intense positive signs in the dot-blotting. Proinsulin coding sequence (A1) was efficiently expressed in *P. pastoris* and secreted into the cell culture supernatant, with molecular weight of approximately 7.5 kDa. The A140 clone showed significant productivity in production level within 48 to 72 hours after the improvement of the YPD culture medium showed level of 0.83 g/L of insulin expression at 72 hours, for total biomass of about 50g / L. High levels of proinsulin expression with PGK promoter using *P. pastoris* as host make this heterologous expression attractive for human proinsulin production as well as other industrial proteins.

Key-words: proinsulin, *Pichia pastoris*, optimized codons, vector expresion/secretion promoter PGK.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1. Sequência de aminoácido da insulina	26
Figura 2. Representação esquemática da proinsulina humana com os sítios de clivagem das convertases PC1 e PC2, o peptídeo C, as cadeias A e B e as três pontes dissulfeto estabilizadoras da estrutura.....	27
Figura 3. A insulina madura é formada a partir do seu precursor a proinsulina por processamento proteolítico. A remoção de um segmento de 23 aminoácidos (a sequência de sinal) no terminal amino da proinsulina e formação de três ligações dissulfeto produz pró-insulina. Novos cortes proteolíticos removem o peptídeo C da proinsulina para produzir insulina madura, composto por cadeias A e B	29
Figura 4. Representação esquemática dos vários precursores de insulina	30
Figura 5. Vetor de expressão pPGK_3AMY.....	36
Figura 6. Desenho do gene da proinsulina com códons preferenciais para <i>P. pastoris</i> . 51	
Figura 7. Esquema ilustrativo de PCR em tempo real com o sistema SYBR Green.....	60
Figura 8. Representação gráfica da curva padrão na interface do software ABI PRISMA STEPONEPLUS. Mostrando a curva-padrão do ensaio de quantificação absoluta, os pontos vermelhos representam os Cts gerados pelo número de cópias de cada concentração de DNA padrão. Fonte: Applied Biosystems (2007).....	61
Figura 9. Esquema mostrando a subclonagem do gene sintético da proinsulina A1 no vetor de expressão/secreção pPGK (PGK: promotor do gene 3-fosfoglicerato quinase; gene de resistência a zeocina (she ble).	75
Figura 10. Mostra em A: as sequências de aminoácidos da proinsulina humana (H1) e da mini-proinsulina (A1). Em B mostra: a sequência de nucleotídeos codificadores da mini-proinsulina A1. Em azul está representada a cadeia B, em laranja a cadeia C, em verde a cadeia A, em preto a região final do peptídeo sinal do fator α (o sítio da peptidase Kex 2) e a região glu - ala (EA) repetida (processada pela dipeptidil aminopeptidase).....	76

Figura 11. Predição da presença do peptídeo sinal e do sítio de clivagem entre 21 e 22 para o A140 (Ala Leu Ala -Ala Pro). A predição pelo algoritmo SignalP analisa e faz uma previsão do provável local de ocorrência da clivagem pela enzima peptidase sinal.	77
Figura 12. Perfil de eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da digestão dos plasmídeo PGS3 – InsA1 e pPGK Δ 3Amy. 1- Marcador de 1Kb; 2 e 4 e mostram os plasmídeos recombinantes íntegros; e 3 e 5 mostram os plasmídeos recombinantes digeridos indicando os fragmentos correspondentes aos genes da proinsulina A1 (212 pb e gene de α - amilase (1500pb)......	78
Figura 13. Perfil de eletroforese em gel de agarose 0,8 dos fragmentos gerados por dupla digestão (<i>XhoI</i> e <i>NotI</i>) após purificação 1 - marcador de 1Kb, 2 - Fragmento do gene da proinsulina com cerca de ~212pb. 3 - Plasmídeo pPGK linearizado com cerca de 3000pb.	79
Figura 14. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da digestão com <i>XhoI</i> e <i>NotI</i> dos plasmídeos recombinantes. 1 - Marcador de 1Kb, 2 - pPGKA1 intacto e 3, 4 e 5 - pPGKA1 duplamente digerido.....	80
Figura 15. Mapa físico do plasmídeo recombinante pPGKA1.....	80
Figura 16. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do plasmídeo recombinante pPGKA1. 1 - marcador de 1Kb, 2 - plasmídeo intacto e 3 pPGKA1 digerido com <i>SacI</i> (linearizado com cerca de 3000 pb).....	81
Figura 17. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do produto de PCR de colônias dos clones transformantes de <i>P. pastoris</i> , utilizando-se os primers (A1_ F0 e A1_R1) - Marcador de 1K ladder, 2 a 8 amplicons produzidos por PCR de colônias de transformantes do pPGKA1.....	82
Figura 18. Ensaios de resistência a zeocina nas concentrações de 100, 500, 1000 e 2000 μ g/mL dos clones recombinantes de <i>P. pastoris</i>	83

Figura 19. Seleção de recombinantes de *P. pastoris* transformados com pPGKA1 por imuno dot-blotting. Mostra a membrana de nitrocelulose com os recombinantes após reação imunoquímica com anticorpos anti-insulina. De 3 a 54 são os clones recombinantes e os quadros tracejados em vermelho mostram os controles negativos (hospedeira vazia). As setas indicam o clone positivo de baixa (vermelha) e alta (preta) intensidade de reação..... 85

Figura 20. Mostra as curvas de crescimentos do clones A140 e controles. Como controle negativo temos a levedura *P. pastoris* não transformada geneticamente e como controle positivo a *P. pastoris* transformada com o plasmídeo pPGK Δ 3Amy, todos crescidos a 30°C por 120 horas em estufa com agitação a 180 rpm. 89

Figura 21. Mostra a variação da concentração de glicose, produção de biomassa e proinsulina em função do tempo de cultivo do clone recombinante A1. As curvas foram geradas a partir do crescimento do clone recombinante A140 em frascos agitados a 180 rpm com meio YPD a 30°C por 80 horas. 90

Figura 22. Perfil eletroforético de SDS-PAGE 15% das proteínas secretadas por *P. pastoris*. 1 - Marcador de massa molecular. 2, 3 e 4 amostras dos sobrenadantes do clone A1-40 de *P. pastoris* após 24, 48 e 72 horas de cultivo, respectivamente. 5 - Controle negativo *P. pastoris* não transformada geneticamente após 72 horas de cultivo. 91

Figura 23. A - Perfil cromatográfico de exclusão molecular (coluna Superdex-75) do sobrenadante da cultura do clone recombinante A140 de *P. pastoris*. B - Reação de imunodeteccção (imuno dot) para a confirmação da presença da proteína recombinante nas frações coletadas, as frações destacadas em vermelho (8, 9, 12 e 13) mostraram-se antigenicamente positivas..... 92

Figura 24. Perfil eletroforético em gel SDS-TRICINE-PAGE 17% corado com prata. 1 - controle positivo insulina comercial (5kDa), 2 – Fração 8 do clone A140, 3 - controle negativo *P. pastoris* não transformada geneticamente. 4- Marcador de massa molecular. 93

Figura 25. Análise por <i>Western-blotting</i> . 1- Controle negativo <i>P. pastoris</i> não transformada geneticamente. 2 - clone A140 com proinsulina expressa em <i>P. pastoris</i> (fração 8), 3 - Proinsulina fusionada a (His) ₆ Tag expressa em <i>E. coli</i> . 4 - marcador de massa molecular.	93
Figura 26. Superfície de resposta para a produção de proinsulina em <i>P. pastoris</i> (a) em função da concentração de x2-peptona e x1-Dextrose.	99
Figura 27. Superfície de resposta para a produção de insulina em <i>P. pastoris</i> em função da concentração de x2-peptona e x3-pH.....	100
Figura 28. Superfície de resposta para a produção de proinsulina em <i>P. pastoris</i> em função de x3-pH e x4-temperatura	101
Figura 29. Superfície de resposta para a produção de proinsulina em <i>P. pastoris</i> em função de x1 (dextrose) e x2 (peptona).	103
Figura 30. Superfície de resposta para a produção de proinsulina em <i>P. pastoris</i> em função de x2 (peptona) e x3 (pH).....	104
Figura 31. Gráfico de média da produtividade do clone A140.	105
Figura 32. Perfil eletroforético dos amplicons de cDNA de proinsulina. As linhas de 1 a 6 mostram resultados da amplificação de cDNAs dos transcritos do gene da proinsulina em diferentes tempos de cultivo, amostras 1 e 2 (8 horas), 3 e 4 (10 horas) e 5 e 6 (12 horas) e Marcador de 1K ladder.	107
Figura 33. (A) Curva de amplificação e sua correspondente (B) curva de dissociação	108
Figura 34. Concentração dos cDNAs diluídos no eixo das abscissas e o Ct para amplificação de cada cDNA no eixo das ordenadas.....	109
Figura 35. Análise de qPCR da expressão de proinsulina em <i>Pichia pastoris</i> . Histogramas de colunas com expoentes para <0,05.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Influência do pH em cultivos de <i>Pichia pastoris</i>	40
Tabela 2. Reação de qPCR para a quantificação do número de cópias.....	51
Tabela 3. As variáveis e seus respectivos níveis do experimento 1	57
Tabela 4. Matriz do experimento 1 planejamento fracionado (2^{6-1}).....	57
Tabela 5. Variáveis de entrada e seus respectivos níveis do experimento 2	58
Tabela 6. Matriz do experimento 2 planejamento experimental (2^4+8 axiais+ 6PC) total 30 ensaios.	58
Tabela 7. Variáveis de entrada e seus respectivos níveis do experimento 3	59
Tabela 8. Matriz do experimento 3 - planejamento (2^3) 8 axiais+ 6PC) total 20 ensaios.	59
Tabela 9. A concentração em nanogramas do plasmídeo recombinante com o equivalente número de cópias de plasmídeo pPGKA1.	63
Tabela 10. Ensaios de resistência de <i>P. pastoris</i> transformada com plasmídeo pPGKA1 a zeocina (muito = cresceram muito, pouco = cresceram pouco e NC = não cresceram)	84
Tabela 11. Crescimento com zeocina, produção de insulina e provável nº de cópias....	86
Tabela 12. Matriz do planejamento experimental fracionado (2^{6-1}), com valores reais e resultados da produção de proinsulina no clone A140.	96
Tabela 13. Matriz do experimento 2 (2^4+8 axiais+ 6PC) total 30 ensaios mostrando as variáveis com os valores reais e resultados	98
Tabela 14. Matriz do planejamento experimental 3 com valores reais e resultados planejamento (2^3) com (8 axiais + 6PC) total 20 ensaios.....	102
Tabela 15. Resultado geral das análise de tempo, produção de proinsulina g/L e biomassa.	106
Tabela 16. Resultado geral da biomassa, número de moléculas do RNA e RNAm e produção de proinsulina em g/L	110

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ADP - Adenosina difosfato

AOX - Enzima álcool oxidase

APS - Persulfato de Amônio

ATP - Adenosina trifosfato

BCA - Ácido bicinconinico

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta de busca e Alinhamento básico local)

BMGY - Meio composto de extrato de levedura, peptona, glicose e sorbitol

BSA - Albumina sérica bovina

CYC1 - O gene que codifica o citocromo oxidase.

DNA- Ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleosídeos trifosfato

DTT - Ditioneitol

EDTA - Ácido Etilenodiamino tetra acético

ELISA - Ensaio Imunoabsorvente ligado a proteína (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

FDA - Food and Drug Administration (Administração de Comidas e Remédios)

GRAS- Generally Recognized as Safe (Geralmente Reconhecido como seguro).

H₂O - Água

IAA - Iodoacetamida

Kb - Quilobase

kDa - Quilodalton

L - Litro

LB - Meio Luria-Bertani

M - Molar

MD - Meio Mínimo com Dextrose

Mg - Miligrama

μL - Microlitro

μM - Micromolar

mg/mL - Miligrama por mililitro

mg/μL- Miligrama por microlitro

mL - Mililitro
mM - Milimolar
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
NCBI - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
ng - Nanograma
ng/ μ L - Nanograma por microlitro
ng/mL - Nanograma por mililitro
 $^{\circ}$ C - Graus celsius
OD 600- Densidade ótica
ORF - Quadro de leitura aberta (Open Reading Frame)
pb - Par de bases
PB - Pares de base
PBS - Tampão Fosfato Salina
PBST - Tampão Fosfato Salina e TritonX100
PC1 - Proproteína convertase 1
PC2 - Proproteína convertase 2
PCR - Polimerase chain reaction ou reação em cadeia da polimerase
PGK- Fosfoglicerato quinase
PGK1 - Gene que codifica a 3-fosfoglicerato quinase
Pmol - Picomol
SCP - Single cell proteic (proteína de unicellular)
SDS - Dodecil sulfato de sódio
TA - Temperatura ambiente
TBE - Tris Borato EDTA
TBS - Tampão salino e triton
TCA - Acido tricloro acético
TDR - Tecnologia do DNA recombinante
TEMED - N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina
YNB - Yeast nitrogen base (Base nitrogenada de levedura)
YPD - Yeast peptone Dextrose
YPDS - Yeast peptone Dextrose sorbitol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISAO DA LITERATURA.....	23
2.1 O <i>diabetes mellitus</i> (diabetes melito)	23
2.1.1 A história da <i>diabetes mellitus</i> e insulina	24
2.1.2 A Insulina, estrutura, produção e secreção	26
2.2 Expressão heteróloga de insulina recombinante.....	30
2.2.1 Vetor de expressão usando promotor pPGK de <i>Pichia pastoris</i>	35
2.3 Fatores que influenciam a expressão de proteínas heterológicas por <i>Pichia pastoris</i>	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 Material.....	43
3.1.1 Microrganismos utilizados	43
3.1.2 Enzimas de restrição	43
3.1.3 Antibióticos	43
3.1.4 Marcadores de massa molecular.....	44
3.1.5 Purificação	45
3.1.6 Ferramentas da bioinformática	45
3.1.7 Meios de cultura	46
3.1.8 Soluções.....	47
3.2 Métodos	51
3.2.1 Desenho do gene da proinsulina com códons preferenciais para <i>P. pastoris</i>	51
3.2.2 Subclonagem da proinsulina no vetor de expressão/secreção pPGK.....	52
3.2.2.1 Ligação dos fragmentos gênicos e transformações em <i>E. coli</i> (Dh5 α)	52
3.2.2.2 Confirmação da sub-clonagem por análise de restrição	52
3.2.2.3 Transformação genética de <i>P. pastoris</i> com o plasmídeo recombinante pPGKA1 e seleção dos clones transformantes	53
3.2.2.4 Confirmação da transformação por sequenciamento do produto de PCR.....	53
3.2.3 Seleção dos clones recombinantes melhores produtores de proinsulina (A1).....	53
3.2.3.1 Seleção pelo aumento na concentração de zeocina	53
3.2.3.1 Seleção por <i>dot-blotting</i>	53
3.2.4 Análise do crescimento do clone de <i>P. pastoris</i> (A140) e produção de proinsulina A1	54

3.2.4.1	Análise da expressão/secreção da proinsulina A1	54
3.2.4.2	Determinação de curva de crescimento	54
3.2.5	Purificação e análise eletroforética da proinsulina A1	54
3.2.6	Otimização da produção da insulina em <i>P. pastoris</i> em frasco agitados	55
3.2.6.1	Seleção dos meios de cultivo (YPD e YNB).....	55
3.2.6.2	Medida massa seca e densidade ótica.....	55
3.2.6.4	planejamento estatístico experimental das condições de cultivo de <i>P. pastoris</i>	56
3.2.6.4.2	Experimento 2 - planejamento experimental (2 ⁴) com 30 ensaios.	58
3.2.6.4.3	Experimento 3 - planejamento experimental (2 ³) total 20 ensaios.	59
3.2.7	Análise quantitativa do RNA mensageiro (mRNA).....	60
3.2.7.1	Quantificação dos resultados da qPCR.....	61
3.2.8	Quantificação do RNA mensageiro de proinsulina por PCR em Tempo Real.....	62
3.2.8.1	Determinação da curva padrão de DNA para uso no PCR em Tempo Real	62
3.2.9	Determinação de biomassa	63
3.2.10	Análise estatística	64
3.3	Protocolos gerais	65
3.3.1	Preparo de hospedeiras <i>E. coli</i> quimiocompetentes (COHEN, 1972).....	65
3.3.2	Transformação de <i>Escherichia coli</i> por choque térmico (COHEN, 1972).....	65
3.3.3	Extração de DNA plasmidial (BIRNBOIM & DOLY, 1979).....	65
3.3.4	Eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK et al. 2001).....	66
3.3.5	Preparo de hospedeiras <i>E. coli</i> eletrocompetentes.....	66
3.3.6	Transformação genética de <i>E. coli</i> por eletroporação (CHASSY & FLICKINGER, 1987).....	67
3.3.7	Extração de DNA plasmidial (maxi-prep).....	67
3.3.8	Análises de restrição.....	67
3.3.9	Preparo de <i>Pichia pastoris</i> eletrocompetentes.....	67
3.3.10	Eletroporação da hospedeira <i>P. pastoris</i> GS115	68
3.3.11	sequenciamento do produto de PCR.....	69
3.3.12	Seleção dos clones de <i>P. pastoris</i> recombinates por <i>dot-blotting</i>	69
3.3.13	Precipitação de proteínas com TCA e acetona	70
3.3.14	Gel de poliacrilamida e coloração com azul brilhante de Coomassie (LAEMMLI, 1970).....	70
3.3.15	Coloração com prata rápida em micro-ondas (BLUM et al. 1987).....	70

3.3.16 Detecção das proteínas por <i>Western blotting</i> Johnson et al. (1984).....	71
3.3.17 Quantificação por imunoenaios-ELISA.....	71
3.3.18 Extração do RNA mensageiro (RNAm).....	72
3.3.19 Reação de Transcrição Reversa (RT)	72
3.3.20 PCR em Tempo Real	73
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1 A sequência codificadora da proinsulina A1	76
4.2 Subclonagem da sequência codificadora da mini-proinsulina A1 no vetor de expressão/secreção pPGK.....	78
4.3 Transformação genética de <i>P. pastoris</i> com o plasmídeo recombinante pPGKA1..	81
4.4 Seleção dos clones recombinantes melhores produtores de proinsulina (A1).....	83
4.4.1 Seleção por zeocina	83
4.4.2 Seleção por imuno dot-blotting	85
4.5 Análise do crescimento do clone de <i>P. pastoris</i> (A140) e produção de proinsulina A1	89
4.6 Otimização da produção da insulina em levedura através de planejamento estatístico experimental	95
4.7 Análise da expressão do gene da proinsulina em nível de transcrição	107
CONCLUSÕES	111
PERSPECTIVAS FUTURAS	112
REFERÊNCIAS	113
ANEXO	130

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma patologia crônico degenerativa, que acomete indivíduos em todas as faixas etárias, sendo considerado um problema de saúde pública com alta morbidade, mortalidade, atingindo tanto os países desenvolvidos quanto países em desenvolvimento. Essa doença acomete cerca de 7,6% da população adulta entre 30 e 69 anos e 0,3% das gestantes. Cerca de 50% dos portadores de diabetes desconhecem o diagnóstico. A administração de insulina é usada para corrigir a deficiência endócrina, (OLIVEIRA, 2005; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004).

Com o advento da biologia molecular, na década de 1980, sintetizou-se, via tecnologia do DNA recombinante, a insulina humana. Além da diminuição do tempo de produção das proteínas de interesse, a técnica alcança altos índices de expressão em bactérias ou leveduras, sendo também a insulina mais utilizada por não haver questões de incompatibilidade como os produtos anteriores, estes derivados de animais (suínos). A produção da proinsulina humana em *Escherichia coli*, chega a representar 20% das proteínas totais da bactéria e a produção a partir dessas bactérias recombinantes, obtidas nas condições de cultura chega a 1 g de proinsulina para cada 17 litros de cultura (ASTOLFI et al., 2000).

As leveduras metilotróficas tornaram-se atraentes sistemas para a produção industrial de proteínas recombinantes, pois permitem rígido controle da expressão pela simples manipulação do meio de cultura. Do ponto de vista de manipulação genética, *Pichia pastoris* apresenta uma série de vantagens sobre *Sacharomyces cerevisiae*, destacando-se as seguintes: maior produtividade; ausência de hiperglicosilação; crescimento em meio com metanol que inibe o crescimento de contaminantes; sistema rentável para estabelecimento e manutenção em escala industrial; integração estável para várias cópias do DNA transformante (CREGG et al., 2000; DEMAIN & VAISHNAV, 2009).

Os primeiros vetores para transformação de *Pichia* foram baseados promotor do gene álcool oxidase 1, que é induzido por metanol, a partir destes vetores, foram desenvolvidos métodos de transformação, marcas de seleção e estratégias de fermentação a fim de explorar o potencial deste sistema. O mecanismo de ativação do gene *AOX1* envolve dois processos: a indução de seu promotor por metanol e a desrepressão pela ausência de outras fontes de carbono, como a glicose. A simples desrepressão não resulta em qualquer ativação do gene *AOX1*, pois é necessária a

presença de metanol como ativador para a indução do gene (CREGG et al., 2000).

Estes vetores tornaram-se os mais difundidos em *P. pastoris* sendo que mais de 500 proteínas já foram expressas neste sistema. Muitos estudos têm sido realizados em busca de novos promotores alternativos que substituam o AOX1 devido a algumas desvantagens como, por exemplo, o uso do metanol como indutor que é tóxico em determinadas concentrações, assim como os subprodutos gerados durante seu metabolismo (Ex: formaldeído e o peróxido de hidrogênio). Além disso, a necessidade de esperar a exaustão do glicerol antes da adição do agente indutor, nas fermentações de grande escala, existe o risco de incêndios pelo armazenamento de quantidades elevada de metanol e, em fermentações pequenas, há uma rápida evaporação do metanol dificultando seu monitoramento no meio, o que torna este processo laborioso (ROSENFELD et al., 1999; CEREGHINO & GREGG, 2000; CREGG et al., 2004; MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

Dessa forma a estratégia empregada é justificada por dois fatores importantes, o primeiro é relacionado ao papel terapêutico e o potencial econômico encerrado na insulina humana recombinante e sua demanda de mercado em futuro próximo para melhoria da qualidade de vida do portador desta deficiência insulínica, além do fato que doenças como a *diabetes mellitus* exercem impactos econômicos e sociais de grande magnitude em todos os setores da sociedade brasileira. O segundo aspecto importante é o uso de sistema de expressão utilizando *P. pastoris* para expressar a insulina recombinante utilizando vetores compatíveis para este sistema, que possam substituir, pois os principais vetores de expressão de *P. pastoris* são baseados no promotor do gene *AOX1*. Assim supomos que a otimização do gene da insulina com códons preferenciais para *P. pastoris*, e utilização de um vetor com promotor gene *PGK1* de *P. pastoris* funcionaria como veículo eficiente para a expressão e secreção de insulina na hospedeira *P. pastoris*. O objetivo geral deste trabalho foi a produção de proinsulina humana pela levedura *Pichia pastoris* utilizando um vetor com promotor do gene *pgk*.

Os objetivos específicos foram desenhar e sintetizar o gene da proinsulina com códons preferenciais para *P. pastoris*; Subclonar o gene da proinsulina em vetor de expressão/secreção de *P. pastoris*; transformar e selecionar levedura recombinante; expressar proinsulina humana em *P. pastoris* em frascos; avaliar a expressão o gene de proinsulina humana; melhorar as condições de cultivo em frasco visando o aumento da produção; analisar a expressão do gene em nível da transcrição por PCR em tempo real; analisar a expressão do gene em nível de tradução por ELISA.

2 REVISAO DA LITERATURA

2.1 A *diabetes mellitus* (diabetes melito)

A *diabetes mellitus* é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de deficiência na secreção de insulina, na ação da insulina, ou ambos. A hiperglicemia crônica do diabetes está associada com a idade, danos, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneo com múltiplos fatores etiológicos (genéticos, virais, imunológicos, etc.), que condicionam a deficiência relativa ou absoluta de insulina, resistência à sua utilização ou ambas, causando hiperglicemia, persistência dos níveis elevados de glicose no sangue (American Diabetes Association, 2004; MIRANDA, 2007).

A classificação etiológica proposta atualmente para o diabetes melito inclui 4 categorias: diabetes melito tipo 1, diabetes melito tipo 2, outros tipos específicos de diabetes e diabetes gestacional. No tipo 1 ocorre a destruição das células beta do pâncreas, usualmente levando à o organismo a deficiência completa de insulina e no diabetes tipo 2 ocorre a diminuição de secreção e resistência à insulina, há também outros tipos específicos (defeitos genéticos da função da célula β , defeitos genéticos da ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, indução por drogas ou produtos químicos, infecções, formas incomuns de diabetes e diabetes gestacional).

Em resumo os sintomas característicos dessa doença são sede excessiva e frequente micção, levando à ingestão de grandes volumes de água. Essas alterações são devidas à excreção de grandes quantidades de glicose na urina (glicosúria). O grande volume de urina no diabetes reflete a necessidade do rim para excretar certa quantidade de água junto com a glicose, pois a capacidade desse órgão em concentrar os solutos na urina tem um limite máximo O pH do sangue de pessoas severamente diabéticas é geralmente menor que o valor normal 7,4 e pode cair até 6,8 (ou ate mais baixo), condição esta chamada de acidose, causada pela superprodução de ácidos metabólicos e pode levar a lesões irreparáveis nos tecidos, e ate à morte (WHO, 1999; MIRANDA, 2007; GROSS, 2002; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004; KUMAR, 2005; SHOBACK, 2011).

2.1.1 A história da *diabetes mellitus* e insulina

A descoberta da insulina a mais de 90 anos é considerada um dos maiores avanços médicos do século 21. Na verdade o manuscrito papiro de Ebers da época de 1500 a.C. fez referência a história do diabete e destaca a diurese frequente e abundante, sede incontrolável e emagrecimento acentuado, como suas principais manifestações clínicas. Em 1869, Langerhans identificou conjuntos de células no tecido pancreático que denominou ilhotas celulares.

Em 1889, Joseph von Mering e Oskar Minkowski durante pesquisas sobre a digestão de gorduras, observaram que a remoção do pâncreas de cães desencadeava sinais e sintomas similares aos do diabetes. Em 1908, o cientista alemão Georg Zuelzer desenvolveu o primeiro extrato pancreático injetável que suprimiu a glicosúria (ausência de glicose). No ano de 1921, Banting e Charles Best, no laboratório do fisiologista MacLeod, durante estudos em cães tentando demonstrar que a secreção exócrina pancreática poderia destruir o composto químico sintetizado pelas ilhotas de Langerhans, descobriram e isolaram a insulina. Essa descoberta foi o grande marco da história do diabetes melito e a grande conquista para o tratamento e a sobrevida dos pacientes diabéticos.

Em 1922, Banting e Best prescreveram extrato pancreático de insulina bovina em humanos, 15 ml de extrato injetável um paciente com diabetes. Assim em decorrência destas conquistas terapêuticas, em 1923 a Eli Lilly and Company produzia quantidades comerciais de insulina bovina. E no mesmo ano Banting e Macleod receberam prêmio Nobel de Medicina (HIRSCH et al., 2005).

Em 1926, John Jacob Abel, cristalizaram a insulina, que finalmente foi reconhecida como hormônio protéico, o qual em virtude de formulações de ações rápidas havia necessidade de múltiplas injeções diárias. A partir daí, desencadeou-se o interesse em prolongar o tempo de ação das insulinas.

Nos anos de 1930 a 1940, Hagedorn desenvolveu a insulina NPH, que possui absorção mais lenta do que a regular pois é conjugada à protamina, que retarda a absorção da insulina pelo tecido subcutâneo, nessa mesma época Scott e Fishercom sintetizaram a *Protamine-Zinc Insulin* (PZI) adicionando zinco à molécula de insulina. Em 1950 foi lançada a insulina lenta, desprovida de protamina, PZI, NPH e lenta.

As primeiros preparações comerciais de insulina continham numerosas impurezas e variavam a eficácia em até 25% entre os lotes, então em 1973 foi

desenvolvida e lançada no mercado uma nova preparação de insulina porcina livre de peptídeos imunogênicos, denominada insulina monocomponente (HIRSCH et al., 2005; PIRES & CHACRA, 2008; BROSTOFF 2007; KIN, 2003; PIRES 2008).

Com o estabelecimento de técnicas de DNA recombinante no final dos anos 1970 iniciou-se a era das insulinas bio sintéticas humanas.

Em 1977 Herbert Boyer e colaboradores desenvolveram uma insulina análoga a humana, por engenharia genética, através do emprego de cepas de *Escherichia coli*, substituindo na posição 30 da cadeia B da insulina porcina, a alanina por treonina, e mais tarde a empresa Eli Lilly and Company adquiriu o direito de fabricação.

Em 1982 um análogo da insulina humana (Humulin) foi o primeiro biofármaco aprovado pela agência reguladora Food and Drug Administration (FDA). Como efeito se intensificaram as pesquisas para o desenvolvimento de drogas recombinantes mais potentes e eficazes, o que levou ao desenvolvimento de diversos produtos alternativos altamente eficientes, como a Humalog® (Lilly), a Lantus® (Aventis) e a Levemir® (Novo Nordisk); além de outros sistemas de administração complementares às injeções subcutâneas, tais como as bombas de hormônio e as insulinas inaláveis (Exubera®) (Pfizer), AERx iDMS® e (Novo Nordisk) (PIRES & CHACRA, 2008).

As principais insulinas humana sintéticas do mercado estão relacionadas a seguir: a lispro sintetizada no final da década de 1990, é de ação ultra-rápida e fundamentou-se quimicamente em uma inversão de posições dos aminoácidos prolina (B28) e lisina (B29) na cadeia B da insulina, acelerando assim a absorção por causa de formação de hexâmeros que se dissociam rapidamente. Em seguida no análogo asparte fundamentou-se quimicamente em uma substituição na cadeia B da insulina do aminoácido prolina na posição B28 pelo ácido aspártico.

Em 2000 surge outro análogo de insulina, a glargina de ação prolongada que foi modificada em três posições de aminoácidos, na cadeia (A21), a asparagina é substituída pela glicina para aumentar a estabilidade da molécula e duas moléculas de argininas são acrescentadas na posição B31 e B32, estas alterações mudam o ponto isoelétrico da insulina, elevam o pH, e moléculas de zinco adicionadas contribuem para a lentificação de sua absorção pelos capilares sanguíneos.

O análogo detemir é de ação prolongada e foi sintetizado com uma remoção do aminoácido treonina da posição B30 e acilação do ácido mirístico na posição B29, que tem a função de “liga e desliga” da albumina proporcionando uma ação previsível e prolongada. A Gulisina (ação rápida) foi sintetizada com duas mudanças na cadeia B, na

posição B3, a asparagina é substituída pela lisina e na posição B29, a lisina é substituída pelo ácido glutâmico. A insulina disponível na forma de pó inalável (Exubera®) apesar de eficácia comprovada foi retirada do mercado nacional pelo baixo consumo (HIRSCH al., 2005; BROSTOFF 2007).

2.1.2 A Insulina, estrutura, produção e secreção

O pâncreas endócrino contém aproximadamente 1 milhão de células nas *ilhas de Langerhans*, dentro dessas ilhotas, encontram-se quatro tipos de células, as células-beta, responsáveis pela produção de insulina; as células alfa, produtoras de glucagon; as células delta, que liberam *somatostatina*; as células PP, que produzem peptídeos pancreáticos (NELSON et al., 2006). A insulina é um hormônio proteico não glicosilado, é responsável pelo controle da absorção de açúcar presente na corrente sanguínea, através do mecanismo de transdução de sinal que ativa os receptores de glicose presentes na membrana plasmática de hepatócitos e células musculares, capazes de captar moléculas excedentes para serem estocadas como glicogênio. Essa proteína é essencial no consumo de carboidratos, na síntese de proteínas e no armazenamento de lipídios (GOLDMAN et al., 1979).

Kjeldsen et al. (2000), caracterizaram a insulina como um hormônio formado por um pequeno polipeptídeo composto por 51 aminoácidos, com massa molecular de 5,8 kDa e ponto isoelétrico em pH 5,4. Suas moléculas existem sob a forma monomérica apenas em concentrações inferiores a 0,6 µg/mL. Apresenta três ligações dissulfeto que se estabelecem entre as cisteínas A6 e A11, formando um anel de seis aminoácidos virado para o exterior, A7 e B7; A20 e B19 (Figura 1).

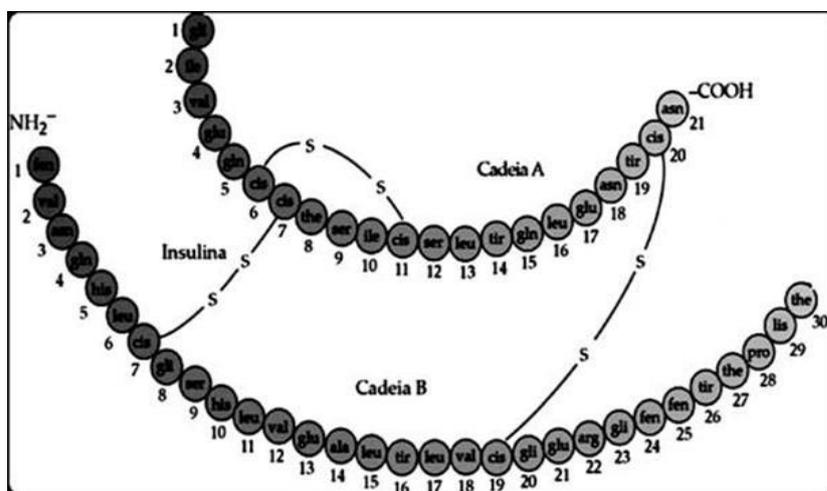


Figura 1. Sequência de aminoácido da insulina

Fonte: www.medicinanet.com.br.

Steiner & Oyer (1967) descreveram que a insulina humana é produzida nas células β - pancreáticas (localizadas dentro dos conjuntos de células de 100 a 200 μm conhecidos como Ilhotas de Langerhans), sob a forma de uma única cadeia polipeptídica longa. Denominada proinsulina, esta molécula é transportada para o aparelho de Golgi onde é acumulada em grânulos secretores. As células β - pancreáticas estão dispersas pelo pâncreas de muitos vertebrados superiores, constituindo cerca de 1% da massa do órgão.

A insulina humana, como muitos hormônios proteicos antes ser secretado, se apresenta na forma de um precursor (massa molecular de 9.000 Daltons e ponto isoelétrico aproximado de 5,8). Esse precursor é seguido de clivagem proteolítica, para gerar o hormônio ativo (STEINER, 1967; WANG & TSOU, 1991).

A proinsulina humana possui uma cadeia polipeptídica simples, estabilizada por três pontes dissulfeto e organizada em três segmentos distintos: o peptídeo C e as cadeias A e B, conforme ilustrado na figura 2.

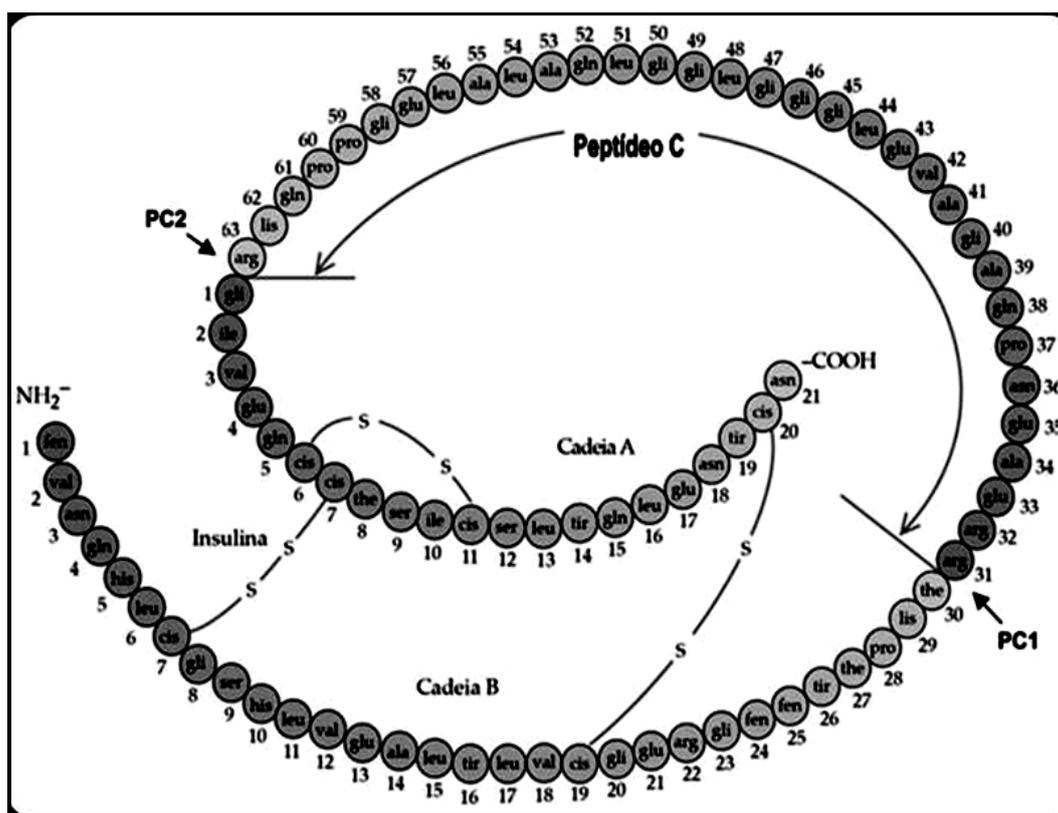


Figura 2. Representação esquemática da proinsulina humana com os sítios de clivagem das convertases PC1 e PC2, o peptídeo C, as cadeias A e B e as três pontes dissulfeto estabilizadoras da estrutura.

Fonte: www.medicinanet.com.br.

A conversão de proinsulina em insulina ocorre por clivagem proteolítica no aparelho de Golgi. A insulina é depois armazenada em grânulos rodeados por membranas bem individualizadas. Nestes grânulos existe proinsulina, insulina-Zn²⁺, peptídeo C e dopamina (cuja função parece ser a de impedir a liberação do conteúdo do grânulo). Desse modo, a insulina é produzida sob a forma de um único polipeptídeo, a pré-proinsulina, com uma cadeia de 110 aminoácidos. Os vinte e quatro primeiros aminoácidos formam o peptídeo sinal e têm a função de facilitar a entrada do mesmo no retículo endoplasmático. Durante esse processo, o peptídeo sinal é separado da proteína, resultando na formação precursora da insulina (a proinsulina). Essa molécula resultante, na qual as cadeias A possui 21 aminoácidos e a cadeia B possui 30 aminoácidos estão ligadas pelo peptídeo conectante C (32 aminoácidos). Ela adquire sua conformação com a formação de duas pontes dissulfetos e é transportada para o aparelho de Golgi, onde vai ser empacotada em grânulos de estoque. Duas endoproteases, PC1 e PC2 catalisam as clivagens proteolíticas nas terminações carboxila dos aminoácidos Arg 32 e Arg 65 da cadeia polipeptídica. Com a remoção do peptídeo C, dois pares de aminoácidos básicos expostos nas novas extremidades são posteriormente removidos pela ação de carboxipeptidases adicionais, produzindo a insulina madura no interior das vesículas do complexo de Golgi, local de armazenamento natural do hormônio processado (STEINER et al., 1996; KAUFMANN et al., 1997).

E relevante ressaltar que uma pequena quantidade de proinsulina (2 a 3%) escapa da conversão e é secretada juntamente com insulina durante a estimulação das células beta. Entretanto, pacientes gravemente hiperinsulinêmicos (grave resistência à insulina) mostram até 40% de insulina imunorreativa está na forma de precursor proinsulina e apresenta uma ação levemente hiperglicêmica. A desordem clínica que mais consistentemente resultada em níveis séricos elevados e o insulinoma. Níveis aumentados de proinsulina tem sido reportado em pacientes com insuficiência renal crônica, hipertireoidismo e hiperinsulinemia familiar. Pode ser útil no diagnóstico da hipoglicemia factícia. Estudos "*in vitro*" e "*in vivo*" revelaram que a clivagem ocorre preferencialmente na ligação Arg32, Glu33 da proinsulina e que aproximadamente 2,5% da proinsulina escapa do processo de clivagem e portanto, uma quantidade relativamente pequena deste precursor hormonal pode ser detectada nos grânulos maduros e na circulação sanguínea (NASCIMENTO et al., 1996).

Em síntese a insulina é uma pequena proteína (5.800 Da), com duas cadeias de polipeptídeos, A e B, unidos por duas pontes dissulfeto. É sintetizada no pâncreas como um precursor inativo de cadeia única, a pré-proinsulina com uma sequência sinal amino-terminal que direciona sua passagem para vesículas secretora. A remoção proteolítica da sequência sinal e a formação de três ligações dissulfeto produz proinsulina, que é armazenado em grânulos secretores nas células beta do pâncreas (figura 03).

Quando há glicemia elevada desencadeia secreção de pró-insulina convertida para insulina ativa por proteases específicas que fazem a clivagem de duas ligações peptídicas para formar a molécula da insulina madura.

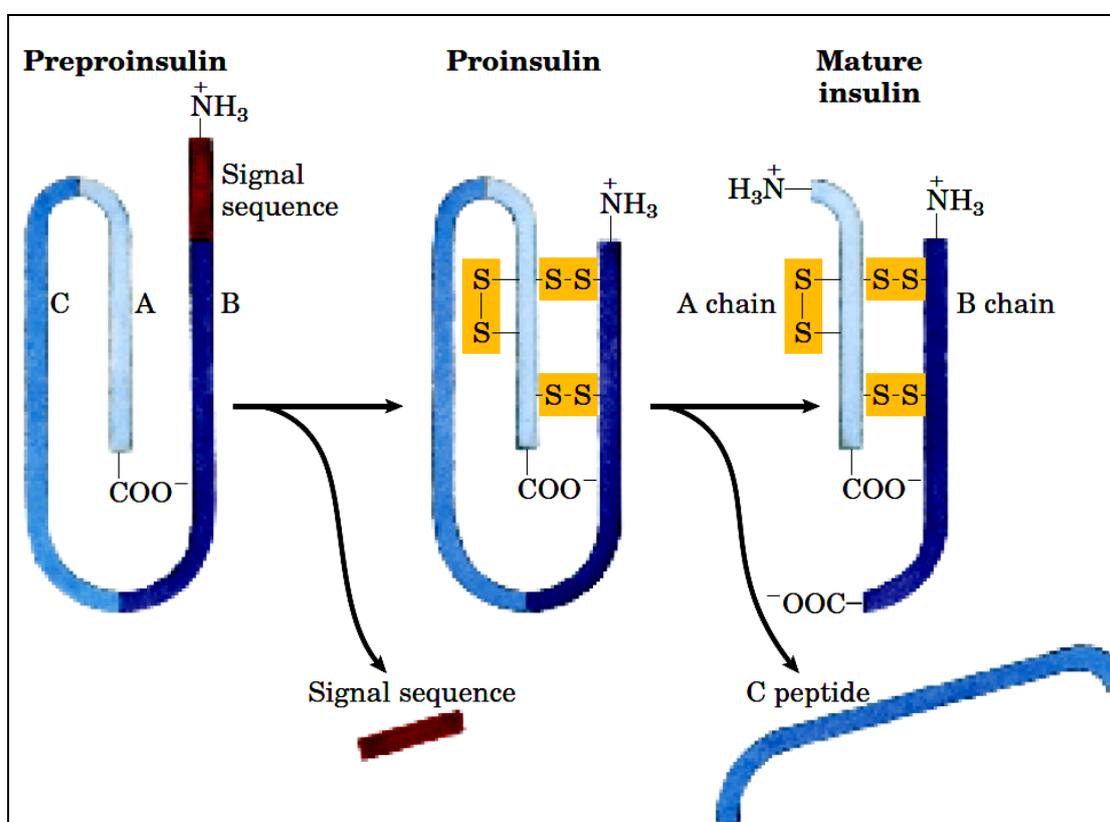


Figura 3. A insulina madura é formada a partir do seu precursor a preproinsulina por processamento proteolítico. A remoção de um segmento de 23 aminoácidos (a sequência de sinal) no terminal amino da preproinsulina e formação de três ligações dissulfeto produz pró-insulina. Novos cortes proteolíticos removem o peptídeo C da proinsulina para produzir insulina madura, composto por cadeias A e B.

Fonte: Silverthorn, 2003.

2.2 Expressão heteróloga de insulina recombinante

A tecnologia do DNA recombinante possibilita a obtenção de organismos com características novas ou não encontradas na natureza, o que permite uma nova alternativa para desenvolvimentos de produtos biotecnológicos. Desse modo, células de bactérias, leveduras e mesmo eucariontes superiores como plantas podem ser programadas com genes exógenos, abrindo a perspectiva de produção de polipeptídeos de interesse nestes organismos, como o interferon, o hormônio de crescimento e a insulina entre outros. Devido ao fato dos microrganismos secretarem quantidades limitadas de proteínas ou outras proteínas e peptídeos, a expressão heteróloga em outras células hospedeiras tem sido empregada para potencializar a obtenção desses produtos de interesse biotecnológico.

David Goeddel, et al. (1978), conseguiram obter quantidades razoáveis da molécula recombinante de insulina em hospedeiras *E. coli*. Os genes sintéticos da insulina humana A e B cadeias foram clonados separadamente no plasmídeo pBR322.

Em estudo Markussen et al., 1986; Thim et al., 1986; EgeL-Mitani et al., 1988 relataram a expressão em linhagens de *E. coli* de vários precursores de insulina, variando aminoácidos no mini-peptídeo da cadeia C e na região espaçadora. Alcançaram o melhor rendimento (240%) usando a extensão (EEAEAEAPK) e a mini cadeia C (AAK), (figura4). O precursor de insulina foi clonado no plasmídeo PJ154 na sequência do α -fator. A proinsulina é formada por uma cadeia B (aa 1-29) ligado por mini-peptídeo C (5 aa) à cadeia A (aa 1-21). A idealização de uma minicadeia C na proinsulina conseguiu melhorar o processo de renovelamento e aumentar a eficiência do rendimento da produção de insulina em níveis de até 25 % do total da proteína.

Name	Plasmid	Extension	C-peptide	Yield
MI5	pAK405	none	SDDAK	100 %
EA-MI5	pAK387	EAEAEAK	SDDAK	215 %
EEA-MI5	pAK456	EEAEAEAK	SDDAK	220 %
EEAE-MI5	pAK455	EEAEAEAEAK	SDDAK	235 %
MI3	pJB157	none	AAK	80 %
EEA-MI3	pJB152	EEAEAEAK	AAK	200 %
EEAE-MI3	pJB153	EEAEAEAEAK	AAK	210 %
EEAP-MI3	pJB154	EEAEAEAPK	AAK	240 %

Figura 4. Representação esquemática dos vários precursores de insulina

Fonte: Markussen (1986)

Diversos trabalhos relatam a produção da insulina e aperfeiçoamento em bactéria, leveduras e plantas. Em bactérias quando há a expressão maciça de proteínas ocorre um problema relacionado à formação de corpúsculos de inclusão, agregados proteicos pouco solúveis. O problema de formação de corpos de inclusão em bactérias foi contornado com a utilização de um sistema de expressão da proinsulina fusionada a uma cauda “his-tag” N-terminal, a qual auxiliou o processo de purificação do hormônio, levando a purificação da proteína a alcançar rendimento de 20-40 % (CHANG, et al., 1988; NILSSON et al., 1996).

A partir dos melhoramentos em bactérias, iniciou-se uma fase de expressão de insulina em eucariotos Kjeldsen et al. (1999) foram os primeiros a expressar proinsulina recombinante utilizando *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Em estudos (CLARE et al., 1991; ROMANOS, 1995) relatam que a produtividade de proteína heteróloga na faixa de 1 g/L não é rara, sendo que há um caso excepcional em que foram obtidos 12 g/L de antígeno tetânico, geralmente a mensagem genética externa é integrada no cromossomo, o que confere sua estabilidade mesmo sem pressão seletiva em fermentadores de grande capacidade.

Astolfi et al. (2000) relatam que a produção da proinsulina humana em *E. coli* alcançou um rendimento de 1 g para cada 17 litros e densidade celular de 10⁹ células por mL). O gene sintético da proinsulina subclonado no vetor de expressão pPTA1, (linhagem N4830-1 de *E. coli* com repressor cI termossensível).

Diversos estudos abrangem a produção da proinsulina humana em levedura *Pichia pastoris* e afirmam ser um sistema bastante eficiente (WANG et al., 2001; PAIS et al., 2003; PAIS-CHANFRAU et al., 2004; MANSUR et al., 2005; PAIS et al., 2006; XIE et al., 2008; HAI-FENG HANG et al., 2008; ZHU et al., 2009; CHANDRASEKHAR, et al., 2010).

Em consequência desse desenvolvimento de insulinas recombinantes mais potentes e mais eficazes, houve aumento significativo na oferta desse hormônio recombinante no mercado, isso abriu concorrência dentro e fora dos EUA, e houve queda drástica nos preços pagos pelos consumidores em todo o mundo (DEMAIN & VAISHNAV, 2009).

Saccharomyces cerevisiae e *Pichia pastoris* são as leveduras mais empregadas industrialmente para a produção de proteínas heterólogas. O primeiro eucarioto com o genoma completamente sequenciado e um dos sistemas de expressão melhor estudado é a levedura *S. cerevisiae*. A sua genética, está entre as mais desenvolvidas e as técnicas

de cultivo e fermentação são bem dominadas. Apesar de realizar várias modificações pós-traducionais importantes glicosilação, formação de pontes dissulfeto e de possibilitar a secreção de proteínas recombinantes, e este sistema é geralmente incapaz de atingir os mesmos níveis de expressão atingidos pelo uso da bactéria *E. coli* (GOFFEAU, 1996).

A levedura *Pichia pastoris*, reclassificada como *Komagataella pastoris*, e vastamente utilizada para a expressão de proteínas heterólogas em fermentação de larga escala, possui características vantajosas, tais como: expressão extracelular, fácil manipulação genética, forte preferência para crescimento aeróbico promovendo altas densidades celulares e ainda faz modificações pós-traducionais, como processamento proteolítico, dobramentos, formação de pontes dissulfeto, metilação e glicosilação (CREGG et al., 2000; GELLISSEN, 2000; HOHENBLUM et al., 2004). Entre suas características fisiológicas é apresentada como metilotrófica pois apresenta a capacidade para crescer em meio contendo metanol como única fonte de carbono. Isto ocorre graças à hiperexpressão de uma enzima peroxissomal chamada álcool oxidase que pode atingir 30% das proteínas intracelulares na presença de metanol (COUDERC & BARATTI, 1980).

Essa levedura foi uma promissora fonte de proteínas (*single cell protein, SCP*) nos anos 70; a partir dos anos 80, a empresa *Phillips Petroleum* e o *Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates Inc.* (SIBIA) desenvolveram *P. pastoris* como sistema de expressão heteróloga de proteínas. (CREGG, 2004; MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

Segundo Torres e Moraes (2001), a maioria das proteínas expressas pela levedura é glicosilada e o tamanho da cadeia de carboidratos adicionados por ela é bem menor que aquele adicionado por *S. cerevisiae*. A estrutura destes oligossacarídeos é muito similar à adicionada em mamíferos e, por não ser capaz de adicionar manoses terminais com ligações alfa-1,3, como *S. cerevisiae*, em geral as proteínas produzidas em *P. pastoris* são menos imunogênicas; diferentemente de outras leveduras utilizadas para expressão de genes exógenos *P. pastoris* normalmente não realiza hiperglicosilação da proteína secretada, não interferindo, portanto, nos processos de enovelamento e dobramento finais da proteína madura (CREGG et al., 1989; GUO et al., 2008).

As linhagens de *P. pastoris* combinadas com os vetores adequados estão disponíveis para a expressão de proteína recombinante de interesse, crescendo bem em

meio simples de sais minerais e proporciona altas densidades celulares. Para uma produção economicamente viável de proteínas recombinantes, a concentração de proteínas no meio deve ser proporcional à quantidade de células. Sendo assim, é necessário atingir níveis de alta densidade celular os quais não são facilmente obtidos com *S. cerevisiae*, ao passo que as cepas produtoras de *P. pastoris* são facilmente cultivadas a densidades celulares de aproximadamente 100 g/L de biomassa, ou até concentrações mais elevadas. Além do mais as técnicas requeridas para a manipulação genética de *P. pastoris* são semelhantes às descritas para *S. cerevisiae*, um dos mais bem caracterizados sistemas genéticos, (transformação, substituição gênica e clonagem por complementação funcional, CREGG & CEREGUINO, 2000).

A forma preferencial de transformação em *P. pastoris* é pela integração cromossomal. Há várias vantagens ao utilizar esse tipo de transformação: estabilidade do cassete de expressão, geração de transformantes com múltiplas cópias, controle do sítio de integração e a capacidade de construir diferentes modos de integração. A integração no genoma pode ocorrer via inserção por um simples evento de *crossingover*, ou por substituição gênica, através de duplo *crossingover*. A integração por inserção ocorre mais frequentemente e, pode resultar em múltiplas integrações *in tandem* do cassete de expressão a uma taxa de 1-10 %, podendo aumentar a quantidade de proteína expressa. A expressão heteróloga em *P. pastoris* pode ser intracelular ou extracelular. O sistema de produção extracelular apresenta a vantagem da liberação da proteína de interesse no sobrenadante do meio de cultivo (SREEKRISHNA et al., 1997; CEREGHINO; CREGG, 2000).

A secreção requer a presença da sequência sinal que direciona a proteína para esta via. Uma variedade de sequências sinais é utilizada com sucesso o sinal de secreção de 85 resíduos de aminoácidos do fator - α de *S. cerevisiae* mostrou-se mais eficiente é o mais utilizado nos vetores de expressão de *P. pastoris*. Durante a via de secreção, o peptídeo sinal do fator- α é clivado por uma peptidase-sinal presente na membrana do retículo endoplasmático.

Após a proteína ganhar o lúmen do retículo endoplasmático, a protease Kex2p da levedura reconhece o sítio de clivagem Lys-Arg e libera o peptídeo sinal. A repetição Glu-Ala quando presente próximo ao sítio de clivagem de Kex2p pode aumentar a atividade desta proteína, e será posteriormente removida da proteína madura pela ação de uma diaminopeptidase, produto do gene STE13 (CREGG & CEREGUINO, 2001; DALY & HEARN, 2005).

A expressão de proteínas heterólogas pode ser realizada em culturas utilizando frasco agitados, porém, as condições estabelecidas em frascos precisam de poucos ajustes durante escalonamento para volumes maiores em fermentadores. O sistema de expressão de *P. pastoris* tem sido cada vez mais utilizado e tem-se mostrado como uma atraente alternativa para a hiperexpressão de genes humanos e de animais para fins biotecnológicos. Nos últimos anos, o número de publicações detalhando o uso desse sistema de expressão para pesquisa tem crescido rapidamente. Isto vem refletindo no aumento de seu uso para produção industrial de proteínas heterólogas, substituindo métodos mais convencionais, como a produção em *E. coli* e *S. cerevisiae*. De acordo com os estudos disponíveis, há uma probabilidade de aproximadamente 50-75 % de se expressar qualquer proteína de interesse em *P. pastoris* em um nível considerável. Mais de 400 proteínas já foram expressas nesta levedura com graus variados de sucesso (CEREGHINO et al., 2002; MACAULEY- PATRICK et al., 2005).

Embora o rendimento final de uma proteína seja influenciado principalmente por suas propriedades inerentes, pode significativamente ser realçado pela manipulação de fatores que influenciam a expressão do gene e a estabilidade do produto. Entre estes fatores está a utilização de códons preferenciais para *P. pastoris* no gene de interesse, a otimização da composição dos meios de cultivo, o ajuste de alguns parâmetros físicos da cultura (pH, temperatura, disponibilidade de O₂), assim como, o uso de promotores, sequências sinais e sítios de integração que induzam a maior produção da proteína (INAN et al., 2006).

2.2.1 Vetor de expressão usando promotor pPGK de *Pichia pastoris*

A enzima PGK pode compor cerca de 5 % do total de proteínas celulares e seu mRNA é também abundante, sendo a proteína constitutivamente expressa e seu promotor considerado forte. Essa enzima participa da via glicolítica 3 - fosfoglicerato quinase (PGK) atuando no metabolismo da glicose transferindo o grupamento fosfato do 1,3 bisfosfoglicerato para o ADP gerando o primeiro ATP da via e 3-fosfoglicerato.

Dado o exposto vetores que carregam o promotor PGK1 podem ser induzidos por qualquer fonte de carbono, por isso estão entre os mais eficientes sistemas empregados para expressão constitutiva de proteínas heterólogas em distintas leveduras podendo servir como alternativa ao promotor AOX1. Quando este promotor está presente em um plasmídeo, ele pode dirigir a produção da proteína para níveis de 30-40 % da proteína celular total, embora níveis menores sejam obtidos quando proteínas heterólogas são expressas. Quando altos níveis de expressão gênica são requeridos pode se utilizar esse forte promotor, o que é particularmente atraente para a produção de proteínas em larga escala. Em vista disso a região promotora do gene PGK1 tem sido utilizado na construção de vetores de expressão para diversas leveduras, como: *S. cerevisiae* (BURKE et al., 2000; KINGSMAN et al., 1985; GRANGE et al., 1996), *Candida maltosa* (MASUDA et al., 1994), *Yarrowia lipolytica* (DALL et al., 1996); *P. pastoris* (ALMEIDA et al., 2005) e fungos filamentosos: *Rhizopus niveus* (TAKAYA et al., 1994) e *Trichoderma reesei* (VANHANEN et al., 1989, 1991).

Almeida et al. (2005) descrevem que gene *PGK* de *P. pastoris* possui uma ORF de 1251 pb que codifica uma proteína de 416 resíduos de aminoácidos. O promotor do gene *PGK1* de *P. pastoris* é forte e constitutivo e permite a produção de proteínas sem a necessidade da etapa de crescimento em outra fonte de carbono, como ocorre com o promotor AOX (expressão induzida com metanol). Arruda et al. (2008) descrevem uma redução no tamanho no promotor do gene PGK para 410 pb e seu uso com êxito na produção de alpha-amilase de *Bacillus subtilis* na levedura *P. pastoris*. O vetor com promotor do gene pPGK_e foi utilizado para a subclonagem do gene A1 e para expressão heteróloga das proinsulinas em *P. pastoris*.

O vetor de expressão pPGK Δ 3Amy utilizado neste trabalho foi cedido pelo professor Dr. Fernando Araripe Torres da Universidade de Brasília (DF).

Na figura 5 é demonstrado o mapa físico do pPGK Δ 3Amy e todos os itens que compõem o vetor.

Um promotor PGK (~ 410 pb), que é o promotor do gene PGK da levedura *P. pastoris* que dirige a expressão constitutiva com êxito de proteínas na levedura *P. pastoris*.

Uma região de terminação da transcrição (AOX1TT), região terminação da transcrição nativa.

Sinal de poliadenilação do gene AOX1 (~ 260 pb) que permite eficiente processamento do 3' do mRNA incluindo poliadenilação para aumentar a estabilidade do mRNA.

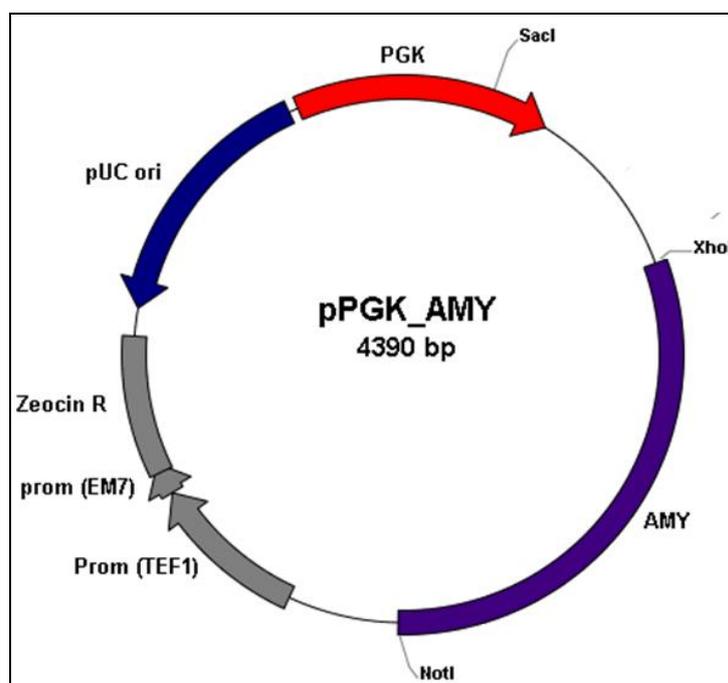
Um promotor do fator de alongação da transcrição (pTEF), que é o promotor do gene de *S. cerevisiae* que dirige a expressão do gene de resistência à Zeocina™ em *Pichia pastoris*.

Um promotor (pEM7) - promotor procariótico sintético que impulsiona a expressão constitutiva do gene de resistência da Zeocin™ em *E. coli*.

O gene de resistência para zeocina (marca de seleção *Sh ble*).

Região terminadora de transcrição na extremidade 3' do gene CYC1 de *Saccharomyces* que permite eficiente processamento do 3' do mRNA para aumentar a estabilidade do gene de resistência zeocina.

Uma origem de replicação de pUC18 que permite a replicação e manutenção do plasmídeo em *E. coli* e um gene da α -amilase de *B. subtilis* como gene repórter.



Fonte: Snapgene 2015

Figura 5. Vetor de expressão pPGK_3AMY

O gene *PGK1* de *P. pastoris* foi identificado como sendo de cópia única no genoma de *P. pastoris* e na região promotora do gene (*PPGK*) foram encontrados elementos *cis* regulatórios também presentes em outros promotores *PGK* de outras leveduras. O *TATA box*, que é responsável pela correta iniciação da transcrição, foi identificado na posição -71. O *ATG* do gene *PGK* e o elemento *heat shock* (*HSE*) na posição -425 a -440, são responsáveis pelo aumento dos níveis de mRNA quando a temperatura é aumentada, o que mostra que em *P. pastoris* este gene é sujeito a termo-regulação. Outros elementos relevantes encontrados no *PGK1* são os sítios de ligação para a proteína *Gcr1* que é essencial para ativação em altos níveis dos genes da via glicolítica como relatado em *S. cerevisiae* (DOMINOFF & SANTANGELO, 2001; PIPER et al., 1988; ARRUDA et al., 2011).

Waterham et al. (1997) comparam a força dos promotores *AOX* (induzível) e *GAP* (constitutivo), ambos com cópia única integradas no locus *his4*, destacaram que o promotor *GAP* era capaz de dirigir maior produção nos níveis de β -lactamase que o *AOX* em culturas crescidas em glicose. Entretanto Sears et al. (1998) que estudaram os níveis de expressão da enzima β -glucuronidase sob controle dos promotores *AOX1*, *GAP* e *YPT1* demonstraram que o *AOX* foi superior aos outros (*AOX1* 587 U/mL; *GAP* 70,4 U/mL e *YPT1* 1,67 U/mL).

Estes estudos demonstram que as condições ótimas de expressão devem ser consideradas caso a caso, e que os resultados obtidos com um determinado clone, nem sempre são transferíveis para a expressão de outra proteína e que a otimização do processo deve ser buscada para cada novo produto (HONG et al., 2006).

É evidente que o tipo de promotor não é o único fator que determina os altos níveis de expressão heteróloga, mas sim, a combinação de vários fatores, como tipo vetor de expressão empregado, linhagem hospedeira, local de integração do cassete de expressão, composição do meio de cultura e propriedades da proteína a ser expressa (LUEKING et al., 2003).

A fim de gerar sistemas de expressão cada vez mais eficientes e atender a demanda, existe a necessidade de aumentar a gama de promotores, vetores de expressão e variedade de combinações destes fatores (otimização de processos).

2.3 Fatores que influenciam a expressão de proteínas heterólogas por *Pichia pastoris*

A redução no custo da produção da proteína recombinante através do melhoramento do meio de fermentação é uma etapa fundamental para a aplicação industrial. Fatores importantes afetam a expressão e a produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* e podem comprometer consideravelmente a densidade celular e o rendimento de proteínas recombinantes. Desses fatores relacionamos os seguintes, temperatura, controle de pH e definição da composição do meio (nutrientes como as fontes de carbono e nitrogênio) que são fundamentais para a obtenção econômica de células e biomoléculas em pequena escala e na transição de processos biotecnológicos para a escala industrial (WALKER, et al, 1998; STRATTON et al. 1998; SERIO et al., 2003; MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

Diferentes fatores de crescimento como vitaminas, aminoácidos, ácidos graxos, micronutrientes, nucleosídeos e nucleotídeos são requeridos em pequenas quantidades para reações metabólicas e síntese de compostos estruturais das células. Estes compostos podem ser de requerimento absoluto para o crescimento celular em algumas leveduras ou atuarem como fatores estimulantes que proporcionam uma maior velocidade de crescimento celular, além disso o extrato de levedura é uma substância complexa, relativamente de baixo custo, que fornecem proteínas, aminoácidos livres, vitaminas do complexo B e E e minerais para a obtenção de células e produção de biomoléculas em processos biotecnológicos. As leveduras do gênero *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida* e *Hansenula* apresentam variados requerimentos de fatores de crescimento celular, por outro lado a levedura *H. anomala* não requer vitaminas pré-formadas para o crescimento celular, sendo este fator utilizado como parâmetro para diferenciar espécies neste gênero (WALKER et al., 1998; CANETTIERI; SILVA E ALMEIDA; FELIPE, 2002; SILVA et al, 2004; PARRADO et al., 2006).

A produção de proteínas em frascos costuma ser menor do que em produção em larga escala (fermentadores), no entanto Barr et al (1992) desenvolveram condições de expressão muito semelhantes utilizadas em fermentadores, só que em pequenos frascos, utilizando uma alta densidade celular inicial de 0,05 mg/mL como sendo a ideal, pois a produção de proteína é superior nesta densidade em 24 horas de cultivo

A otimização é feita, tradicionalmente, variando-se um fator e mantendo os outros constantes, no entanto esta abordagem consome mais tempo e é incapaz de detectar o melhor meio de cultivo, devido principalmente, à ausência da análise de

interações entre os fatores. Uma das estratégias mais utilizadas para identificar a significância relativa dos fatores e encontrar as condições ótimas é baseada em experimentos estatísticos, como os planejamentos fatoriais. Segundo Damaso et al. (2004) a expressão de uma proteína em *P. pastoris* e otimizando a expressão através de um planejamento fatorial 2^3 com 3 variáveis (fontes de nitrogênio, temperatura e pH) e concluíram que a densidade celular inicial era o fator mais importante para aumentar a produção da proteína e não houve influência da fonte de carbono ou nitrogênio na produção.

Em relação a concentração celular os ajustes na densidade celular são importantes para melhorar o nível de expressão em *P. Pastoris* e evitar a concentração de proteases extracelulares. Shi et al. (2003) mostraram a influência da concentração de células e que a densidade acima de 40 g/L de fato proporcionaram um maior crescimento e acumulação da biomassa, houve redução da viabilidade celular e não houve decremento da produção da proteína recombinante, indicando que altas concentrações celulares desviam o metabolismo para o crescimento celular e não para a produção. Por sua vez Eldin et al. (1997), acreditam que em cultivos com alta densidade celular há um maior nível de expressão, no entanto Li et al. (2008) afirmam que densidades celulares elevadas aumentam a concentração de proteases extracelulares e podem ter efeitos prejudiciais sobre a fisiologia da célula, que por sua vez limita a quantidade do produto desejado.

A temperatura é um dos mais importantes parâmetros físicos que influenciam o crescimento das leveduras. Para a maior parte das leveduras faixa ótima de crescimento encontra-se entre os 20 e 30 °C, entretanto, outras leveduras como a *Candida utilis*, *Candida batistae*, *Candida tropicales* e *Hansenula anomala*, a temperatura de crescimento limite encontra-se próximo a 40 °C. Ainda em algumas leveduras como *Kluyveromyces marxianus*, *Wickerhamiella cacticola* esse valor é superior a 40 °C (BELEM; LEE, 1999; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002; NCYC, 2007).

A temperatura ótima de crescimento, para a *Pichia pastoris* é 30°C e, acima de 32°C é notada uma queda na expressão proteica pela célula. Entretanto, alguns autores utilizam baixas temperaturas na produção de proteínas heterológicas. Li et al. (2001,) mostraram que a diminuição da temperatura de 30°C para 23°C no crescimento desta levedura resultou em aumento de três vezes maior no teor de proteínas e Jahic et al. (2003) observaram que o uso de baixas temperaturas durante a fase de indução faz decair atividade proteolítica e lise celular.

O controle e ajuste do pH do meio de cultivo também desempenha um papel importante em processos biotecnológicos, de suma importância para estabelecer um balanço de oxido-redução necessário para o crescimento celular de microrganismos. Tais observações vão ao encontro as conclusões apresentadas por Inan et al. (1999); Stambuk, et al. (2000) Moat; Foster; Spector; (2002); Calik et al. (2010) que relataram um efeito significativo sobre as proteínas recombinantes secretadas.

Na Tabela 12 é possível visualizar a influência do pH em cultivos de *P. pastoris*. Os valores de pH para meio de cultivo estudados variaram desde 2,0 até 10,0 e que a faixa de pH que favorece o rendimento das proteínas heterólogas está entre 6,0 e 7,0. Entretanto alguns apresentaram melhor produção em pH mais alcalino, próximo a 8,0 (SHI et al., 2003; CAI et al., 2009; HOLMES et al., 2009).

Macauley-Patrick et al. (2005) relataram que a cultura de um clone foi realizada em fermentador de 1 L. O início da indução foi realizado quando a densidade celular estava elevada (6×10^4 OD600). A produção máxima atingida no fermentador foi menor que o valor encontrado na cultura em frasco com as melhores condições de produção, provavelmente por ação de proteases produzidas pela *P. pastoris*. Os autores concluíram que alguns ajustes podem ser feitos para tentar evitar essa degradação, como a adição de alguns compostos ao meio de cultivo, como casoaminoácidos, peptona, extrato de levedura, assim como a modificação de alguns parâmetros, como temperatura e pH.

Tabela 1. Influência do pH em cultivos de *Pichia pastoris*.

Faixa de pH estudada	pH com maior produção	Referência
3,0 a 7,2	7,2	Lin (2007)
3,0 a 7,0	6,8 a 7,0	Inan et al. (1999)
3,0 a 8,0	6,0 a 7,0	Boado, Ji e Pardridge, 2000)
6,0 e 7,0	7,0	Woo et al. (2002)
4,0 e 6,0	6,0	Larentis et al. (2004)
5,0 a 8,0	5,0-8,0	Cai et al. (2009)
6,0 a 8,0	7,6	Holmes et al. (2009)
4,2 a 6,0	6,0	Wan et al. (2008)
5,5 a 6,5	6,0	Aizemberg et al. (2011)
4,0 a 6,0	4,5	Soyaslan e Calik, (2011)
2,0 a 10,0	5,0 a 7,0	Maeng et al. (2012)
5,0 a 8,0	6,5 a 7,0	Hu et al. (2006)
3,0 a 8,0	6,5 a 8,0	Shi et al. (2003)
6,0 a 8,0	7,1	Jafari, Sundström e Holm, (2011)
4,2 a 6,0	5,0	Calik et al. (2010)
3,0 a 6,0	3,0	Damasceno et al. (2004)

Fonte: ARAUJO FEITOSA 2014 (com modificações).

O número de cópias integradas dos plasmídeos recombinantes de expressão/secreção afeta a produtividade da proteína, podendo ser um dos pontos determinantes da produção. Um alto número de cópias do gene heterólogo pode levar ao aumento na produção da proteína heteróloga, o que desperta o interesse na geração de transformantes com multicópias integradas no genoma da levedura. A transformação genética de *P. pastoris* ocorre por integração no genoma por recombinação homóloga. Esses transformantes que possuem alto número de cópias do vetor integrado são resistentes a altos níveis do antibiótico zeocina (CEREGHINO & CREGG, 2000; VASSILEVA, et al., 2001; ROMANOS, et al., 1995).

Outra estratégia que vem sendo bastante utilizada para aumentar a expressão é alterar os códons do gene alvo de forma que eles se assemelhem mais ao padrão de utilização de códons do hospedeiro. Para este objetivo são utilizadas as técnicas que vão desde mutações sitio direcionadas (até a síntese de genes completos (KINK et al. 1991; NAMBIAR et al., 1984).

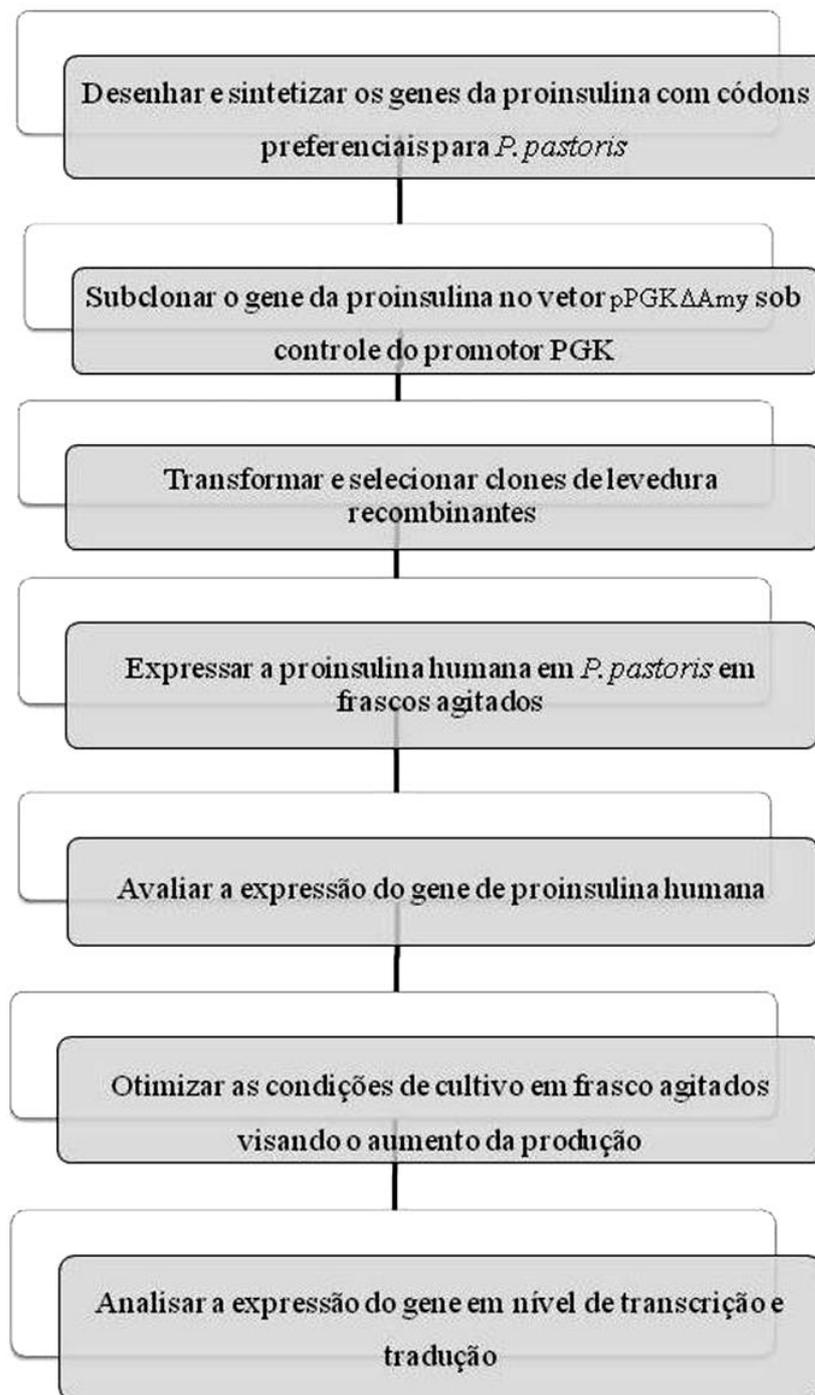
Segundo Kane et al. (1995) o código genético é degenerado, o que permite que um mesmo aminoácido seja codificado por trincas de nucleotídeos distintas e esses códons de um mesmo aminoácido não ocorrem com a mesma frequência, sugerindo que existe utilização preferencial de códons (*codon usage*). Além disso diferentes organismos geralmente apresentam códons preferenciais distintos e estas diferenças podem ser fatores limitantes no nível de expressão de genes heterólogos. A incompatibilidade na utilização preferencial de códons pode prejudicar a expressão de genes heterólogos. Em geral, quanto maior o número de códons pouco frequentes que um gene contém, maiores são as chances de a expressão proteica não atingir níveis satisfatórios. Ademais, níveis baixos de expressão são intensificados se os códons raros ocorrem em grupos ou na região N-terminal da proteína.

Dessa forma de acordo com Walker, (1998) é essencial o conhecimento dos fatores e dos efeitos combinados sobre a produção de biomoléculas para estabelecer condições ótimas de operação de diferentes processos biotecnológicos que visam à obtenção destes produtos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Estratégia experimental para produção de proinsulina humana em *Pichia pastoris*

Este trabalho foi desenvolvido em cinco etapas: desenho e síntese do gene da proinsulina, subclonagem no vetor, expressão da proinsulina em frascos agitados, otimização das condições de cultivo e análise da expressão do RNA mensageiro por PCR em tempo real.



3.1 Material

3.1.1 Microrganismos utilizados

3.1.1.1 Bactérias/Leveduras/Vetores (obtidos do Lab. Tec. DNA)

Escherichia coli DH5 α (Invitrogen)

F - 80*lacZ*M15 (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rk-, mk+) *phoA supE44 - thi - 1 gyrA96 relA*. Usada para a transformação do plasmídeo pGS3INS-A1 e pPGKAmy1.

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen®)

F - *mcrA* (*mrr - hsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ*M15*lacX74* *deoR recA1 endA1 ara139* (ara, leu)7697 *galU galK - rpsL(StrR) nupG*. Usada para a transformação do plasmídeo pGKA1

Pichia pastoris GS115 *his4* (Invitrogen®) - Esta linhagem possui uma mutação (*his4*) no gene da histidinol desidrogenase e marca de seleção dominante *Sh ble*.

Vetor de expressão pPGK Δ 3Amy - vetor utilizado neste trabalho que apresenta o promotor do gene PGK da levedura *P. pastoris* que dirige a expressão constitutiva de proteínas na levedura *P. pastoris*.

Vetor pGS3INS-A1 -Vetor utilizado neste trabalho que apresenta o gene sintético da proinsulina com codons preferenciais para *P. Pastoris*.

3.1.2 Enzimas de restrição e de ligação

- Enzimas de restrição: As enzimas *Xho* I, *Not* I, *Sac* I, *Kpn* I, *Bgl* II, *BstB* I, *BamH* I (New England Biolabs)
- T4 DNA ligase– utilizada na concentração de 40 U/ μ L (New England Biolabs) nas reações de ligação.
- RNase A - 10 mg/mL em água e fervida em banho-maria por 10 minutos (AMBION)

3.1.3 Antibióticos

- Ampicilina sódica -100 mg/mL (Sigma)
- Zeocina-100 mg/mL (Invitrogen®)

3. 1.4 Marcadores de massa molecular

Marcador de DNA/proteínas

- 1 kb Ladder O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Promega)
- Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Life Sciences)
- Prestained Protein Marker, Broad Range (New England Biolabs)
- Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (Pierce Thermo)
- Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Pierce Thermo)
- PageRuler Prestained Protein Ladder (Pierce Thermo)

Conjunto de reagentes

- Kit GFX extração e purificação de DNA de gel de agarose (GE Healthcare)
- Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit – detecção de proinsulina (CRISTA CHEM)
- WesternBreeze® Chromogenic Kit–Anti-Mouse-Cat n.WB7103–detecção de expressão em *Dot-blotting* e *western-blotting* (Invitrogen®)
- Kit Plasmid DNA Nucleo Bond XtraMaxi - extração e purificação de DNA plasmidial (Promega)
- Kit GFX Conjunto de reagentes p/ extração de DNA plasmidial (GE Healthcare)
- BCA Protein Assay Kit - (Pierce)
- Kit de sequenciamento (Applied Biosystem)
- Kit de PCR (Fermentas)

Anticorpos

- Anti-hisG P/N 46-1008, para cauda His 6 na porção n-terminal (Invitrogen):
- Anti-His (C-terminal) P/N 46-0693, (Invitrogen).
- Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse IgG (Fc) (Pierce)
- insulin/proinsulin antibody (D3E7 (5B6/6)- (Pierce)
- insulin/proinsulin antibody (D3E7 (5B6/6)- (Sigma)

3.1.5 Purificação

Coluna superdex

A Superdex™ 75 10/300 GL (Tricorn™) é uma coluna de gel molecular de alto desempenho de peptídeos. Faixa de separação (3000 - 70000). Máximo da pressão (1,8 MPa para Superdex 75). As condições usadas: eluente, tampão fosfato 50 mM, 0,15 M de NaCl, pH 7,0 e 0,5-0,75 mL / min, temperatura ambiente: Vazão do volume de amostra de 500 uL.

3.1.6 Ferramentas da bioinformática

Busca das sequências:

GenBank (NCBI) - (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Cálculo do conteúdo de G+C: “Genomics %G~C Content Calculator” - http://www.sciencebuddies.org/mentoring/project_ideas/Genom_GC_Calculator.shtml.

Blast

Análise de similaridade com bancos de dados – NCBI). Para análise das sequências nucleotídicas.

Análises de restrição:

NEBcutter V2.0- <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

Desenho do vetor circular e as ORFs

pDRAW/ Redasoft Visual Cloning

Códon Usage:

Análise dos códons preferenciais foi realizada no site *Pichia pastoris* <http://www.bio.net/mm/methods/2002-May/093475.html>.

Expasy Proteomics Server: (<http://ca.expasy.org>)

A predição pelo algoritmo SignalP analisa e faz uma previsão do provável local de ocorrência da clivagem pela enzima peptidase sinal. Escore S - relacionado a probabilidade do aminoácido pertencer a sequência sinal. Escore C - probabilidade de ser o sitio de clivagem. Destaca a posição indicada do primeiro aminoácido da proteína madura. Escore Y - deriva da combinação dos escores S e C. Tende a ser máximo no ponto de clivagem, Média de S- media do valor do escore S no peptídeo sinal, Media D- Media do valor médio de S e valor máximo de Y.

3.1.7 Meios de cultura

Meio LB (Luria-Bertani)

Extrato de levedura	0,5 %
Peptona de caseína	1,0 %
NaCl	1,0 %

O pH foi ajustado para 7,2 e esterilizado em autoclave por 15 minutos.

Meio LB Agar (Luria-Bertani)

Ao Meio LB (sólido foram adicionados 1,5% de ágar bacteriológico)

O pH foi ajustado para 7,2 e esterilizado em autoclave por 15 minutos.

Meio YPDS- (Meio extrato de levedura peptona glicose com sorbitol)

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)
Sorbitol	1 M
Ágar bacteriológico	2 % (p/v)

O pH foi ajustado para 7,0 e esterilizado em autoclave por 15 minutos.

Meio YPD-Ágar

Meio YPD adicionado de ágar bacteriológico 2 % (p/v).

Meio YPD caldo

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Destrose	2 % (p/v)

O pH foi ajustado para 7,2 e esterilizado em autoclave por 15 minutos.

3.1.8 Soluções

Eletroforese em gel agarose / gel SDS-PAGE)

Tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 10X

Tris-Base	0,89mM
Ácido bórico	0,89mM
EDTA	0,0089mM
pH ajustado para 8,5	

Tampão de amostra para gel de agarose (5X)

TBE 10X (pH 8,5)	50% (v/v)
Glicerol	30% (v/v)
Azul de bromofenol	0,025 % (p/v)

Solução Brometo de Etídio 10mg/mL

Brometo de Etídio	10mg
-------------------	------

Tampão de amostra 2X

Tris-HCl (pH 6,8)	200 mM
SDS	1 M
β-Mercaptoetanol	4 % (p/v)
Glicerol	4 % (v/v)
Azul de bromofenol	20 % (v/v)
	0,001 % (p/v)

Tampão de corrida – Tris-glicina 5X (Estoque)

Trizma base	125mM
Glicina	0,96mM
SDS	05% (p/v)

Ácido tricloroacético (TCA) 50%

TCA	50 % (p/v),
Água destilada	50 mL

Gel concentrador 5%

Acrilamida:Bis-acrilamida (29:1)	2,5 mL
Tris-HCl 1 M (pH 6,8)	5 mL
Água destilada	12,15 mL
SDS 10 % (p/v)	0,2 mL
APS 10 % (p/v)	150 mL
TEMED	0,015 mL

Gel separador 12,5%

Acrilamida: Bis-acrilamida (29:1)	12,5 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	3,75 mL
Água destilada	13,21 mL
SDS 10 % (p/v)	0,3 mL
APS 10 % (p/v)	0,225 mL
TEMED	0,015 mL

Revelação de proteínas com Coomassie azul brilhante

Solução corante	
Coomassie azul brilhante G-250	0,25 % (p/v)
Metanol	30 % (v/v)
Ácido acético glacial	7% (v/v)

Solução descorante

Metanol	30 % (v/v)
Ácido acético glacial	7 % (v/v)

Revelação rápida das proteínas com nitrato de prata**Solução de fixação**

Metanol	50 % (v/v)
Ácido acético glacial	12 % (v/v)
Formaldeído	0,1 % (v/v)

Solução de lavagem

Etanol	20 % (v/v)
--------	------------

Solução de tratamento

Tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v)

Solução de equilíbrio

Nitrato de prata 0,2 % (p/v)

Formaldeído 0,075 % (v/v)

Solução de revelação

Carbonato de sódio 6 % (p/v)

Tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v)

Formaldeído 2 % (v/v)

Solução de parada

Metanol 50 % (v/v)

Ácido acético glacial 12 % (v/v)

Soluções para Western-blotting**Tampão de transferência**

Glicina 39mM

Tris base 48mM

SDS 0,037%

Metanol 20%

Solução TBS para lavagem

Tris 2,43g

NaCl 22,5g

Tween-20 0,5mL

H₂O q.s.p 1000 mL

pH ajustado para 7,5

Tampão de bloqueio

BSA 3% (p/v)

Soluções para eletroforese de Gel Tris-Tricine

Soluções estoques	4%	12%	16,5%
	(4mL)	(5mL)	(6mL)
Mix acrilamida 49,5% (48:1,5).	0,400	0,404	2,0
Tampão Tris - tricine 3x	1,340	0,416	2,0
Glicerol 50%	-	0,500	1,200
TEMED [μ L]	2	0,560	1,5
APS 25% [μ L]	30	10,00	15
Água	2,2	2,25	0,788

1h a 30V, a cada 10min +15V 100V, então 100V

Tampão do gel Tris-Tricine (pH 8,45)

SDS	0,3 % (p/v)
Tris-HCl, pH 8,4	3 M

Tampão de amostra 2x Tricine (TSB)

Tris - HCl, pH 6,80	100 mM
Glycerol	24 % p/v
SDS	8 % (p/v)
Mercaptoetanol	5 % (v/v)
Azul de Bromofenol	0,02 % (p/v)
30min a 40°C	

Tampão Catodo (pH 8,25) 5x Tampão do Anodo

Tris 0,1 M Tris-HCl, pH 8,9	1 M
Tricine	0,1 M
SDS	0,1 % p/v
Não ajuste o pH	

3.2 Métodos

3.2.1 Desenho do gene da proinsulina com códons preferenciais para *P. pastoris*

Para a obtenção da proinsulina por síntese química foi realizada uma otimização com códons preferenciais para *P. pastoris*. Este é considerado um recurso determinante para a expressão de proteínas heterólogas, pois códons que são frequentes em umas espécies podem ser raros na célula hospedeira, resultando em um retardo temporário da tradução e/ou uma terminação prematura na tradução da proteína. Como o código genético é redundante, há possibilidade de variação da sequência de ácido nucléico e evitando os códons raros sem mudança na sequência de aminoácidos da proteína. Vários estudos demonstram que o conteúdo de G+C é muito importante e geralmente resultam em maiores níveis de expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris*.

Na figura 8 está representada a sequência codificadora da proinsulina bem como os aminoácidos preditos. A sequência nucleotídica codificante para o precursor da insulina apresenta um sitio de clivagem para enzima *XhoI* na extremidade de 5' e *NotI* na extremidade 3'. A sequência peptídica esperada para a proinsulina inclui a cadeia B (aminoácidos B1 - B29), um ligante curto ou cadeia C (aminoácidos C1 - C3), a cadeia A (aminoácidos A1 - A21). Marcadas com caixa em vermelho está o sitio de clivagem por proteases Kex2 (KR) para a remoção do peptídeo sinal e a liberação da proinsulina, seguido de uma sequência espaçadora (EEAEAEAEPK) com três a repetições glu-ala (EA) que favorecem o processamento e a secreção. A sequência codificadora da proinsulina A1 foi baseada na sequência descrita por Gurramkonda (2010). A sequência nucleotídica codificante sintética foi clonada no plasmídeo pGS3INS-A1.

XhoI		Spacer sequence														
Leu	Glu	Lys	Arg	Glu	Glu	Ala	Glu	Ala	Glu	Ala	Glu	Pro	Lys			
CTC	GAG	AAG	AGA	GAA	GAA	GCT	GAA	GCT	GAA	GCT	GAA	CCA	AAG			
		K	R													
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17
Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr	Leu
TTT	GTT	AAC	CAA	CAT	TTG	TGT	GGT	TCT	CAT	TTG	GTT	GAA	GCT	TTG	TAC	TTG
B18	B19	B20	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	C1	C2	C3		
Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala	Ala	Lys		
GTT	TGT	GGT	GAA	AGA	GGT	TTC	TTC	TAC	ACT	CCA	AAG	GCT	GCT	AAG		
												A	A	K		
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17
Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu	Glu
GGT	ATT	GTT	GAA	CAA	TGT	TGT	ACT	TCT	ATT	TGT	TCT	TTG	TAC	CAA	TTG	GAA
A18	A19	A20	A21	End												
Asn	Tyr	Cys	Asn	TAA	GCGGCCGC											
AAC	TAC	TGT	AAC	TAA	NotI											

Figura 6. Desenho do gene da proinsulina com códons preferenciais para *P. pastoris*.

3.2.2 Subclonagem da proinsulina no vetor de expressão/secreção pPGK

Para a subclonagem da proinsulina no vetor de expressão e secreção, os plasmídeos pPGK Δ 3Amy e pGS3INS_A1 foram utilizados para transformação em hospedeira DH5 α . Transformou-se por eletroporação com 1 μ L, cerca de 50 ng/ μ L e os transformantes foram selecionados em meio contendo ampicilina (100 μ g/mg). Clones transformantes foram utilizados para extração de plasmídeo pelo método de lise alcalina/Kit GFX Conjunto de reagentes p/ extração de DNA plasmidial (GE Healthcare). Em seguida para a liberação do gene sintético da proinsulina do plasmídeo pGS3INS_A1 e do gene da amilase do plasmídeo pPGK Δ 3Amy (para substituir o gene de amilase pelo gene sintético da proinsulina). Utilizou-se cerca de 2 Unidades de cada uma das enzimas de restrição *Xho*I e *Not*I e cerca de 200 ng de cada plasmídeo. O perfil de restrição foi verificado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 3.1.9).

3.2.2.1 Ligação dos fragmentos gênicos e transformações em *E. coli* (Dh5 α)

O fragmento gênico da proinsulina digeridos com enzimas de restrição *Xho*I e *Not*I foram purificados utilizando-se o Kit GFX Gel band purification (GE Healthcare) e utilizados para a reação de ligação mediada pela ação da enzima T4-DNA ligase e incubada durante 16 horas a 16°C. O sistema de ligação foi elaborado de modo que a razão molar entre vetor (pPGK Δ 3Amy) e inserto (gene sintético da proinsulina) ficasse entre 1:3 e 1:10. Células *E. coli* Dh5 α eletrocompetentes foram transformadas com o sistema de ligação. As células transformadas foram inoculadas em meio LB sólido, onde os clones recombinantes foram selecionados pela sua resistência ao antibiótico ampicilina (100 μ g/mL). Os clones recombinantes de *E. coli* escolhidos foram inoculados em meio LB contendo ampicilina (100 μ g) para extração plasmidial.

3.2.2.2 Confirmação da sub-clonagem por análise de restrição

Para confirmação da subclonagem realizou-se uma análise de restrição dos clones recombinantes com as enzimas de restrição *Xho*I e *Not*I. A concentração final dos componentes do sistema de digestão: DNA plasmidial 300 ng/ μ L (cerca de 1 μ g concentração final), tampão (1X), BSA (10mg/ μ L), enzimas *Xho*I e *Not*I ambas na concentração de 20U/ μ L. O sistema de digestão foi incubado por 3 horas a 37 °C e

analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo (1 µg/mL). O plasmídeo recombinante contendo as sequencias codificadoras da proinsulina A1 foi denominado de pPGKA1.

3.2.2.3 Transformação genética de *P. pastoris* com o plasmídeo recombinante pPGKA1 e seleção dos clones transformantes

Para transformação de *P. pastoris* com o plasmídeo recombinante pPGKA1 foi utilizado cerca de 10 µg de DNA e submetidas a pulso elétrico de 1500 V em eletroporador (Eppendorf). Para favorecer a integração no genoma da levedura o plasmídeo foi previamente linearizado com *Sac* I (sítio único). A integração no genoma da hospedeira ocorre por recombinação homóloga, devido ao vetor de expressão estar linearizado. Os clones transformantes de *P. pastoris* que apresentaram habilidade de crescimento em meio com zeocina 100µg/mL foram utilizados para verificar sua capacidade de expressar e secretar proinsulina recombinante. Protocolos de preparação de células e eletroporação está descrita em protocolos gerais item 3.3.

3.2.2.4 Confirmação da transformação por sequenciamento do produto de PCR

Para confirmação da subclonagem foi realizada a PCR direto da colônia dos transformantes de *P. pastoris* e posterior sequenciamento. Utilizou-se primers específicos para amplificar o gene da proinsulina por PCR e reação de sequenciamento A1F0(CTCGAGAAGAGAGAAGAAGCT) e A1R1(CGTGCGGCCGCTTAGTTAC).

3.2.3 Seleção dos clones recombinantes melhores produtores de proinsulina (A1)

3.2.3.1 Seleção pelo aumento na concentração de zeocina

Os clones transformantes de *P. pastoris* foram transferidos para o meio YPD com zeocina. Os transformantes foram inoculados em placa com diferentes concentrações de zeocina (100, 500, 1000 e 2000 microgramas) para estimar o número de cópias integradas em clones transformantes contendo vetores com o gene *Sh ble*.

3.2.3.1 Seleção por *dot-blotting*

Para determinação dos fenótipos dos clones recombinantes hábeis na expressão do gene de interesse, foi utilizada a técnica de *dot-blotting* que pode ser usada como método qualitativo para se identificar em um grande número de amostras a presença da proinsulina A1. Os clones transformantes de *P. pastoris* foram transferidos para o meio

YPD e em seguida realizado *dot-blotting* de colônias. Resumidamente, a detecção de clones recombinantes com capacidade de expressão de proteína recombinante foi realizada utilizando anticorpo primário (IgG de camundongo) anti-insulina (1:2000) e anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo) conjugado com peroxidase (1:2000).

3.2.4 Análise do crescimento do clone de *P. pastoris* (A140) e produção de proinsulina A1

3.2.4.1 Análise da expressão/secreção da proinsulina A1

Os clones recombinantes, com maior resistência a zeocina e fortes sinais no experimento de dot-blotting foram selecionados para a análise da expressão/secreção da proinsulina A1 em meio líquido, esses clones foram denominados de A1 - 14, A1 - 20 e A1 - 40. Os experimentos foram realizados com cultivos simultâneos em frascos agitados em meio YPD. Os ensaios de ELISA foram realizados para quantificação da produção da proinsulina utilizando anticorpo primário (IgG de camundongo) anti-insulina na diluição 1:5000, anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo) conjugado com peroxidase na diluição 1:5000.

3.2.4.2 Determinação de curva de crescimento

Para a análise da curva de crescimento utilizou-se o clone A140 de *P. pastoris* transformado com o plasmídeo recombinante pPGKA1, (este clone foi selecionado pois destacou-se na produção de proinsulina). Como controle positivo foi utilizado o vetor com o gene da α -amilase de *Bacillus licheniformes* (pPGK Δ 3Amy) e um controle negativo *P. pastoris* não transformada geneticamente. A medida das densidades celulares foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda 600 nm, em intervalos de 24h. A cada 24 horas adicionou-se glicose a 2%.

3.2.5 Purificação e análise eletroforética da proinsulina A1

O crescimento do clone recombinante A140 foi analisado quanto a produção de biomassa, consumo de glicose e produção de insulina no meio YPD. O consumo de glicose durante os experimentos foi monitorado por análise enzimática (Kit Enzimático, Laborlab e HPLC). Adicionava-se 1,0 mL do reagente de trabalho (como descrito no protocolo do fabricante) em um microtubo tipo Eppendorf com 10 μ L da amostra convenientemente diluída, contendo glicose. Incubava-se o microtubo por 10 minutos a 37°C. Após a reação, a leitura da absorbância era realizada a 505 nm.

Para análise da expressão, um volume de 1 mL foi coletado (a cada 12 horas) e precipitado na presença de TCA 10% e acetona (protocolos gerais item 3.3), seguido de eletroforese em SDS-PAGE. Para a visualização os géis foram corados com azul de Comassie (protocolos gerais item 3.3), ou com nitrato de prata (protocolos gerais item 3.3). As amostras do sobrenadante de cultura concentradas foram aplicadas em uma coluna (1,0 cm x 30 cm) de Superdex 75 equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl a 18 °C. Frações de 1,5 ml foram coletadas obedecendo o fluxo de 1 mL/min usando um sistema cromatográfico ÄKTApurifier10 (Ge healthcare). O perfil de eluição foi determinado monitorando-se a absorbância das frações a 280 nm.

Para a realização de *Western Blotting*, proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando Trans-blot® Semi Dry (Bio Rad). A detecção foi realizada como descrita em protocolos gerais item 3.3.

3.2.6 Otimização da produção da insulina em *P. pastoris* em frasco agitados

3.2.6.1 Seleção dos meios de cultivo (YPD e YNB)

Para a seleção dos meios de cultivo o clone pPGKA140 foi utilizado para crescimento em frascos com suplementação de glicose 2% a cada 24 horas (detectado por *kit* de detecção de glicose). Amostras foram separadas em sobrenadante e sedimento celular para se determinar a densidade celular, a biomassa e a proteína. O sobrenadante foi filtrado por uma membrana com retenção de 0,22 µM, concentrado por filtração em membrana Millipore de corte 3kDa. O sistema foi mantido a 4 °C durante o processo de filtração. O perfil eletroforético das proteínas foi analisado por eletroforese em gel SDS-PAGE e ELISA.

3.2.6.2 Medida massa seca e densidade ótica

As células da levedura recombinante *P. pastoris* foram crescidas em meio YPD e o seu crescimento quantificado por espectrofotômetro a 600 nm utilizando-se faixa de absorbância de 0,050-0,50. Amostras foram coletadas em 12, 24, 48, 72 e 96 horas de cultura para determinação da biomassa. A medida da biomassa foi realizada com 2 mL da cultura. Após centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi separado e o sedimento celular secou em estufa a 60 °C, por aproximadamente 24 horas. O microtubo foi pesado vazio e com a biomassa seca e os valores utilizados para calcular biomassa total. A concentração de células em g/L foi calculada a partir da massa seca das células obtidas em cada tempo de fermentação.

3.2.6.4 planejamento estatístico experimental das condições de cultivo de *P. pastoris*

O objetivo desta fase do trabalho foi promover a produção da proinsulina com a aplicação de planejamento fatorial para calcular os efeitos principais e dar indicações das variáveis que devem ser incluídas no planejamento seguinte e as novas faixas que devem ser estudadas para cada variável cuja influência é significativa para a produção de insulina. As variáveis estudadas na síntese de proinsulina foram: dextrose, peptona, extrato de levedura, pH, temperatura e concentração de inóculo.

No primeiro experimento foi utilizado um planejamento fatorial fracionado com dois níveis e mais um central (Tabela 3 e 4). Os resultados obtidos neste primeiro planejamento foram avaliados pela estimativa dos efeitos, a fim de detectar quais variáveis foram significativas para a resposta. Devido a grande variabilidade inerente aos bioprocessos que envolvem enzimas e microrganismos, foram considerados significativos os parâmetros com p-valor menor que 10% ($p < 0,1$).

Delineamento desse tipo tem grande utilidade nos experimentos que antecedem ao experimento final, como no caso de seleção de fatores e de seus níveis (*screening design*) e são exaustivamente utilizados no desenvolvimento e otimização de processos e produtos.

Ressalta-se aqui, o fato de que tais delineamentos tem importância vital nos experimentos tipos *screening*, realizados sequencialmente até que estejam bem claras as condições ideais para que o delineamento final seja realizado. No entanto, o delineamento final deve ser realizado com base em um delineamento completo. Neste caso, o delineamento composto central rotacional (DCCR).

A produção da proteína recombinante produzida por *P. pastoris* iniciou-se por um planejamento fracionado para cálculo dos efeitos principais com seis variáveis (tabela 3 e 4). Em seguida continuou-se com 4 variáveis no delineamento composto central rotacional (DCCR) e as novas faixas foram estabelecidas para cada variável (tabelas 5 e 6) e no terceiro experimento realizou o DCCR com apenas três variáveis (tabela 7 e 8).

Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers com capacidade de 250 mL com 50 mL de meio YPD. A variável resposta foi a produção de insulina para os planejamentos 1, 2 e 3 em 24, 48 e 72 horas de crescimento.

3.2.6.4.1 Experimento 01 - planejamento fracionado (2^{6-1}) com 36 ensaios

No experimento 01 (planejamento fracionado) foram utilizados seis fatores (Tabela 3) totalizando 36 ensaios para o clone A140, vide a matriz na tabela 4.

Tabela 2. As variáveis e seus respectivos níveis do experimento 1

Variáveis		Níveis		
		(-1)	0	(+1)
Dextrose (%)	x1	1,0	2,0	3,0
Peptona (%)	x2	0,5	1,0	2,5
Ext de levedura	x3	0,5	1,25	2,0
pH	x4	3,5	5,5	7,5
Temperatura (°C)	x5	25	30	35
Inóculo mg/mL	x6	1,5	3,0	4,5

Tabela 3. Matriz do experimento 1 planejamento fracionado (2^{6-1})

Ensaio	Dextrose x1	Peptona x2	Ext. Lev X3	pH x4	Temp X5	Inoculo X6
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	-1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1
8	+1	+1	+1	-1	-1	1
9	-1	-1	-1	+1	-1	1
10	+1	-1	-1	+1	-1	-1
11	-1	+1	-1	+1	-1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1	-1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1	1
15	-1	+1	+1	+1	-1	1
16	+1	+1	+1	+1	-1	-1
17	-1	-1	-1	-1	+1	1
18	+1	-1	-1	-1	+1	-1
19	-1	+1	-1	-1	+1	-1
20	+1	+1	-1	-1	+1	+1
21	-1	-1	+1	-1	+1	-1
22	+1	-1	+1	-1	+1	+1
23	-1	+1	+1	-1	+1	+1
24	+1	+1	+1	-1	+1	-1
25	-1	-1	-1	+1	+1	-1
26	+1	-1	-1	+1	+1	+1
27	-1	+1	-1	+1	+1	+1
28	+1	+1	-1	+1	+1	-1
29	-1	-1	+1	+1	+1	+1
30	+1	-1	+1	+1	+1	-1
31	-1	+1	+1	+1	+1	-1
32	+1	+1	+1	+1	+1	+1
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0

3.2.6.4.2 Experimento 2 - planejamento experimental (2^4) com 30 ensaios.

No experimento 02 foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR). Neste foram selecionados quatro fatores e analisados. A tabela 5 mostra as variáveis selecionadas e matriz com 30 ensaios na tabela 6.

Tabela 4. Variáveis de entrada e seus respectivos níveis do experimento 2

Variáveis		Níveis				
		-2,00	(-1)	0	(+1)	-2,00
Dextrose (%)	x1	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
Peptona (%)	x2	1,75	2,5	3,0	4,25	5,0
pH	x3	3,0	4,5	6,0	7,5	9,0
Temperatura (°C)	x4	17,5	22,5	20	25	27,5

Tabela 5. Matriz do experimento 2 planejamento experimental (2^4+8 axiais+ 6PC) total 30 ensaios.

Ordem padrão	Ordem da corrida	Dextrose	Peptona	pH	T°C
1	4	-1	-1	-1	-1
2	15	1	-1	-1	-1
3	11	-1	1	-1	-1
4	30	1	1	-1	-1
5	10	-1	-1	1	-1
6	3	1	-1	1	-1
7	9	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1	-1
9	26	-1	-1	-1	1
10	28	1	-1	-1	1
11	22	-1	1	-1	1
12	7	1	1	-1	1
13	18	-1	-1	1	1
14	23	1	-1	1	1
15	20	-1	1	1	1
16	25	1	1	1	1
17	29	-2	0	0	0
18	19	2	0	0	0
19	27	0	-2	0	0
20	2	0	2	0	0
21	17	0	0	-2	0
22	16	0	0	2	0
23	6	0	0	0	-2
24	24	0	0	0	2
25	13	0	0	0	0
26	12	0	0	0	0
27	21	0	0	0	0
28	14	0	0	0	0
29	5	0	0	0	0
30	8	0	0	0	0

3.2.6.4.3 Experimento 3 - planejamento experimental (2³) total 20 ensaios.

No experimento 03 foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) e foram analisados três fatores; os níveis estão na tabela 7 e matriz tabela 08 com 20 ensaios.

Tabela 6. Variáveis de entrada e seus respectivos níveis do experimento 3

Variáveis		Níveis				
		-1,68	(-1)	0	(+1)	+1,68
Dextrose (%)	x1	3,3	5,0	7,5	10,0	11,7
Peptona (%)	x2	0,15	0,5	1,0	1,5	1,84
pH	x3	3,63	5,0	7,0	9,0	10,36

Tabela 7. Matriz do experimento 3 - planejamento (2³) 8 axiais+ 6PC) total 20 ensaios.

Ordem padrão	Ordem da corrida	Dextrose %	Peptona %	pH
1	12	-1	-1	-1
2	8	1	-1	-1
3	20	-1	1	-1
4	6	1	1	-1
5	19	-1	-1	1
6	3	1	-1	1
7	2	-1	1	1
8	16	1	0	1
9	11	-1,68	0	0
10	4	1,68	0	0
11	15	0	-1,68	0
12	14	0	1,68	0
13	5	0	1	-1,68
14	13	0	1	1,68
15	10	0	0	0
16	17	0	0	0
17	1	0	0	0
18	7	0	0	0
19	9	0	0	0
20	18	0	0	0

3.2.7 Análise quantitativa do RNA mensageiro (mRNA)

A qPCR representa um significativo avanço biotecnológico para quantificação de ácidos nucléicos (absoluta e relativa), detecção e identificação de produtos específicos de PCR e detecção de variações genéticas (HIGUCHI, et al., 1992). A PCR quantitativa em tempo real consiste numa reação de PCR cuja detecção dos amplicons é simultânea à amplificação, não necessitando de etapas posteriores como eletroforese em gel de agarose, detecção radioativa, ELISA ou Blotting.

Kubista et al. (2006) relataram o uso PCR quantitativa em tempo real na detecção de patógenos, análise de expressão gênica, polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP), análises de aberrações cromossômicas. Este sistema está embasado na detecção e quantificação de um repórter fluorescente, enquanto ocorre a amplificação. Para tal procedimento utilizam-se oligonucleotídeos e fluoróforos intercalantes na cadeia do DNA, na reação de tempo real com sistema SYBR Green® os fluoróforos presentes no SYBR Green® ligam-se em toda a dupla fita de DNA formada, emitindo fluorescência durante a desnaturação da dupla fita a fluorescência é drasticamente reduzida durante a extensão das novas fitas, no processo de polimerização da DNA polimerase, os fluoróforos se ligam às duplas fitas em formação, resultando na emissão de fluorescência (Figura 06). O dobro da quantidade do produto é acumulado a cada ciclo, assumindo 100% de eficiência da reação.

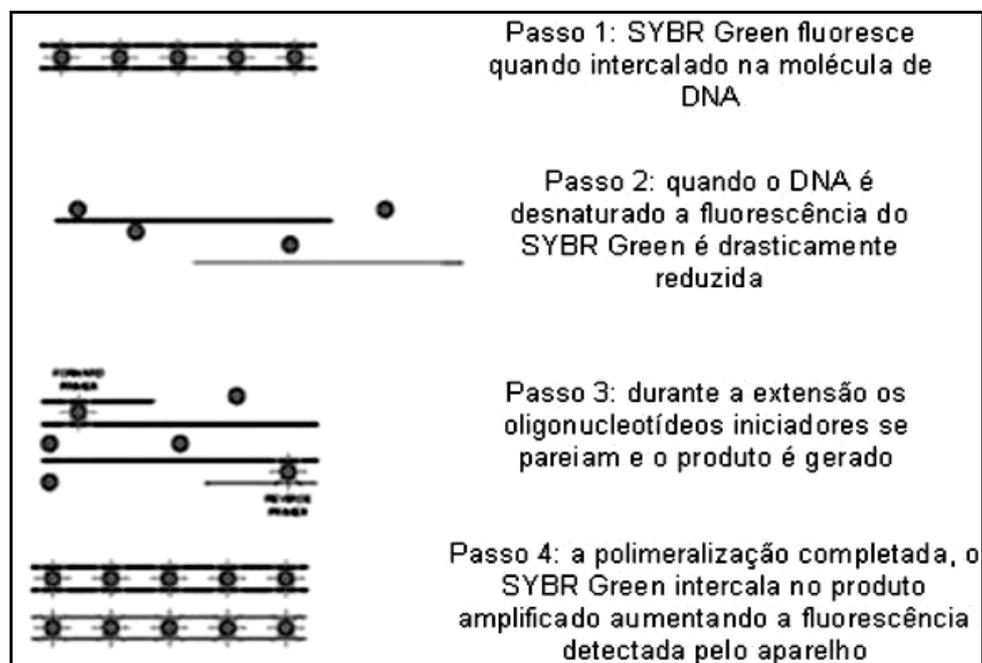


Figura 7. Esquema ilustrativo de PCR em tempo real com o sistema SYBR Green.

Fonte: Kubista (2006)

3.2.7.1 Quantificação dos resultados da qPCR

Após a detecção e amplificação do DNA é necessário quantificá-lo. A quantificação do DNA pode ser realizada de forma absoluta pelo método da curva padrão. Na quantificação absoluta determina-se o número exato de moléculas (número de cópias de DNA ou nanogramas de DNA). Trata-se de um método de determinação da concentração inicial de uma dada amostra de concentração desconhecida a partir de uma curva padrão (figura 07). Para o estabelecimento de uma curva padrão é necessário preparar padrões absolutos de quantidades conhecidas do gene alvo, diluídos em série. O DNA plasmidial é comumente utilizado como padrão e deve ser diluído em concentrações padrões semelhantes ao alvo nas amostras biológicas. É por meio destas quantidades conhecidas de DNA, que o software efetua a quantificação de DNA alvo nas amostras em teste (APPLIED BIOSYSTEMS, 2007).

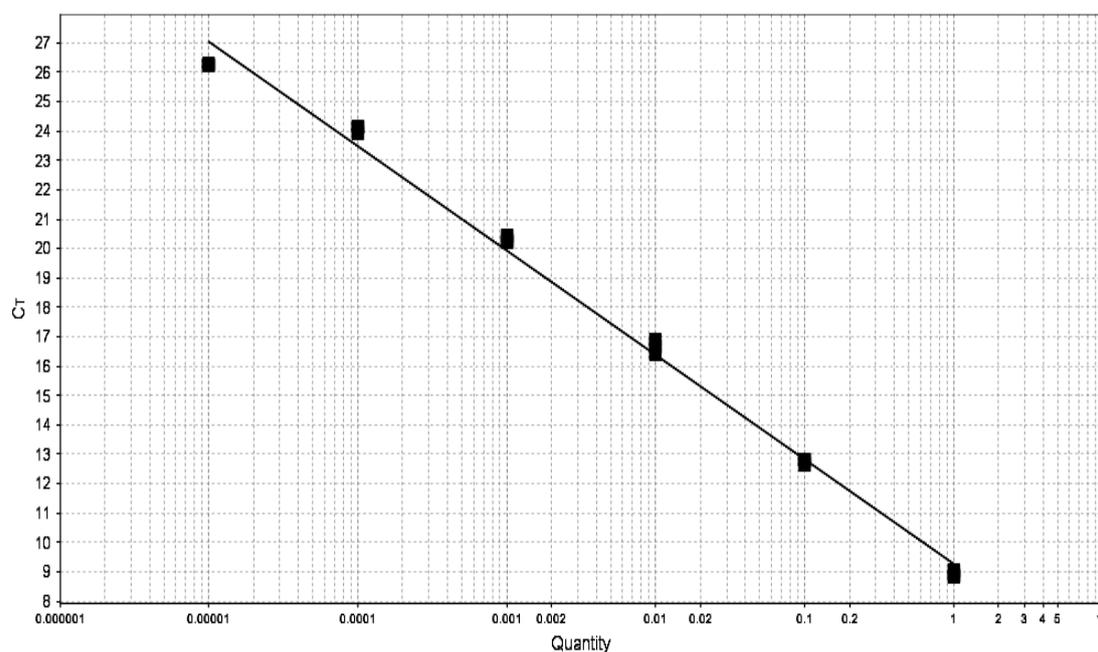


Figura 8. Representação gráfica da curva padrão na interface do software ABI PRISMA STEPONEPLUS. Mostrando a curva-padrão do ensaio de quantificação absoluta, os pontos vermelhos representam os Cts gerados pelo número de cópias de cada concentração de DNA padrão.

Fonte: Applied Biosystems (2007)

3.2.8 Quantificação do RNA mensageiro de proinsulina por PCR em Tempo Real

Para a extração do RNA total foi realizada utilizando em média, 30 mg da biomassa do clone A140 de duas condições diferentes de composição nutricional (de menor e maior produção de proinsulina). As condições após o melhoramento com maior produção de proinsulina (concentração de peptona de 0,15 %, extrato de levedura de 10 g/L, pH 7,0 e temperatura de 25 °C) e a condição onde houve menor produção (concentração de peptona de 1,5 %, extrato de levedura de 10 g/L, pH 5,0 e temperatura de 25 °C) de proinsulina. O RNA foi extraído utilizando Trizol (descrita em protocolos gerais item 3.3). Após as extrações de RNA total foram verificadas as concentrações (ng/ μ L) através da leitura em NanoDrop 1000 Spectrophotometer e as relações que determinam a pureza das amostras obtidas. As amostras de RNA foram armazenadas a -70C para uso posterior na realização da transcrição reversa.

Para a transcrição reversa do RNA mensageiro em cDNA e PCR em Tempo Real os primers utilizados foram os mesmos utilizados no sequenciamento da insulina A1_F0-(CTCGAGAAGAGAGAAGAAGCT); 1_R1(CGTGCGGCCGCTTAGTTAC) e A1_R_2 (CAGTAGTTTTCCAATTGGTACAA). As quantificações dos cDNAs foram realizadas em equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer.

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com o Kit SuperScript III First-Strand™ cDNA Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) (descrito em protocolos gerais item 3.3).

A quantificação do número de cópias do RNA mensageiro da proinsulina no clone A140 foi realizada em equipamento StepOnePlus® (Applied Biosystems® - Life Technologies), utilizando o sistema TaqMan para detecção do produto de amplificação.

3.2.8.1 Determinação da curva padrão de DNA para uso no PCR em Tempo Real

O plasmídeo pPGKA1 foi linearizado por meio de digestão com enzima de restrição *Sac* I com sítio único na região do “polylinker”. O produto da reação foi purificado e verificou-se a presença de uma única banda do tamanho esperado por eletroforese em gel de agarose. O plasmídeo pPGKA1 linearizado foi quantificado em fluorímetro Qubit® (Life Technologies). A concentração encontrada foi utilizada no cálculo de moléculas/ μ L conforme a fórmula descrita: $X \text{ g}/\mu\text{L DNA} / [n^\circ \text{ pares de base do plasmídeo} \times 649] \times 6,022 \times 10^{23} = Y \text{ moléculas}/\mu\text{L}$. PM médio de 1 pb de DNA = 649 g/mol; 1 mol = $6,02 \times 10^{23}$ moléculas. Realizou-se as diluições seriadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} (tabela 7).

A curva padrão necessária para referenciar as quantidades das amostras testadas foi construída com o plasmídeo pPGKA1, cuja concentração de estoque ($2\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foi determinada por fluorimetria (QUBIT 2.0 FLUORIMETRO INVITROGEN by Thermo).

Em cada experimento de RT-qPCR, foram utilizados controles negativos e positivos distribuídos da seguinte forma, controles negativos: três controles negativos da reação de RT-qPCR com todos os reagentes sem alvo (*non template control* – NTC), e controles positivos: As diluições seriadas a partir da concentração inicial de $1\text{ng}/\mu\text{L}$ foram utilizadas para construir a curva padrão 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e todas as amostras foram feitas em triplicata.

Tabela 8. A concentração em nanogramas do plasmídeo recombinante com o equivalente número de cópias de plasmídeo pPGKA1.

Nanograma	Cópias	Cópias
1	300.000.000	$3,0 \times 10^8$
10^{-1}	30.000.000	$3,0 \times 10^7$
10^{-2}	3.000000	$3,0 \times 10^6$
10^{-3}	300.000	$3,0 \times 10^5$
10^{-4}	30.000	$3,0 \times 10^4$
10^{-5}	3.000	$3,0 \times 10^3$
10^{-6}	300	$3,0 \times 10^2$
10^{-7}	30	$3,0 \times 10^1$

3.2.9 Determinação de biomassa

Para a determinação da biomassa do clone recombinante de *P. pastoris* A140 em duas condições contrastantes de cultivo: de menor e maior produção de proinsulina e tempos diferentes (8, 10 e 12 horas). As células do clone recombinante A140 de *P. pastoris* foram crescidas em meio YPD e o seu crescimento quantificado por espectrofotômetro a 600 nm utilizando-se faixa de absorvância de 0,050-0,50. Amostras foram coletadas em 8, 10 e 12 horas de cultura para medição da biomassa. Os valores utilizados para calcular biomassa total. A concentração de células em g/L foi calculada a partir da massa seca das células obtidas em cada tempo de fermentação.

3.2.10 Análise estatística

Para promover a produção da proinsulina utilizou-se experimentos delineados em esquemas fatoriais (envolvem combinação entre os níveis e os fatores).

Neste trabalho como iniciamos com planejamento fracionado envolvendo 6 fatores obtivemos as variáveis que foram incluídas ou retiradas dos experimentos seguintes, os três experimentos (planejamento experimental fracionado 2^6 com seis fatores; planejamento experimental completo 2^4 com quatro fatores; planejamento experimental completo 2^3 com três fatores) a variável resposta foi produção de proinsulina.

O programa MINITAB® 16 foi utilizado para elaborar as matrizes apresentadas nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 e os níveis dos experimentos 1, 2 e 3.

Para a análise do planejamento 1 utilizou-se a linguagem de programação R e gerou as tabelas de ANOVA com os efeitos dos fatores e suas interações. As análises dos planejamentos 2 e 3 geraram as tabelas de ANOVA com os efeitos dos fatores e suas interações e também geraram os gráficos de superfície de resposta. O desenho experimental foi baseado na metodologia de superfície de resposta, com o modelo de composição central (BOX & WILSON, 1951).

A partir do melhoramento foram selecionadas duas condição (com maior e menor produção de proinsulina) para determinar o número de cópias do mensageiro por PCR em Tempo Real e a produção de biomassa em três tempos diferentes (8, 10 e 12 horas), o resultado foi submetido a análise de variância com os testes F, teste-t R2 e R2 ajustado.

Para as análises de crescimento celular e número de cópias foi considerado o nível de significância de 0,01 e a partir destes resultados foram gerados o gráfico boxplot.

As análises foram realizadas utilizando a linguagem de programação R (R Core Team, 2015).

3.3 Protocolos gerais

3.3.1 Preparo de hospedeiras *E. coli* quimiocompetentes (COHEN, 1972)

As células de *E. coli* DH5 α foram crescidas em 5 mL de meio LB e incubadas a 37 °C durante a noite sob agitação a 200 rpm. Em seguida 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 30 mL de meio LB e essa cultura incubada a 37 °C sob agitação (200 rpm) até atingir uma OD₆₀₀ de 0,5. As células foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos a 4 °C e homogeneizadas gentilmente em 10 mL de CaCl₂ 100 mM e glicerol 10% estéril e gelado. Em seguida as células foram submetidas a uma nova centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e o sedimento celular gentilmente homogeneizado em 1 mL de CaCl₂ 100 mM com glicerol 10%. As células foram aliquotadas em microtubos Eppendorff (50 μ L/tubo) e armazenadas -80 °C.

3.3.2 Transformação de *Escherichia coli* por choque térmico (COHEN, 1972)

As células quimiocompetentes foram retiradas do freezer a -80 °C e deixadas no gelo até degelar (20-30min). Em seguida, foi adicionado o plasmídeo pGS3INS-A1 juntamente com as células e as mesmas foram novamente incubadas no gelo por 30 minutos. Após este período, as células foram submetidas a um choque térmico a 37 °C, por 5 minutos e, o sistema foi incubado no gelo por 10 minutos. Foram adicionados 200 μ L de meio LB caldo ao sistema que foi incubado a 37 °C por 1 hora. O plaqueamento foi feito em três placas contendo LB-ágar e o antibiótico ampicilina 100 μ g/mL. As placas foram invertidas e incubadas a 37 °C por 16 horas.

3.3.3 Extração de DNA plasmidial (BIRNBOIM & DOLY, 1979)

Um volume de 3,0 mL de cultura bacteriana foi transferido para microtubos de centrífuga e centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm e ao sedimento "pellet" celular adicionou-se a solução de lavagem (solução I) e em seguida adicionou-se a solução de lise (solução II) (SDS dodecil sulfato de sódio e NaOH). As bactérias foram lisadas por lise alcalina com tratamento com SDS e NaOH e as proteínas desnaturadas juntamente com o DNA cromossômico. A mistura foi neutralizada com acetato de potássio (solução III) nessa etapa a maioria do DNA cromossômico, proteínas bacterianas, bem como o SDS precipitam e são removidas por centrifugação 12.000 g/10 minutos a 4 °C. Para a análise eletroforética utilizou-se 5 μ L do DNA plasmidial.

3.3.4 Eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK et al., 2001)

As análises eletroforéticas em gel de agarose seguiram as especificações do fabricante (Loccus Biotecnologia) com a corrente e tensão adequadas (1-5 v/cm) de acordo com o tamanho do gel e da cuba. A agarose foi preparada na concentração de 0,8 % (p/v) (de acordo com fragmentos de DNA analisados). Tampão de corrida TBE 5X diluído na amostra para concentração de 1x e brometo de etídeo (agente químico que intercala na molécula de DNA e permite fluorescência quando excitado com luz ultravioleta) para concentração final de 0,5µg/mL. O tampão de amostra 5X foi diluído para a concentração final de 1X nas amostras de DNA a serem analisadas. As amostras e os marcadores moleculares foram aplicados no gel e submetidos à eletroforese. Para visualização da amostra de DNA o gel foi exposto à luz ultravioleta. A composição de tampões utilizados encontra-se em detalhes no item 3.1.8 de soluções.

3.3.5 Preparo de hospedeiras *E. coli* eletrocompetentes

O processo de preparação da hospedeira consistiu em repicagem em placa de meio sólido (meio LB ágar). Incubou-se a temperatura de 37°C por 16 horas para obtenção das colônias isoladas. Retirou-se com um palito estéril 1 colônia isolada, e colocou-se bactéria para crescer em 5mL de meio LB e as amostras foram incubadas a 37°C a 180 rpm por 16 horas. Transferiu-se 0,5 mL para o frasco do tipo Erlenmeyer contendo 200-250 mL de meio LB sem antibiótico. O crescimento da cultura bacteriana foi acompanhado até atingir uma OD₆₀₀ = 0,7. Em seguida as células foram coletadas por centrifugação em tubos tipo Falcon de 50 mL e as centrifugações foram realizadas a 4°C e 4000 rpm. As lavagens das células sedimentadas foram realizadas com glicerol 10 % gelado por 10 minutos para cada lavagem. Repetiu-se o processo por 3X e ao final juntou-se os sedimentos "*pellets*" celulares em um único tubo tipo Falcon e realizou-se mais 3 lavagens com glicerol 10% gelado. Homogeneizou-se em 1 mL de glicerol 10% gelado e foram feitas alíquotas de 50µL em microtubos de 1,5mL. As células eletrocompetentes foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer a -80°C.

3.3.6 Transformação genética de *E. coli* por eletroporação (CHASSY & FLICKINGER, 1987)

As células eletrocompetentes foram retiradas do freezer a -80°C e degeladas em gelo a 4°C por 15 minutos. Uma alíquota de $50\ \mu\text{L}$ de células eletrocompetentes foi utilizada para a transformação. O conjunto (plasmídeo e células hospedeiras) foi mantido no gelo por 5 minutos e em seguida transferidos para uma cubeta e submetidas a eletroporação em eletroporador, (modelo *Electroporator 2510-Eppendorf*) e cubetas de 1 mm (*Eppendorf*), sob as condições padronizadas (pulso de 1900v). As células recém eletroporadas adicionou-se $250\ \mu\text{L}$ de meio LB caldo e incubou-se a 37°C por 1 hora. O sistema foi semeado em placa de *Petri* por espalhamento com alça de *Drigalsky* em meio LB-Agar, $200\ \mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. As placas foram invertidas e incubadas a 37°C por 18 h.

3.3.7 Extração de DNA plasmidial (maxi-prep)

Uma colônia isolada de *E. coli* transformada com o plasmídeo de interesse foi inoculada em meio LB contendo $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina, e incubada a 37°C durante aproximadamente 16 horas sob agitação. Uma alíquota desses pré-inóculos foi re-inoculada em 100mL de LB contendo $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina e incubada durante 14-16 horas sob agitação a 37°C . A partir dessas culturas, o DNA plasmidial foi obtido em larga escala utilizando o kit Xtra Maxi- NucleoBond[®] Plasmid Midi (macherey nagel), segundo instruções do mesmo. A quantificação do plasmídeo foi realizada em espectrofotômetro a 260nm .

3.3.8 Análises de restrição

As análises com as enzimas de restrições foram realizadas conforme instruções dos fabricantes. O tempo de incubação, os tampões, as temperaturas de reação, as concentrações de DNA e enzima variaram de acordo com o material digerido e a especificação da enzima. Foi utilizado cerca de 10 U de enzima para cada $0,5\ \mu\text{g}$ de DNA, incubados a 37°C por 3 h. Cerca de $15\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de plasmídeo recombinante pPGKA1 foi linearizado com *SacI* para posterior transformação de *P. pastoris*.

3.3.9 Preparo de *Pichia pastoris* eletrocompetentes

Células da levedura *P. pastoris* GS115 foram crescidas em meio YPD ágar até o aparecimento de colônias isoladas. Foi realizado um pré-inóculo com $10\ \text{mL}$ de YPD

em Erlenmeyer de 250 mL utilizando uma colônia isolada da levedura seguido de incubação a 30 °C por 16 horas. Após o tempo de incubação foi medido a O.D.₆₀₀ do pré-inóculo e calculado o volume a ser utilizado para o inóculo levando em consideração o tempo de geração de 2 horas. Utiliza-se o volume de células calculado para atingir a O.D.₆₀₀ de 1,3 no horário programado. Quando a cultura atingiu a densidade de 1,3 fez-se uma incubação no gelo por 15 minutos para cessar o crescimento. As células foram centrifugadas a 1500 \times g por 5 min a 4 °C. O sedimento foi homogeneizado em 200 mL de água gelada. Foi realizada outra centrifugação nas mesmas condições anteriores e o sedimento ressuspensionado em 100 mL de água estéril gelada por 2 vezes. Após mais uma centrifugação nas mesmas condições as células foram ressuspensionadas em 10 mL de sorbitol 1 M gelado. A suspensão foi centrifugada novamente e as células ressuspensionadas em 500 μ L de sorbitol 1M gelado. Foram aliqüotadas 80 μ L de células por microtubo de 1,5 mL e mantidas no gelo até o momento em que foram utilizadas.

3.3.10 Eletroporação da hospedeira *P. pastoris* GS115

Para a transformação da levedura o plasmídeo recombinante (10 μ g) e a hospedeira (80 μ L) foram misturados e o sistema foi transferido para cubetas de 0,2 cm e submetidas a eletroporação em eletroporador (modelo *Electroporator 2510-Eppendorf*) sob as condições padronizadas (pulso de 1500v). Imediatamente após o choque foi adicionado 1 mL de sorbitol gelado na cubeta e o conteúdo transferido para microtubo estéril de 1,5 mL. Foram incubadas por 30°C sem agitação por 1 hora, em seguida foi adicionado 1 mL de YPD incubando-se a 30 °C sob agitação de 200 rpm por uma hora. Foram espalhados utilizando alça de *Drigalsky* 50 a 200 μ L do sistema de transformação em placa com meio de cultivo YPD e 100 μ g/mL de antibiótico zeocina. As placas foram incubadas por 96 horas ou até o aparecimento das colônias (cerca de 72 horas).

3.3.11 sequenciamento do produto de PCR

A reação de PCR de colônia foi realizada nas seguintes condições: 1,5U de Taq DNA polimerase, tampão da Taq DNA polimerase 1X, MgCl₂ 1,25 mM, 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador específico (tabela 02), dNTPs 0,2 mM e 2,5 µL da sobrenadante de colônia submetida a uma lise em tampão TTE e temperatura 95°C e 10 minutos seguidos de centrifugação. As reações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems), utilizando as seguintes condições: 95 °C por 2 minutos; 25x (95 °C por 1 minuto, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto), 72 °C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram tratados com as enzimas Exonuclease I (3,3 U - USB®) e SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase – USB, 0,66 U - GE Healthcare) a fim de eliminar os oligonucleotídeos iniciadores e dNTPs presentes na mistura da reação. Os tubos contendo as misturas foram incubados a 37 °C por 45 minutos, seguidos da inativação enzimática por 15 minutos a 80 °C. Os produtos purificados foram utilizados para a reação de sequenciamento. A reação de sequenciamento foi realizada segundo o método de término de cadeia de Sanger modificado (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977), empregando dideoxinucleotídeos marcados com fluoróforos. As reações foram realizadas em volume final de 10 µL contendo 3,2 pmol de oligonucleotídeo iniciador, aproximadamente 100 ng do produto da PCR purificados e 4 µL do reagente *DYEnamic ET Sequence Premix Terminator (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, Amersham Biosciences). O programa utilizado foi o seguinte: 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 56 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg.

3.3.12 Seleção dos clones de *P. pastoris* recombinates por *dot-blotting*

Os clones recombinantes foram semeados com auxílio de palitos estéreis por réplica *plating* em meio YPD e incubados a 30°C por 72 horas. As colônias foram colocadas em contato com a nitrocelulose por cerca de 3 a 4 horas e lavadas com PBS (tampão fosfato salino). A membrana foi então incubada por uma hora a temperatura ambiente (T.A) com solução de bloqueio contendo leite desnatado 5% (p/V) em PBS por agitação de 70 rpm. A seguir a membrana é incubada por 1h a temperatura ambiente na presença de anticorpo primário (IgG de camundongo) anti-insulina (1:5000). Em seguida a membrana foi incubada por 1h a temperatura ambiente na presença do anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo) conjugado com peroxidase (1:5000). Para a revelação usou-se 13 mg de DAB (3,3'- Diaminobenzidine) e H₂O₂ a 30% por 15 min. As membranas após a revelação foram digitalizadas e fotografadas.

3.3.13 Precipitação de proteínas com TCA e acetona

As proteínas obtidas a partir da expressão em levedura *P. pastoris* foram precipitadas utilizando-se 250 µL de TCA 100 % para cada mL de amostras. Após incubação em -20 por 3 horas, as amostras foram centrifugadas a 8000 x g por 30 minutos a 4^o C e o sobrenadante descartado. O precipitado resultante foi lavado com 1 mL de acetona seguido de centrifugação a 8000 x g por 30 minutos. O precipitado foi seco a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos e dissolvido em 50 µL de tampão de amostra 5X (descrita no item 3.1.8). No caso das amostras com coloração amarela (pH ácido) acrescentou-se 2 µL de tampão fosfato pH 6,0. As amostras foram estocadas a -20 °C até a análise em gel SDS-PAGE.

3.3.14 Gel de poliacrilamida e coloração com azul brilhante de Coomassie (LAEMMLI, 1970)

A eletroforese foi realizada usando-se o sistema Mini Protean II Electroforesis Cell (Bio-Rad). Antes da aplicação no gel as amostras foram fervidas durante 5 minutos para desnaturação das proteínas. A corrida foi conduzida em gel de duas fases (separação com concentração 5% de e separação 17% pH 8,9), foi desenvolvido com tampão do catodo contendo Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M e SDS 0,1 % (pH 8,25), e do anodo contendo Tris 0,2 M (pH 8,9). As proteínas foram dissolvidas em tampão de amostra (50 mM de Tris-HCl pH 6,8, SDS 8,2 % (p/v), azul de bromofenol 0,001% (p/v)) e fervida durante 10 minutos. As amostras foram submetidas a eletroforese durante aproximadamente 3 horas, a 70 V. As bandas proteicas presentes em alguns géis foram visualizadas após a incubação por uma hora, sob agitação, na solução corante preparada com Coomassie *blue*, seguida pela descoloração na solução descorante, sob agitação, até o aparecimento das bandas. Os géis após a revelação foram digitalizadas em *scanner* (Ettan DIGE Imager (EDI) - GE Healthcare).

3.3.15 Coloração com prata rápida em micro-ondas (BLUM et al., 1987)

Alguns géis foram submetidos à coloração com prata. Após a eletroforese como descrito, os géis foram levados ao micro-ondas em solução fixadora (30 segundos), seguidos de agitação lenta (5 min). O gel foi levado ao micro-ondas (15 segundos) com etanol 30% e submeteu-se a agitação lenta (5 min). Descartou-se a solução anterior, adicionou-se tiosulfato de sódio levou-se ao micro-ondas (30 segundos) e depois ao agitador (2min). Adicionou-se água destilada e levou-se ao micro-ondas (15 segundos)

e prosseguiu com agitação lenta (2 min). Adicionou-se a solução de prata e levou-se ao micro-ondas (15 segundos) e em agitação lenta (5min). Seguiu-se com duas lavagens com água destilada e revelou-se com solução reveladora por 5 a 8 minutos. A reação foi interrompida após o aparecimento das bandas, com a solução de parada.

3.3.16 Detecção das proteínas por *Western blotting* Johnson et al. (1984).

O *Western blotting* é um método onde proteínas podem ser imobilizadas em uma membrana após serem transferidas por capilaridade, difusão ou forças elétricas. O complexo antígeno-anticorpo é visualizado através da aplicação de um conjugado enzimático ao qual se adiciona um substrato que reage com a proteína, dando cor a reação. As proteínas separadas no gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose, sendo envolvidos por papéis-filtro previamente umedecidos em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8,8). O sistema foi montado em uma cuba apropriada preenchida com tampão de transferência e submetida a 400 mA por 4 h, de acordo com o manual de transferência do equipamento Trans-blot® Semi Dry (Bio Rad).

Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, esta foi corada com vermelho de Ponceau (1:200). Após descorar a membrana com TBS-T 1x (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6), a detecção de prosinsulina recombinante foi realizada como descrito no item 3.1.9.12.

3.3.17 Quantificação por imunoensaios-ELISA

A técnica de ELISA consiste em cinco etapas: sensibilização, incubação com o sobrenadante contendo a proteína 50µL/poço de microplacas poliestireno (NUNC) de alta afinidade durante uma hora, seguida de lavagem com PBS. A segunda etapa consiste em bloquear as áreas onde os anticorpos poderiam aderir inespecificamente na placa com solução a 3% de BSA (Albumina de Soro Bovino). A terceira etapa é a ligação com os anticorpos primários (IgG de camundongo) anti insulina por uma hora, seguidos de lavagens com PBST para que os antígenos não ligados sejam removidos. A quarta etapa é a ligação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com a peroxidase por uma hora e seguida de lavagem com PBST. A quinta e última etapa é a revelação, um substrato incolor TMB (tetrametilbenzidina) é adicionado a microplaca é ativado pela porção enzimática do ligante e produz no final uma coloração azul podendo ser lida diretamente em aparelho 600nm ou acrescido de ácido sulfúrico 2 Molar e lido em 450nm. A reação é neutralizada para evitar que o produto final fique

muito escuro e atrapalhe a leitura do teste. Realizou-se uma curva padrão, preenchendo 8 “poços” de uma fileira com concentrações crescentes e conhecidas de antígeno. A curva serviu como padrão de comparação para deduzir as quantidades de antígenos (proteína recombinante) nas soluções-testes. Realizou-se outro controle, que consiste na adição somente do tampão nos poços da placa com o objetivo de avaliar se houve contaminação com amostra durante o experimento. O teste foi feito em triplicata, servindo de controle para os erros de manuseio.

3.3.18 Extração do RNA mensageiro (RNAm)

A extração de RNA das amostras foi realizada com o reagente TRIZOL (Invitrogen), segundo instruções do fabricante com algumas modificações. Na etapa inicial, para romper a membrana celular, foi necessário utilizar o nitrogênio líquido. Foi utilizado 750µL de TRIZOL e as amostras uma vez homogeneizadas, incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 200µL de clorofórmio e agitando vigorosamente com as mãos por 15 segundos, seguindo de uma incubação à temperatura ambiente por mais 10 minutos. Centrifugou-se a 10.400 rpm por 15 minutos, a 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubos limpos após centrifugação e acrescentou-se 500µL de álcool isopropílico, deixando os tubos incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Após os 10 minutos, centrifugou-se a 10000 rpm por 10 minutos, a 4°C, e removido o sobrenadante, deixando apenas o *pellet* que foi lavado com 1mL de etanol a 75% e homogeneizado no vortex. Centrifugou-se esse material a 8600 rpm, por 5 minutos a 4°C. No final do procedimento, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* colocado a uma temperatura ambiente por 10 minutos para secar. O mesmo foi ressuspensionado em 20µL de água DEPC (Dietilpirocarbonato), e aquecido a 55°C por 10 minutos. As amostras de RNA foram armazenadas a -70°C para uso posterior.

3.3.19 Reação de Transcrição Reversa (RT)

Para a reação de transcriptase reversa a concentração final dos componentes na reação descritos a seguir : tampão de PCR 1X; dNTPs 10 mM; MgCl₂ 1,25 mM; 5 pmol do *primer* (Forward) e 5 pmol do *primer* (Reverse); 200 U/µL de SuperScript® II RT, 384/µL de amostra de RNA; e água MiliQ autoclavada para um volume total de 50 µL. Foi incluído um tubo controle, substituindo-se o cDNA por 1 µL de água MiliQ autoclavada. Utilizou-se termociclador Veriti (Applied Biosystems), com a seguinte

programação: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos; seguido por 44 ciclos (desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos); e finalizado por 1 ciclo a 94°C por 1 minuto, 1 ciclo a 60°C por 30 segundos, 1 ciclo a 72°C por 1 minuto e 4°C∞. Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, utilizando TBE 1X como tampão.

3.3.20 PCR em Tempo Real

Para o PCR Tempo Real a determinação foi realizada utilizando-se Platinum® SYBR Green qPCR SuperMix, um corante fluorescente intercalante de DNA. Este corante fluorescente é captado pelo termociclador a cada novo ciclo da reação de PCR e permite que o aparelho desenhe uma curva de amplificação para cada amostra. A amplificação por PCR foi medida em tempo real analisando a emissão de fluorescência do SYBR Green, que se intercala apenas entre a fita dupla de DNA, conforme esta é produzida. As emissões de fluorescência a cada ciclo foram coletadas e analisadas pelo *software* Stepone (Applied Biosystem). A análise, interpretação e registro dos resultados do RT-qPCR foram efetuados com o auxílio do *software* ABI PRISM (versão 2.4 Applied Biosystems). A interpretação dos dados brutos, o cálculo da eficiência da amplificação e a determinação do limiar de leitura foram feitos através do *software* Stepone (Applied Biosystem). O modelo matemático utilizado para o cálculo do número de cópias do gene da proinsulina se baseia em modelos de quantificação relativa (PFAFFL 2001). A reação da qPCR está descrito na Tabela 1.

A quantificação do número de cópias do RNA mensageiro da proinsulina no clone A140 foi realizada em equipamento StepOnePlus® (Applied Biosystems® - Life Technologies), utilizando o sistema TaqMan para detecção do produto de amplificação.

Tabela 9. Reação de qPCR para a quantificação do número de cópias

Componente do PCR	Concentração Final	Reação de Amplificação
cDNA	0,001 ng/μl	50°C por 2 minutos
Oligonucleotídeo 5'-3'	0,075pmol	95°C por 10 minutos
Oligonucleotídeo5'-3'	0,075pmol	40 Ciclos de:
SYBR Mix	1X	95°C por 15 segundos
ROX	500 nM	60°C por 60 segundos
Volume Total	10,0 μl	4°C ∞

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira etapa realizada para a obtenção da proinsulina neste trabalho foi o desenho do gene sintético do precursor da insulina com os códons otimizados para a expressão em *Pichia pastoris* pois diversos trabalhos assinalam que a otimização do códon usage e do conteúdo de G+C geralmente resultam em maiores níveis de expressão das proteínas heterólogas em *P. pastoris* (CHANG et al., 2006; FANG et al., 2007; SU et al., 2007; SURRIBAS et al., 2007).

O códon *usage* é considerado um dos fatores limitantes para a expressão de proteínas heterólogas, pois códons que são comuns a algumas espécies podem ser raros em *P. pastoris*. Isto pode resultar em um retardo temporário da tradução e/ou uma terminação prematura da proteína (DALY & HEARN, 2005; GUSTAFSSON et al., 2004). Devido à redundância do código genético, é possível melhorar os códons mais abundantes e utilizados, evitando os códons raros, sem alterar a sequência de aminoácidos da proteína (VAN DEN BRINK et al., 2006).

Assim foi realizada a otimização de códons para *P. pastoris* na composição do gene da proinsulina. O gene sintético codificador para o precursor da insulina humana é proposto com base na sequência da proinsulina obtida do GenBank (nº J02547.1), substituindo-se sistematicamente os códons nativos pelos códons mais frequentes encontrados nos genes de *P. pastoris*.

Além da otimização de códons para *P. pastoris* e desenho do gene A1 para a proinsulina, este trabalho avaliou um sistema de expressão para *P. pastoris* utilizando vetor integrativo carregando um promotor do gene da 3-fosfoglicerato quinase (pPGK1) de *P. pastoris*. O promotor do gene *PGK1* de *P. pastoris* dirige a expressão constitutiva com êxito de proteínas na levedura *P. pastoris*.

A enzima PGK pode compor cerca de 5 % do total de proteínas celulares e seu mRNA é também abundante, sendo a proteína constitutivamente expressa e seu promotor considerado forte.

A figura 9 a seguir mostra esquematicamente as etapas deste trabalho que envolveram: o desenho da sequência codificadora da proinsulina A1 a partir da sequência da proinsulina humana, a síntese química dessa sequência e sua subclonagem no vetor de expressão/secreção de *P. pastoris* (pPGK) originando o plasmídeo recombinante pPGKA1. Este foi utilizado para transformar geneticamente levedura *P. pastoris* e obter clones recombinantes capazes de produzir e secretar a proinsulina.

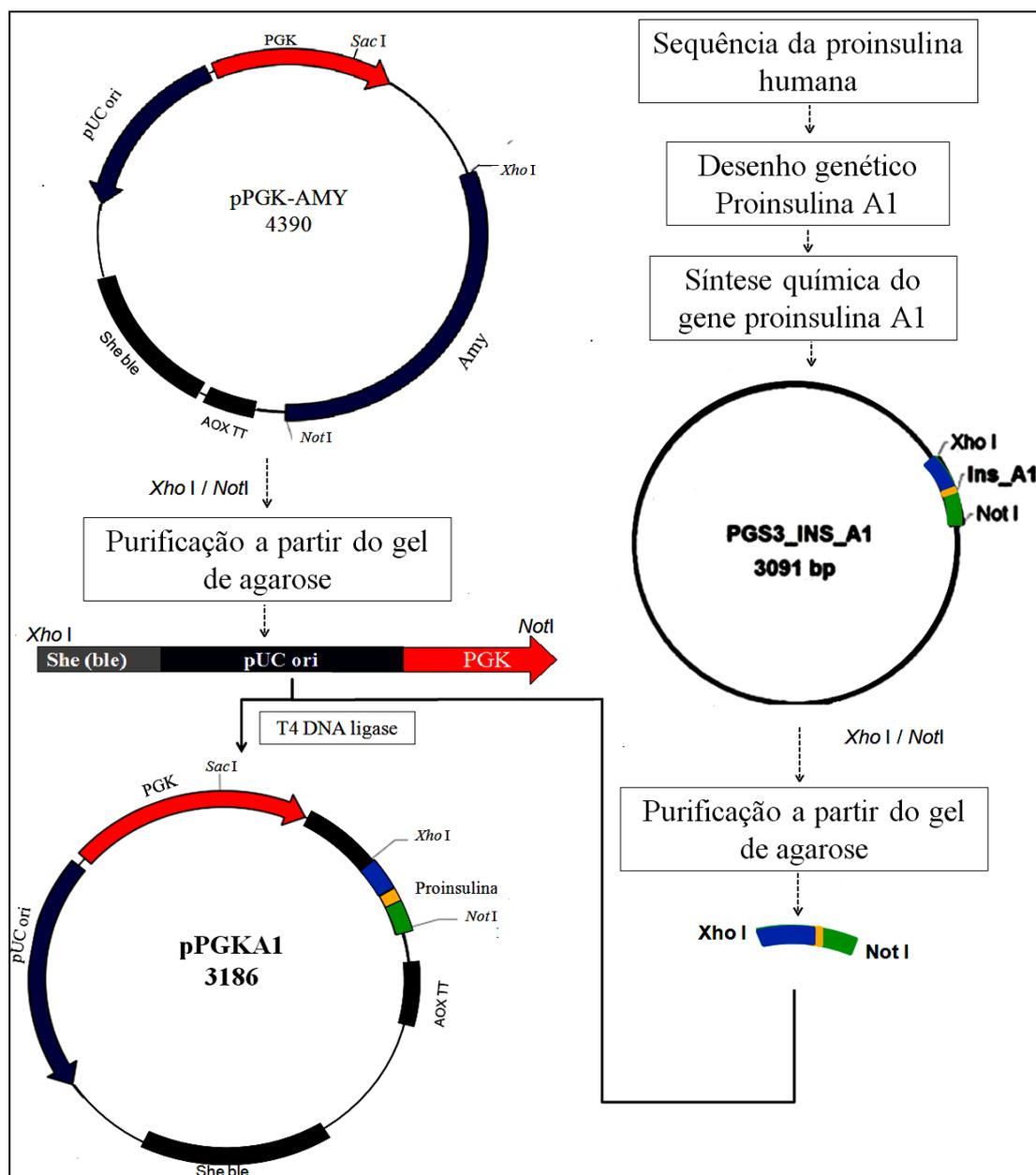


Figura 9. Esquema mostrando a subclonagem do gene sintético da proinsulina A1 no vetor de expressão/secreção pPGK (PGK: promotor do gene 3-fosfoglicerato quinase; gene de resistência a zeocina (she ble).

4.1 A sequência codificadora da proinsulina A1

A proinsulina A1, que se deseja expressar em altos níveis em *P. pastoris* é uma mini-proinsulina humana pois, como pode-se observar na figura 10 a seguir, tem as cadeias B e A idênticas as humanas, porém a cadeia C é formada de apenas 3 aminoácidos (AAK) enquanto a cadeia C da proinsulina humana tem 33 aminoácidos.

A partir dessa definição a região codificadora da mini-proinsulina A1 foi desenhada no sentido de conter códons mais frequentemente utilizados por *P. pastoris*. Para isso utilizou-se uma tabela que indica a frequência de uso de cada um dos 64 códons por esta levedura (códon *usage*). Nas extremidades foram adicionados sítios de *Xho* I e *Not* I para subclonagem no vetor de expressão/secreção para *P. pastoris* do plasmídeo pPGK. A sequência gênica definida foi sintetizada pela empresa (Genone Ltda-RJ) e nos enviada clonada no plasmídeo pGS (pGSinsA1).

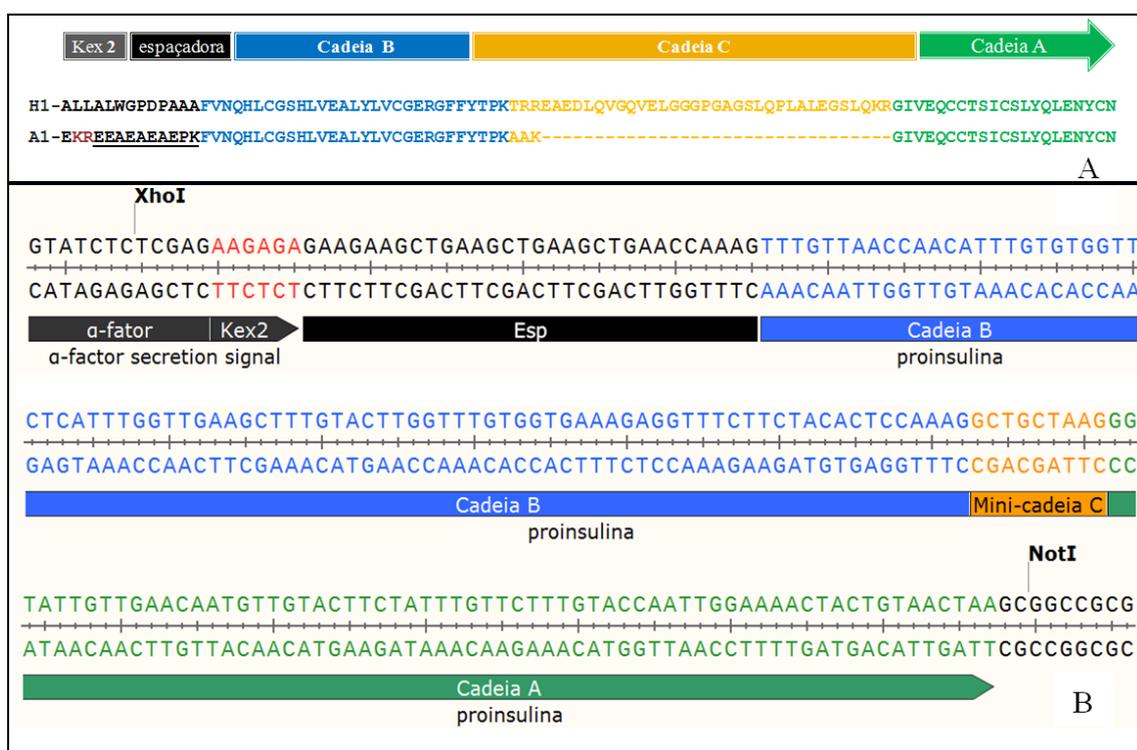


Figura 10. Mostra em **A**: as sequências de aminoácidos da proinsulina humana (H1) e da mini-proinsulina (A1). Em **B** mostra: a sequência de nucleotídeos codificadores da mini-proinsulina A1. Em azul está representada a cadeia B, em laranja a cadeia C, em verde a cadeia A, em preto a região final do peptídeo sinal do fator α (o sítio da peptidase Kex 2) e a região glu - ala (EA) repetida (processada pela dipeptidil aminopeptidase).

Determinado por análise *in silico* o ponto isoelétrico e massa molecular da proinsulina são, respectivamente, pI 5,3, Mw 7,5 kDa. O conteúdo de G+C do gene A1 apresentou 38 % de GC e está bem próximo de 42 % que se encontra presente nos genes de leveduras (CREGG, et al., 1993). Este aspecto provavelmente será favorável para a expressão recombinante.

A funcionalidade do peptídeo sinal de *S. cerevisiae* no contexto da construção genética proposta foi avaliada pelo algoritmo signal-P (signal-P faz uma previsão do provável local de ocorrência da clivagem pela enzima peptidase sinal).

Os resultados mostrados na figura 11 indicam funcionalidade e que é o possível o sítio de clonagem. O peptídeo sinal predito e o possível sítio de clivagem para peptidase sinal foi indicada entre os aminoácidos 21 e 22 (Ala Leu Ala - Ala Pro) para proteína codificada.

Clare et al. (1991) expressaram o fator de crescimento epidermal de camundongo em leveduras *P. pastoris* e *S. cerevisiae*, sob controle do promotor do gene AOX1, ambos utilizando o peptídeo sinal do *S. cerevisiae* (fator α). Estes autores observaram uma correta clivagem do peptídeo sinal, indicando que o fator α é corretamente reconhecido e processado pela *P. pastoris*. Já Wang et al. (2002) expressaram lactoferrina porcina em *P. pastoris* utilizando o promotor do gene GAP e a sequência sinal de secreção própria da *P. pastoris* ou o peptídeo sinal do fator- α de *S. cerevisiae*. Os autores observaram uma expressão maior quando o peptídeo sinal do fator α foi utilizado, sendo que a produção da lactoferrina em *P. pastoris* (12 mg/L) foi maior que a produção em *S. cerevisiae* (1 a 2 mg/L).

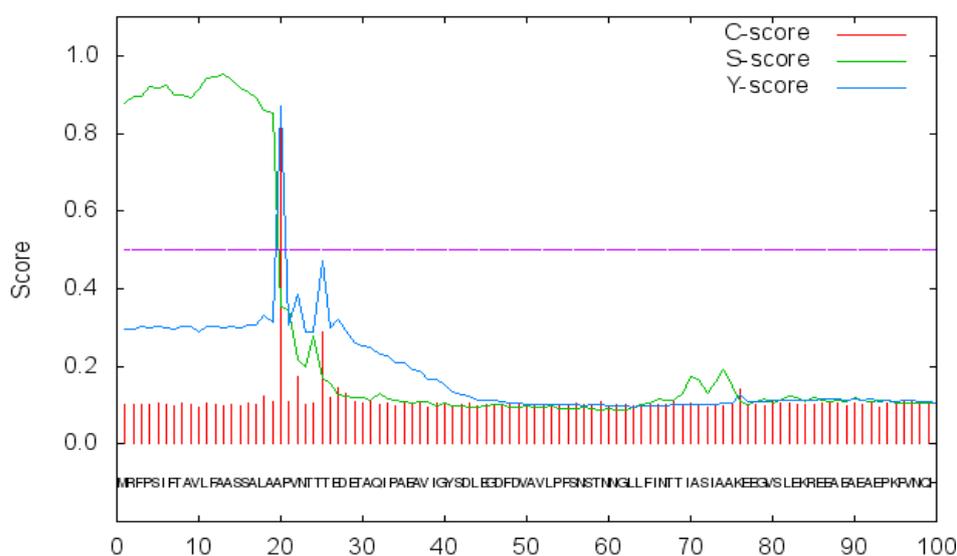


Figura 11. O peptídeo sinal predito e o sítio de clivagem entre os aminoácidos 21 e 22

4.2 Subclonagem da sequência codificadora da mini-proinsulina A1 no vetor de expressão/secreção pPGK

Para a subclonagem da sequência codificadora da mini-proinsulina A1 construída por síntese química, tanto o plasmídeo pGS3-InsA1 como pPGK Δ 3Amy foram duplamente digeridos com *Xho* I e *Not* I resultando na liberação dos fragmentos correspondentes ao gene da proinsulina (A1) 212 pb, e ao gene de α - amilase (1500 pb), e ao vetor pPGK Δ 3Amy linearizado (figura12).

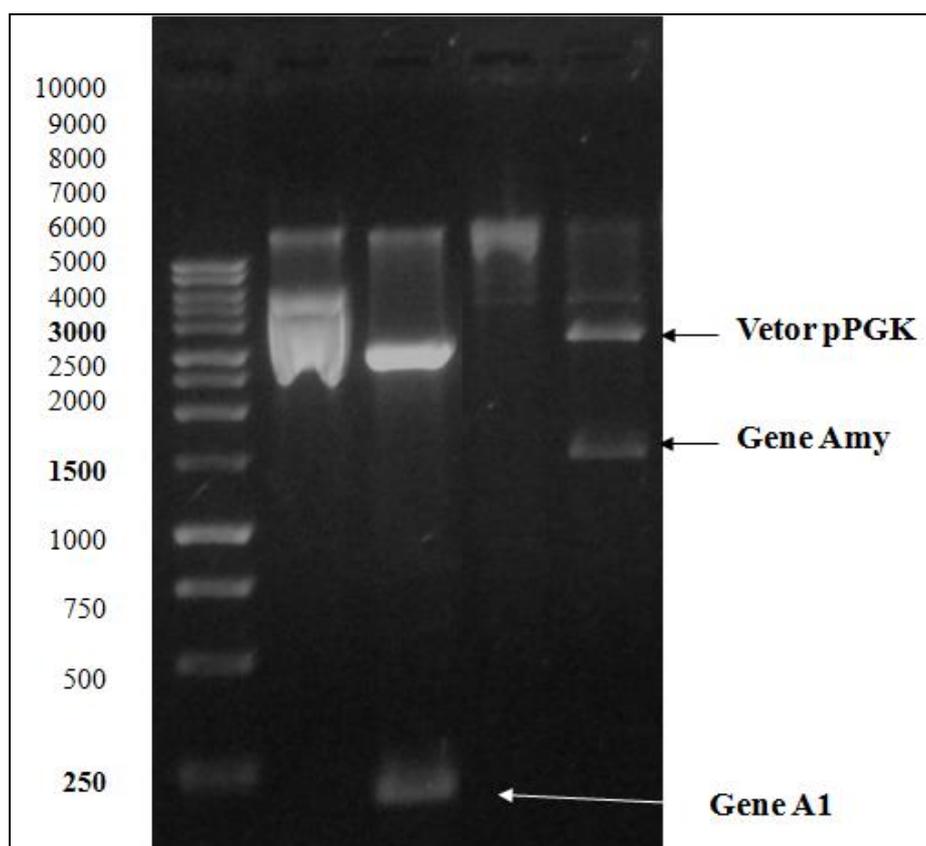


Figura 12. Perfil de eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da digestão dos plasmídeo PGS3 – InsA1 e pPGK Δ 3Amy. 1- Marcador de 1Kb; 2 e 4 e mostram os plasmídeos recombinantes íntegros; e 3 e 5 mostram os plasmídeos recombinantes digeridos indicando os fragmentos correspondentes aos genes da proinsulina A1 (212 pb e gene de α - amilase (1500pb).

Após a purificação por eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de DNA correspondente ao gene da proinsulina A1 e do vetor de expressão/secreção, estes foram analisados por eletroforese e os resultados estão mostrados na figura 13. Pode-se observar que os fragmentos estão puros e com o tamanho esperado.

O fragmento gênico da proinsulina A1 purificado foi ligado no vetor pPGK obedecendo a fase de leitura entre os aminoácidos da proinsulina A1 e os da sequência codificadora do peptídeo sinal do α -factor de *S. cerevisiae*, gerando o plasmídeo pPGKA1.

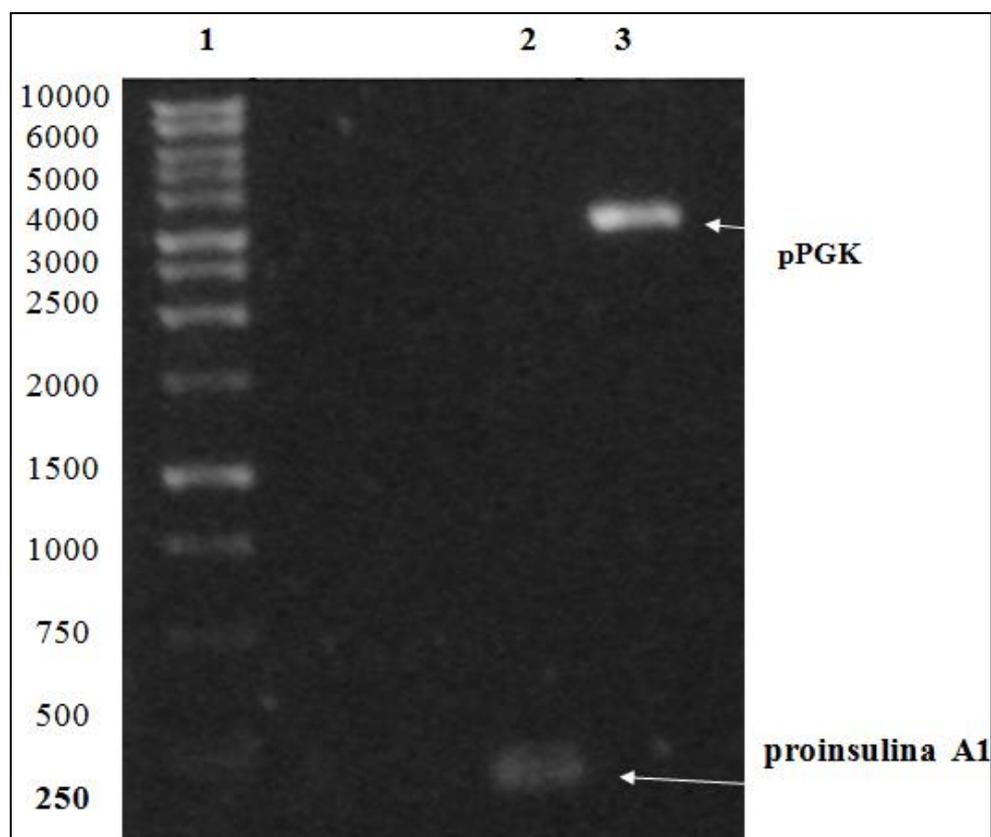


Figura 13. Perfil de eletroforese em gel de agarose 0,8 dos fragmentos gerados por dupla digestão (*XhoI* e *NotI*) após purificação 1 - marcador de 1Kb, 2 - Fragmento do gene da proinsulina com cerca de ~212pb. 3 - Plasmídeo pPGK linearizado com cerca de 3000pb.

O gene da proinsulina foi ligado ao vetor pPGK gerando o plasmídeo recombinante pPGKA1. Na figura 14 é mostrado o resultado da análise de restrição dos plasmídeos de 3 diferentes clones recombinantes por meio de dupla digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *NotI*. Como esperado pode-se observar a liberação do fragmento subclonado de tamanho 212 pb (A1).

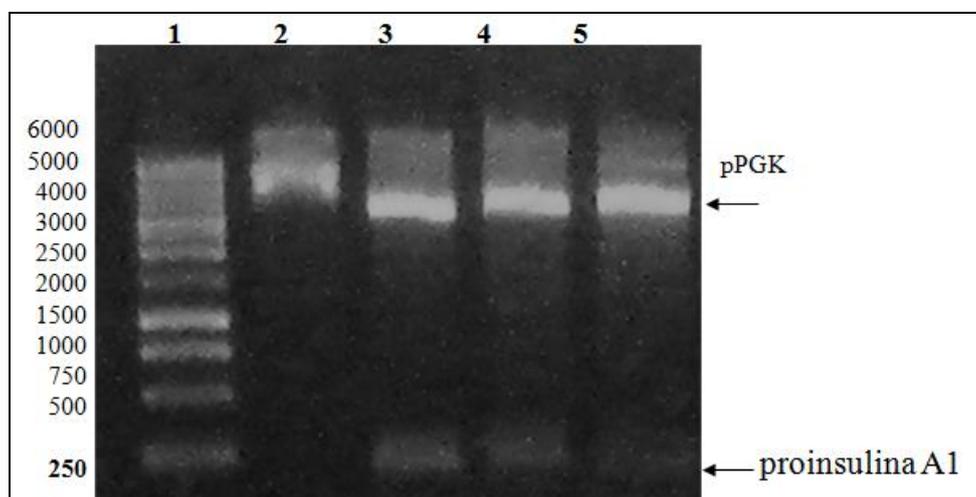


Figura 14. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% mostrando o resultado da digestão com *XhoI* e *NotI* dos plasmídeos recombinantes. 1 - Marcador de 1Kb, 2 - pPGKA1 intacto e 3, 4 e 5 - pPGKA1 duplamente digerido.

A figura 15 mostra o mapa físico do plasmídeo recombinante pPGKA1.

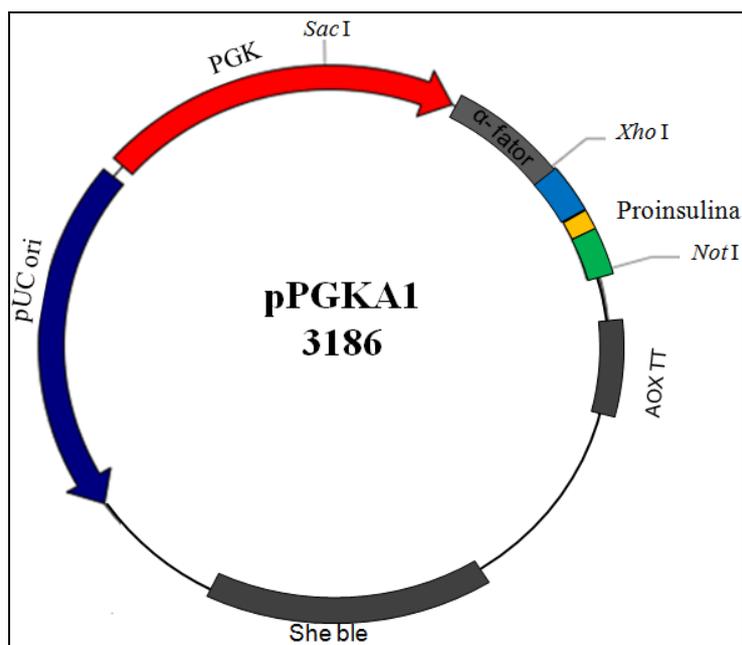


Figura 15. Mapa físico do plasmídeo recombinante pPGKA1.

4.3 Transformação genética de *P. pastoris* com o plasmídeo recombinante pPGKA1

Para a transformação genética de *P. pastoris* GS115, o plasmídeo pPGKA1 foi previamente linearizado com a enzima *SacI*, que cliva o plasmídeo em uma única posição, pois isto melhora a eficiência da integração do plasmídeo no genoma da levedura (figura 16). A transformação genética com o plasmídeo pPGKA1 gerou cerca de 500 clones transformantes da levedura.

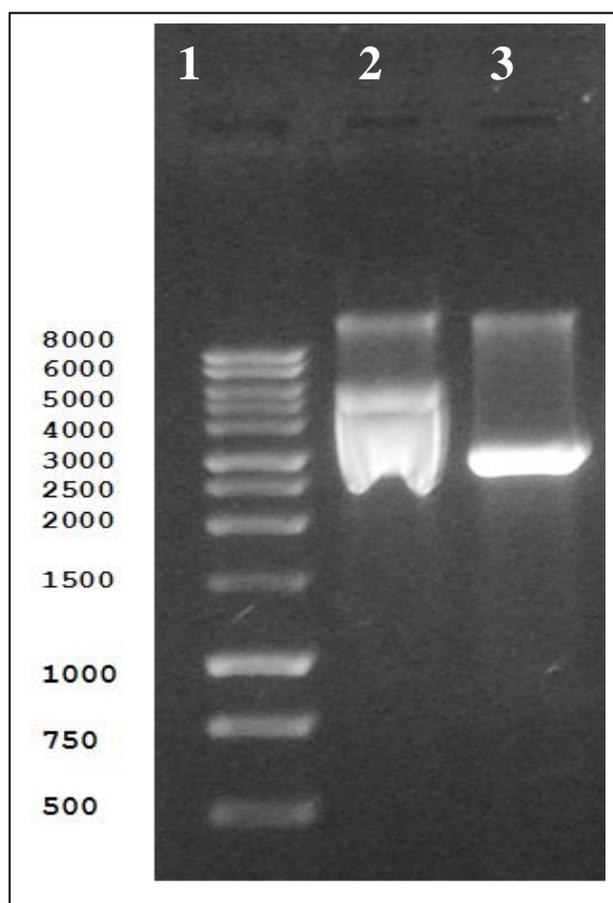


Figura 16. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do plasmídeo recombinante pPGKA1. 1 - marcador de 1Kb, 2 - plasmídeo intacto e 3 pPGKA1 digerido com *SacI* (linearizado com cerca de 3000 pb).

Foram selecionados aleatoriamente 7 clones de *P. pastoris* para a confirmação da transformação genética por PCR de colônias, como mostra a figura 17. Os amplicons apresentaram um tamanho de aproximadamente 216 pares de bases (pb) o que está de acordo com o tamanho esperado, indicando a presença do gene de proinsulina A1 nos clones recombinantes. Apenas 4 clones de *P. pastoris* amplificaram e foram utilizados para análise por sequenciamento (poços 5 a 8).

Os quatro amplicons foram sequenciados pelo método de Sanger e Coulson (1977) e suas sequências mostraram-se idênticas a sequência codificadora sintética da proinsulina A1.

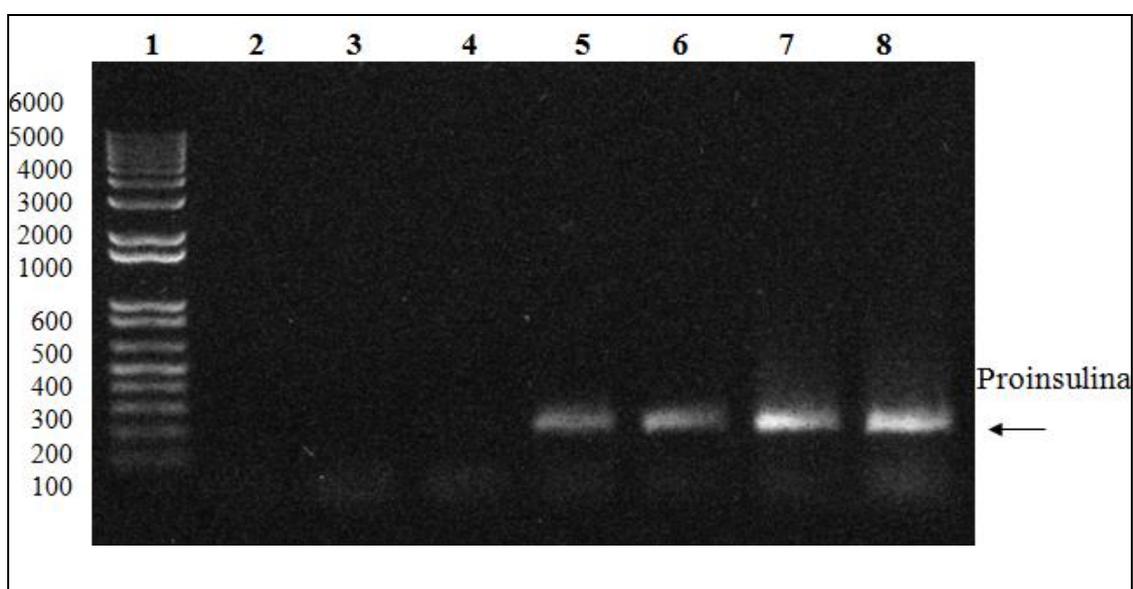


Figura 17. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do produto de PCR de colônias dos clones transformantes de *P. pastoris*, utilizando-se os primers (A1_F0 e A1_R1) - Marcador de 1K ladder, 2 a 8 amplicons produzidos por PCR de colônias de transformantes do pPGKA1.

4.4 Seleção dos clones recombinantes melhores produtores de proinsulina (A1)

4.4.1 Seleção por zeocina

Para selecionar os clones recombinantes com maior número de plasmídeos integrados utilizou-se a estratégia de cultivo em meio com concentrações crescentes do antibiótico zeocina.

Os resultados da análise de 75 clones estão apresentados na figura 18.

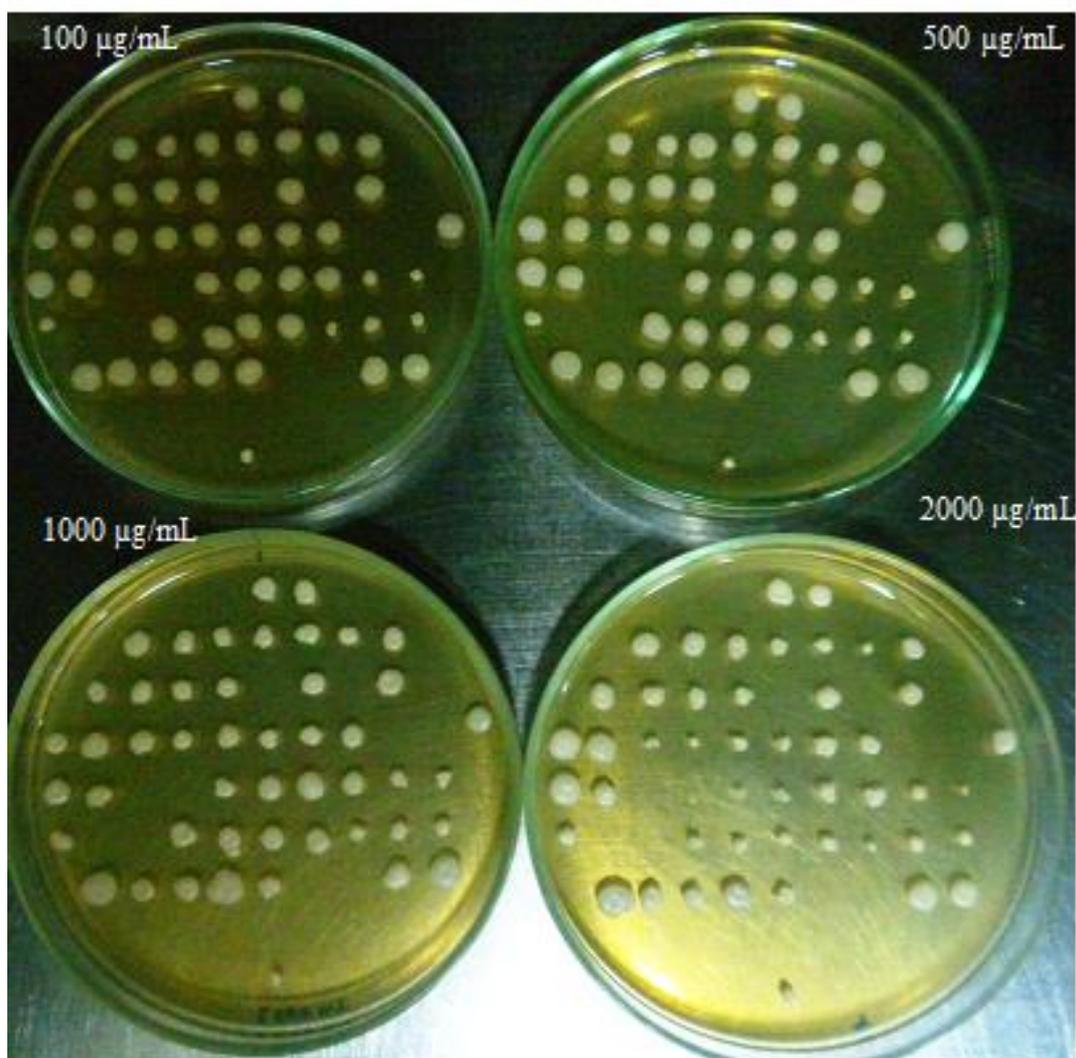


Figura 18. Ensaio de resistência a zeocina nas concentrações de 100, 500, 1000 e 2000 µg/mL dos clones recombinantes de *P. pastoris*.

Estes resultados revelam que na placa de 2000 μ g/mL de zeocina, treze clones claramente cresceram com melhor eficiência, na placa de 1000 μ g/mL 35 clones apresentaram maior crescimento e na placa de 500 μ g/mL pode-se observar que 40 clones apresentaram bom crescimento.

Na tabela 11 os clones recombinantes foram classificados quanto ao crescimento (muito e pouco crescimento) nas crescentes concentrações de zeocina. Esta análise foi realizada tendo como parâmetro o tamanho da colônia.

Estudos demonstram que a capacidade dos clones transformantes em tolerar o aumento da concentração de zeocina tem correlação direta com o aumento do número de cópias do gene de resistência ao antibiótico (*she ble*) integradas no genoma. Assim, quanto maior número de cópias do plasmídeo nos clones recombinantes, maior será a tolerância a zeocina no meio.

Os clones que possuem a capacidade para crescer na concentração de até 100 mg/mL do antibiótico apresentam uma cópia integrada. Aqueles clones que crescem em concentrações de 500, 1000 ou 2000 g/mL possuem respectivamente 2, 3 ou 4 cópias integradas do gene *She ble* no genoma (SREEKRISHNA et al., 1997; VASSILEVA et al., 2001).

Tabela 10. Ensaio de resistência de *P. pastoris* transformada com plasmídeo pPGKA1 a zeocina (muito = maior crescimento, pouco = menor crescimento)

zeocina 100μg/mL	zeocina 500μg/mL	zeocina 1000μg/mL	zeocina 2000μg/mL
40 (muito)	40 (muito)	35(muito)	13 (muito)
8 (pouco)	8 (pouco)	13 (pouco)	35 (pouco)

4.4.2 Seleção por imuno dot-blotting

Na seleção dos recombinantes de *P. pastoris* produtores de proinsulina por imunoensaio tipo dot-blotting, analisou-se 71 clones transformados com o plasmídeo pPGKA1 (figura 19). Foi detectado presença de proteína recombinante em 44 clones, enquanto que 24 clones não produziram proinsulina recombinante secretada.

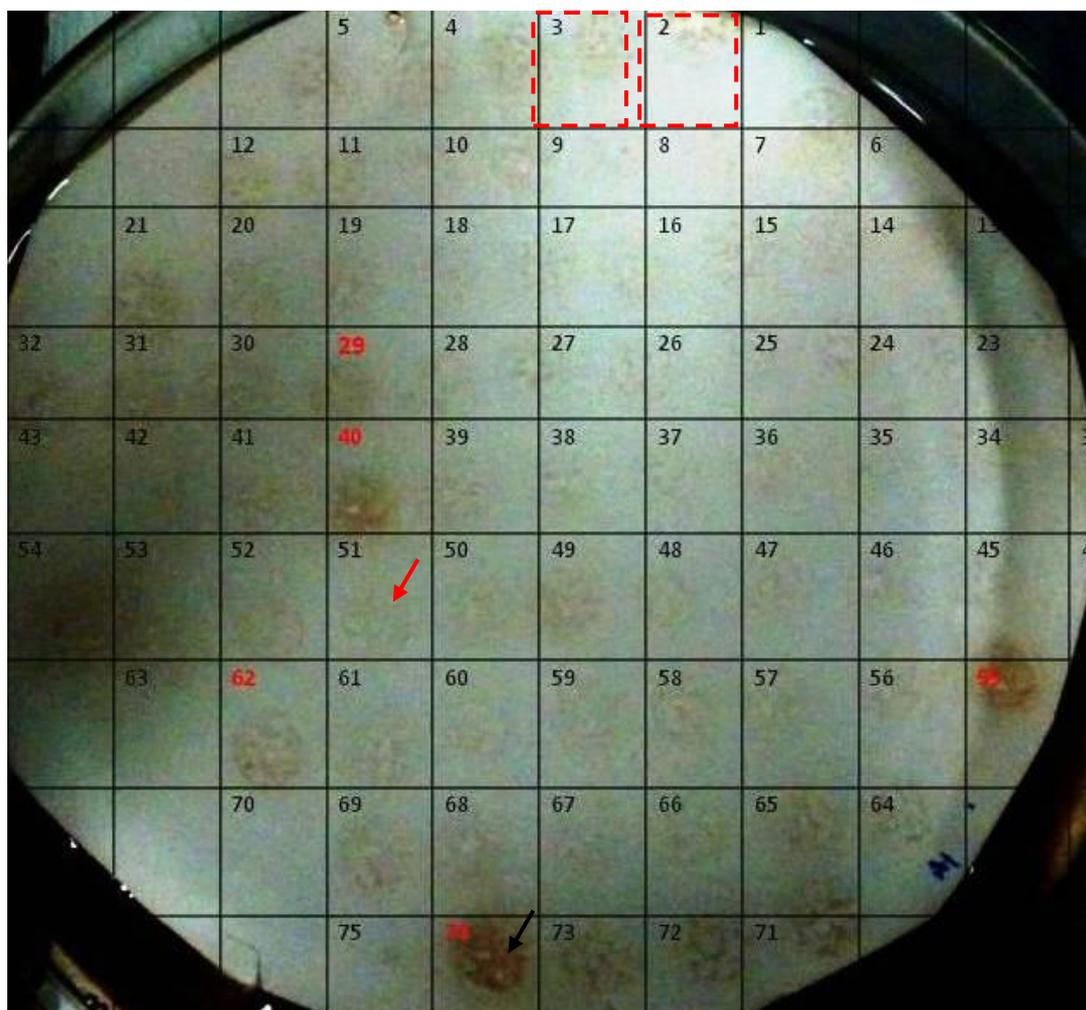


Figura 19. Seleção de recombinantes de *P. pastoris* transformados com pPGKA1 por imuno dot-blotting. Mostra a membrana de nitrocelulose com os recombinantes após reação imunológica com anticorpos anti-insulina. De 3 a 54 são os clones recombinantes e os quadros tracejados em vermelho mostram os controles negativos (hospedeira vazia). As setas indicam o clone positivo de baixa (vermelha) e alta (preta) intensidade de reação.

Na correspondente análise de expressão por ensaios de dot-blotting confirmou-se a efetiva expressão e secreção de proinsulina para o meio de cultivo. A opção de utilizar o sistema de expressão e secreção está relacionada à facilidade de recuperação dessa proteína exógena.

Dos resultados presentes foi concluído que houve expressão da proinsulina indicando a efetiva integração do cassete de expressão no genoma da levedura. No correspondente dot-blotting foi verificada uma variação na intensidade da reação específica entre os clones positivos, alguns mais intensos e outros menos intensos (Figura 19). Isto deve ser devido ao número de diferentes cópias do cassete de expressão, integradas no genoma da *P. pastoris* em diferentes recombinantes (CREGG, CEREGHINO, HIGGINS, 2000). Os clones recombinantes, com maior resistência a 2000µg/mL de zeocina e fortes sinais no experimento de dot-blotting, foram selecionados para a análise da expressão/secreção da proinsulina A1 em meio líquido. Esses clones foram denominados de A114, A120 e A140.

O experimento foi realizado com cultivos simultâneos em frascos agitados em meio YPD e os resultados mostraram que o clone A140 apresentou maior produção extracelular de proinsulina A1 (0,075g/L) seguido do A1 - 14 (0,064g/L) e A1 - 20 (0,020g/L) (Tabela 12).

Tabela 11. Crescimento com zeocina, produção de insulina e provável n° de cópias.

Meio de cultura YPD	[insulina]g/L	zeocina µg/mL
A1-20	0,020	100
A1-14	0.064	500
A1-40	0.075	2000

Durante os primeiros testes de fermentação com esses clones, houve um acúmulo de proinsulina A1 ao longo da cultura, o que indica que a expressão está sob o controle do promotor constitutivo PGK1 e que a adição da glicose durante o cultivo, permitiu um maior crescimento celular com um concomitante aumento da produção da proinsulina. Observou-se que a expressão de proinsulina A1 ocorre nas primeiras horas do cultivo, não havendo necessidade de cultivo em outra fonte de carbono como ocorre com promotores do tipo AOX1. Vassileva et al. (2001) realizaram um trabalho comparando o promotor AOX1 com o promotor GAP em *P. pastoris* e foi observado a produção de altos níveis de expressão do antígeno de superfície da hepatite B do clone que continha o promotor constitutivo logo no início, permanecendo em níveis constantes durante todo o experimento, por outro lado o clone com promotor AOX atingiu níveis similares de expressão da proteína heteróloga apenas após 3 a 4 dias de indução com metanol. No entanto outro trabalho analisando os mesmos promotores para a expressão de lipase B de *Candida antarctica* em *P. pastoris*, mostrou que o promotor AOX1 promoveu maior expressão da proteína que promotor GAP (WITTRUP et al., 2007).

De acordo com Johansson & Hahn-Hagerdal (2002) o promotor do gene PGK1 tem sido utilizado na construção de vetores de expressão para diversas leveduras, como: *S. cerevisiae* (KINGSMAN et al., 1985; GRANGE et al., 1996), *Candida maltosa* (MASUDA et al., 1994), *Yarrowia lipolytica* (DALL et al., 1996) e fungos filamentosos: *Rhizopus niveus* (TAKAYA et al., 1994) e *Trichoderma reesei* (VANHANEN et al., 1989, 1991) e tem-se mostrado como uma atraente opção para a produção de proteínas heterólogas em altos níveis nestes sistemas.

O plasmídeo recombinante pPGKA140 com o gene da proinsulina sob o controle do promotor (PPGK1) foi integrado com sucesso no genoma de *P. pastoris*, tornando possível a eficiente expressão da proinsulina. O sistema de expressão de *P. pastoris* tem sido cada vez mais utilizado e tem-se mostrado como uma atraente alternativa para a superexpressão de genes humanos. Apesar da grande disponibilidade de promotores, os principais sistemas de expressão de *P. pastoris* são baseados no promotor PAOX1 do gene AOX1 que codifica a enzima álcool oxidase 1 (AHN et al., 2007). O fato dos promotores PGK serem considerados fortes e constitutivos, sobretudo em meio com glicose, despertou o interesse do seu uso para a expressão heteróloga em *P. pastoris*. O PGK possui a vantagem de ser possível a sua utilização na ausência de um indutor, ao contrário do sistema AOX que requer adição de metanol.

Além disso não necessita trocar a fonte de carbono durante o processo fermentativo, o que minimiza custo e torna o processo menos trabalhoso (CEREGHINO & CREGG, 2000). Por isso, promotores constitutivos como o pPGK representam uma alternativa para o promotor PAOX1 quando a proteína não é tóxica. É importante ressaltar alguns aspectos interessantes no vetor pPGK que certamente contribuíram para uma boa expressão de proteínas em *P. pastoris*. Existem na região promotora do gene (PGK) elementos cis-regulatórios que também se encontram presentes em outros promotores PGK de outras leveduras. O TATA box, que é responsável pela correta iniciação da transcrição, foi identificado na posição -71 do ATG do gene PGK e o elemento *heat shock* (HSE) na posição -425 a - 440; este é responsável pelo aumento dos níveis de mRNA quando a temperatura é aumentada (PIPER et al., 1988). Outra sequência relevante encontrada no PGK1 são sítios de ligações para a proteína Gcr1 que são essenciais para a ativação dos genes da via glicolítica como relatado em *S. cerevisiae* (DOMINOFF & SANTANGELO, 2001). Arruda, (2008) realizou estudo com diferentes tamanhos do promotor PGK1, alcançando uma eficiente expressão de α -amilase de *Bacillus subtilis* e com a expressão da α -amilase. Conseguiu demonstrar que a redução do tamanho da região promotora de 2000pb para (400pb) não interfere na expressão de proteínas recombinantes.

Zhu (2009); Xie (2008); Wang (2001); Pais (2003) Pais-Chanfrau2004; Mansur (2005) relatam a produção do precursor de insulina em *P. pastoris* utilizando o sistema de expressão baseado no promotor AOX, e mostram ser um sistema eficiente.

Os vetores com promotor PGK1 estão entre os mais eficientes sistemas usados para expressão constitutiva de proteínas heterólogas, em diferentes leveduras e fungos filamentosos (BURKE et al., 2000). Eles são utilizados na produção de proteínas em larga escala, com a vantagem de não requererem agentes indutores e permitem a purificação da proteína recombinante sob a condição de fermentação contínua.

4.5 Análise do crescimento do clone de *P. pastoris* (A140) e produção de proinsulina A1

O crescimento do clone recombinante de *P. pastoris* foi analisado em meio YPD em frascos agitados, nas seguintes condições: a 30°C por 120 horas em estufa com agitação de 180 rpm., a cada 24 h aos frascos adicionava-se 2% de glicose. O clone recombinante selecionado para esse estudo foi o A140, que apresentou melhor crescimento em concentração de zeocina e maior produção de proinsulina A1 no ensaio de ELISA. Na figura 20 é mostrado o crescimento do clone recombinante A140, de forma comparativa com um controle positivo de expressão contendo o plasmídeo pGKΔ3Amy (com gene da α -amilase) e um controle negativo a levedura *P. pastoris* não transformada geneticamente.

O clone recombinante A140 apresentou perfil de crescimento um pouco inferior quando comparado ao perfil dos controles, atingindo a densidade celular correspondente a absorbância de 18 a 660 nm por 120 horas de cultivo.

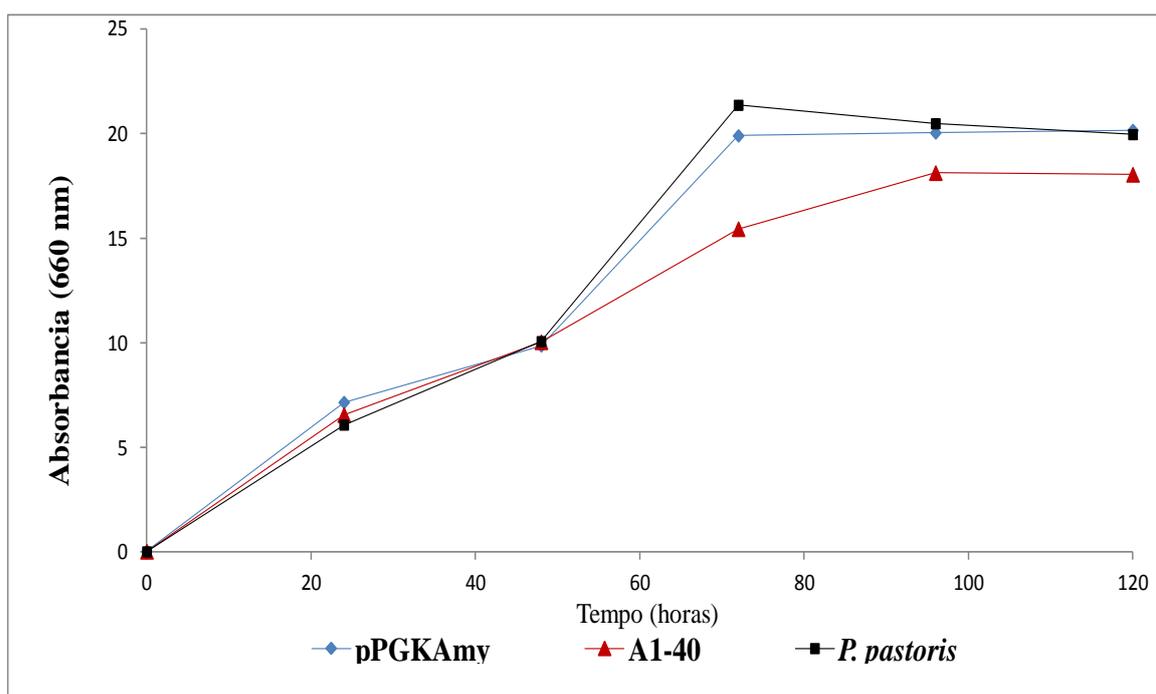


Figura 20. Curvas de crescimentos dos clones A140 e controles. Como controle negativo temos a levedura *P. pastoris* não transformada geneticamente e como controle positivo a *P. pastoris* transformada com o plasmídeo pGKΔ3Amy, todos crescidos a 30°C por 120 horas em estufa com agitação a 180 rpm.

Para os estudos subsequentes escolheu-se trabalhar com o meio YPD, pois quando comparado com o meio YNB apresentou rendimento bem maior de biomassa e produção da insulina (dados não mostrados).

O crescimento do clone recombinante A140 foi analisado quanto a produção de biomassa, consumo de glicose e produção de insulina no meio YPD sendo que os resultados estão mostrados na figura 21. Durante o processo fermentativo foi feito monitoramento do pH do meio e verificou-se que houveram pequenas variações entre um mínimo de 5,2 e máximo de 6,4.

Como a levedura, nas condições de cultivo selecionadas, consumia totalmente a glicose do meio de cultivo no período de 20 a 24 horas, esse carboidrato era então repostado no meio nesse intervalo de tempo.

Quanto a produção de biomassa pelo clone recombinante A140 durante o processo de fermentação, verificou-se que houve um aumento exponencial no período de 10 a 30h de cultivo atingindo 30g/L em 30h, e seguida a taxa de acúmulo de biomassa foi menor atingindo 41g/L após 80h de cultivo.

No que se refere a produção extracelular de insulina pode-se dizer que houve um período de latência (0 a 20h), uma fase exponencial (20 a 35h) atingindo seu maior nível em 45h de cultivo. Dessa forma a última adição de glicose foi inócua, tanto no que se refere ao aumento de biomassa de levedura quanto ao acúmulo de insulina no meio extracelular.

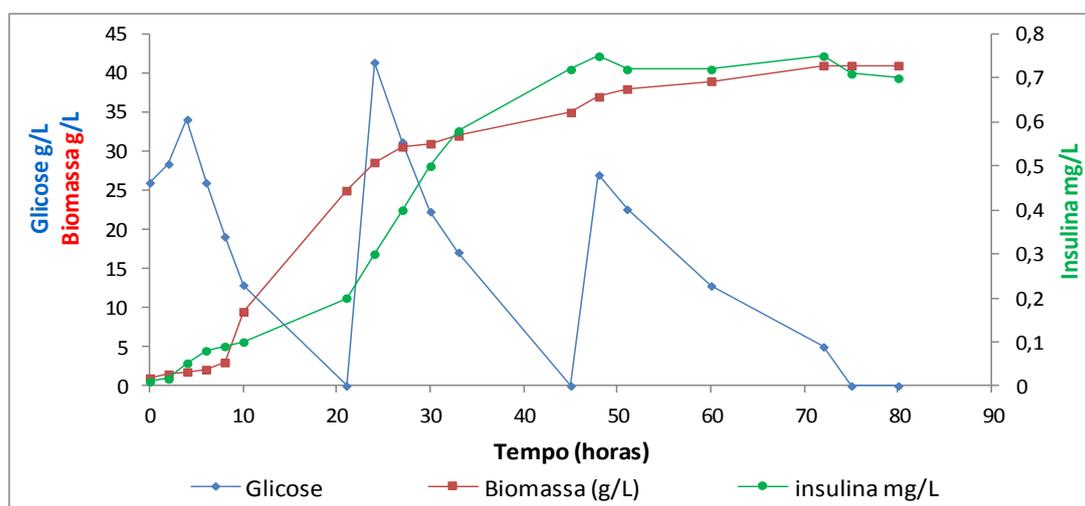


Figura 21. Curvas com a variação da concentração de glicose, produção de biomassa e proinsulina em função do tempo de cultivo do clone recombinante A1. As curvas foram geradas a partir do crescimento do clone recombinante A140 em frascos agitados a 180 rpm com meio YPD a 30°C por 80 horas.

4.6 Purificação e análise eletroforética da proinsulina A140

A proinsulina A1 produzida e secretada pelo clone recombinante A140 de *P. pastoris* foi concentrada por precipitação com TCA e analisada por SDS - PAGE 15%, sendo que o resultado está mostrado na figura 22. Pode-se observar que a proinsulina secretada pode ser identificada como uma única banda, de tamanho um pouco menor que 10kDa (Figura 22, poços 2, 3 e 4). É possível que essa banda corresponda a proinsulina ainda não processada contendo ainda a região espaçadora (EEAEAEAEPK) e a mini cadeia C (AAK) e tenha massa molecular de 7,5 kDa. Em decorrência do exposto pode-se interpretar que a protease Kex2 clivou o sítio (KR), porém a região correspondente a mini cadeia C (AAK) não foi clivada. Esse resultado corrobora com Gurramkonda1 et al. (2010) que relataram a expressão da insulina em *Pichia pastoris* utilizando o vetor pPICZ α com o tamanho predito de 63 aminoácidos e com massa molecular de cerca de 7,5 kDa.

Comparando-se a intensidade da banda correspondente a proinsulina recombinante obtida após 48h (poço 3) e 72h (poço 4) de cultivo, não se observa aumento na quantidade de proteína recombinante. Estes dados corroboram os resultados apresentados na figura 21, onde não se observa aumento da biomassa e nem de insulina recombinante com adição de glicose após 48h de cultivo.

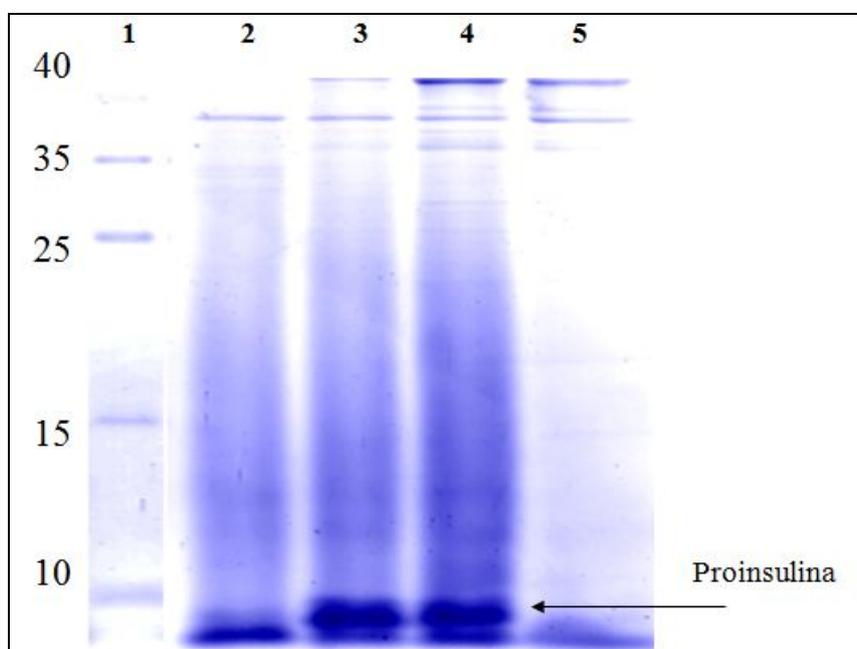


Figura 22. Perfil eletroforético de SDS-PAGE 15% das proteínas secretadas por *P. pastoris*. 1 - Marcador de massa molecular. 2, 3 e 4 amostras dos sobrenadantes do clone A1-40 de *P. pastoris* após 24, 48 e 72 horas de cultivo, respectivamente. 5 - Controle negativo *P. pastoris* não transformada geneticamente após 72 horas de cultivo.

Para purificação parcial da proinsulina, o conteúdo extracelular de 15 mL de cultura do clone recombinante A140 de *P. pastoris*, após 72 horas de cultivo foi concentrado por ultrafiltração em Amicon (corte 3 kDa) e o material foi aplicado em coluna de cromatografia de filtração molecular (Superdex-75), estando o resultado mostrado na figura 23.

O perfil cromatográfico revelou 5 picos majoritários como demonstrado na figura 23-A. Embora a eluição tenha resultado em um grande pico da proteína, ladeado por quatro outros menores, apenas as proteínas eluídas nas frações 8, 9, 12 e 13 apresentaram atividade no imunoenensaio utilizando anticorpo anti-insulina (figura 23-B).

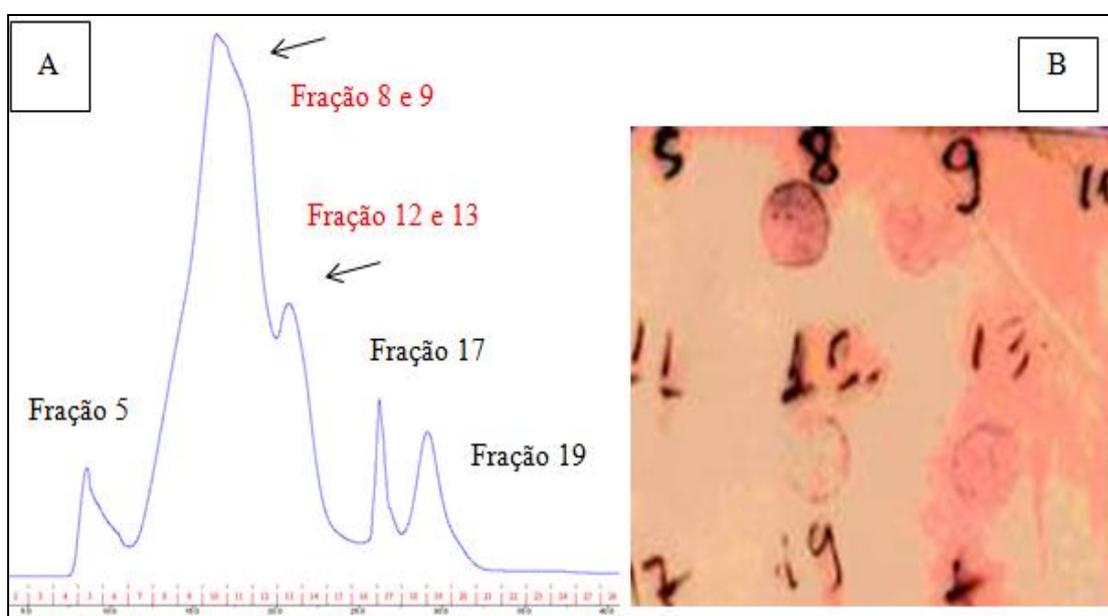


Figura 23. **A** - Perfil cromatográfico de exclusão molecular (coluna Superdex-75) do sobrenadante da cultura do clone recombinante A140 de *P. pastoris*. **B** - Reação de imunodeteção (imuno dot) para a confirmação da presença da proteína recombinante nas frações coletadas, as frações destacadas em vermelho (8, 9, 12 e 13) mostraram-se antigenicamente positivas.

Segundo Cregg et al. (1993) proteínas heterólogas expressas em *P. pastoris* podem ser produzidas em grandes quantidades, tanto intracelularmente quanto secretadas no meio de cultura. Devido ao fato desta levedura secretar poucas proteínas nativas a purificação de proteínas heterólogas a partir do sobrenadante da cultura é facilitada.

Na figura 24 que se refere a análise eletroforética da fração 8 do processo cromatográfico, pode-se observar na canaleta 2 uma banda preponderante com massa molecular um pouco menor que 10 kDa e que a análise das proteínas secretadas pela *P. pastoris* não transformada geneticamente (canaleta 3) mostra apenas algumas proteínas secretadas em pequena quantidade, o que é compatível com o descrito por Cregg et al. (1993); Cereghino & Cregg, (2000); Mattanovich et al. (2009). Na figura 25 que mostra os resultados da fração 8 por *Western-blotting* é possível detectar-se uma banda também com massa um pouco menor que 10kDa, imunoreativa com anticorpo anti-insulina, indicando que a banda intensa corada por prata detectada no gel da figura 24 é a proinsulina A140.

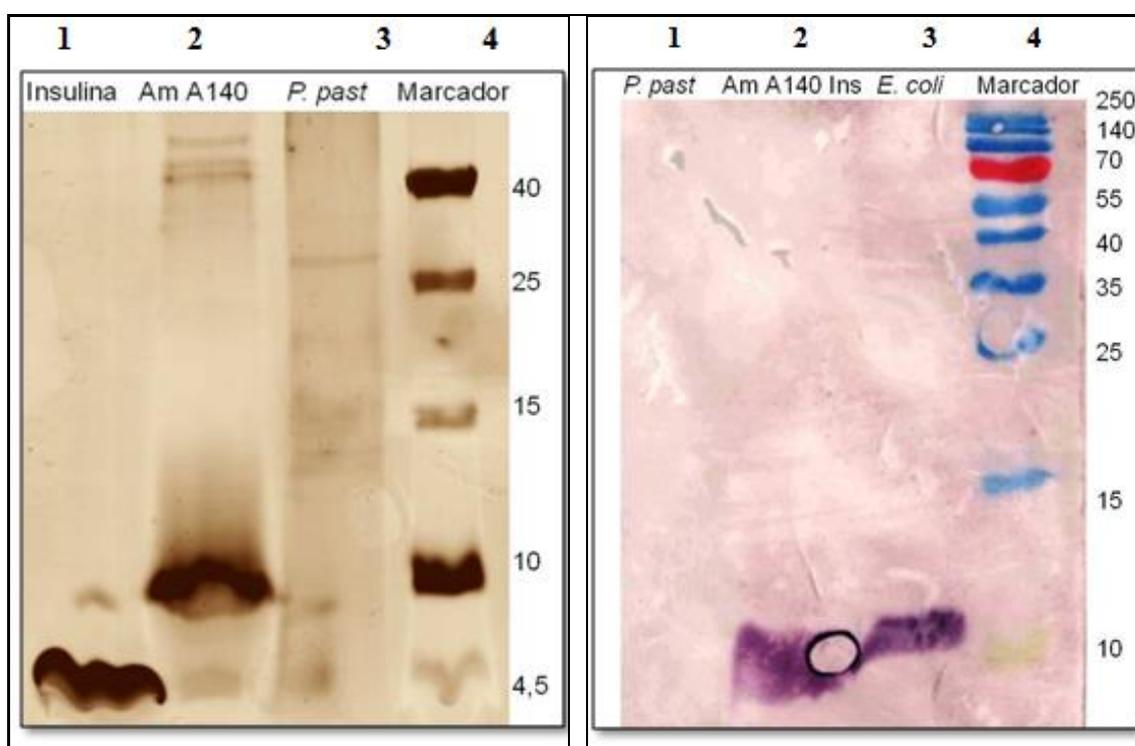


Figura 25. Perfil eletroforético em gel SDS-TRICINE-PAGE 17% corado com prata. 1 - controle positivo insulina comercial (5kDa), 2 - Fração 8 do clone A140, 3 - controle negativo *P. pastoris* não transformada geneticamente. 4- Marcador de massa molecular.

Figura 24. Análise por *Western-blotting*. 1- Controle negativo *P. pastoris* não transformada geneticamente. 2 - clone A140 com proinsulina expressa em *P. pastoris* (fração 8), 3 - Proinsulina fusionada a $(His)_6$ Tag expressa em *E. coli*. 4 - marcador de massa molecular.

Para a conversão da mini-proinsulina A140 em insulina, será necessário seguir o procedimento descrito por Gurramkonda et al. (2010) ou seja transformar a miniproinsulina em pré-insulina por transpeptidação enzimática com tripsina e O-T-butyl - l-treonina. Durante essa reação a região espaçadora (EEAEAEAEPAK) inicial e a mini-cadeia C (AAK) são clivadas e um grupamento treonina ester é adicionado a cadeia B na posição B29, em uma reação de transesterificação. A insulina é obtida então submetendo a pre-insulina em reação de desbloqueio do grupo butil terciário por tratamento com ácido trifluoracético resultando na insulina com a treonina na posição B30.

Esses resultados no que se refere ao tamanho da proinsulina recombinante A140 está de acordo com o resultado obtido por Gurramkonda et al. (2010) que expressou a mesma construção genética em *P. pastoris* sob o controle do promotor AOX1, e que mostra que a proinsulina produzida não é processada em insulina durante o processo de secreção resultando em um polipeptídeo de 63 aminoácidos e massa molecular na ordem de 7,5 KDa e que migra em eletroforese Tricina SDS-PAGE um pouco mais veloz que a banda de 10KDa do marcador de massa molecular. A secreção de proinsulina A140 com tamanho predito de cerca de 7,5 kDa, mostra que as enzimas *trypsin like* situadas na via de secreção (retículo endoplasmático rugoso e Golgi) dessa levedura não foram capazes de clivar a sequencia da minicadeia C (AAK).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam um bom nível de expressão da proteína recombinante *downstream* ao promotor do gene codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (pPGK1). Vários estudos utilizando *P. pastoris* demonstram que o uso de promotor PGK é expresso de forma constitutiva em presença de glicose. Tal expressão ocorre em altos níveis, comparáveis aos observados para o promotor AOX1. Segundo Cereghino; Cregg, (2000) a atividade do PGAP em glicerol e metanol é aproximadamente 2/3 e 1/3 da observada em presença de glicose, respectivamente. A vantagem da utilização do PGK se dá, principalmente, por não haver necessidade de indução com metanol, além de também não haver a necessidade de mudar a cultura de um meio para o outro, para induzir a expressão, resultando em menor manipulação das células.

4.6 Otimização da produção da insulina em levedura através de planejamento estatístico experimental

O objetivo desta fase do trabalho foi melhorar a produção de proinsulina com a aplicação de um planejamento fatorial fracionado ($2^{6-1} = 36$ ensaios). Este tipo de planejamento calcula os efeitos principais e dá indicações das variáveis que devem ser incluídas no planejamento seguinte e as novas faixas que devem ser estudadas para cada variável, cuja influência é significativa para a produção de proinsulina.

Para dar início ao processo de melhoramento da produção de proinsulina por *P. pastoris* recombinante (clone A140) levou-se em consideração o conjunto de dados obtidos nos ensaios anteriores, melhor meio (YPD), tempo de exaustão de glicose (24 horas), produção de biomassa (41 g/L) e tempo de crescimento celular (72 horas).

Para realizar o planejamento fracionado (2^{6-1}) selecionou-se as seguintes condições: concentração de dextrose (1,5 a 7,5%), extrato de levedura (0,5 a 2%), peptona (1 a 3%), temperatura (25 a 35 °C) e pH (3,5 a 7,5)

A partir dos resultados do planejamento experimental foi possível realizar a análise de variância (ANOVA) para a produção de proinsulina a partir do planejamento proposto que está apresentada na Tabela 2 em anexos. Analisando os dados por ANOVA, observa-se que os efeitos principais influenciaram estatisticamente a resposta de produção de insulina em 72 horas ($p < 0,01$). Os fatores nos níveis avaliados não apresentaram significância individualmente, apenas as interações entre as variáveis influenciam a produção de proinsulina ($p < \text{level } 0,001$). O modelo estatístico mostrou-se adequado aos resultados experimentais da produção da proinsulina com R quadrado (0,8179) e valor de p ($5,39e-07$). Os valores dos efeitos das variáveis e suas interações sobre a resposta analisada estão detalhados na tabela 01 em anexos.

A partir dos resultados observados na tabela 13, notou-se que uma combinação de 0,5 % de peptona e 2 % de extrato de levedura apresentou maior produção de proinsulina no ensaio 10 e 27 respectivamente 0,60g/L e 0,69 g/L. Este resultado relaciona - se sobretudo ao fato de que as maiores produções de proinsulina ocorreram onde houve menor concentração de peptona. Observou-se também que a dextrose não apresentou efeito significativo na produção de proinsulina na concentração de 1% e nem para concentrações mais elevadas (superiores a 3%), confirmando a necessidade de ampliar a faixa no experimento posterior.

A tabela 12 a seguir apresenta as variáveis e a resposta analisada (produção de proinsulina) do clone A140 em 48 e 72 horas de cultivo.

Tabela 12. Matriz do planejamento experimental fracionado (2^{6-1}), com valores reais e resultados da produção de proinsulina no clone A140.

Ensaio	Dextrose(x1)	peptona(x2)	ext lev(x3)	pH(x4)	temp(x5)	Inoc (x6)	48	72
1	3,0	2,5	5	3,5	25	15,00	0,39	0,41
2	3,0	5,0	20	7,5	25	45,00	0,47	0,57
3	1,0	2,5	5	7,5	25	45,00	0,40	0,44
4	3,0	2,5	20	7,5	25	15,00	0,53	0,50
5	1,0	2,5	20	7,5	25	45,00	0,51	0,58
6	3,0	5,0	20	3,5	25	15,00	0,57	0,58
7	1,0	2,5	5	3,5	25	15,00	0,34	0,37
8	1,0	5,0	5	3,5	25	45,00	0,36	0,51
9	1,0	5,0	5	7,5	25	45,00	0,45	0,53
10	1,0	5,0	20	3,5	25	15,00	0,61	0,55
11	3,0	5,0	5	3,5	25	15,00	0,32	0,50
12	3,0	2,5	20	3,5	25	45,00	0,51	0,41
13	1,0	5,0	20	7,5	25	15,00	0,44	0,58
14	1,0	2,5	20	3,5	25	45,00	0,53	0,56
15	3,0	2,5	5	7,5	25	45,00	0,33	0,54
16	3,0	5,0	5	7,5	25	15,00	0,43	0,61
17	1,0	2,5	5	7,5	35	45,00	0,36	0,39
18	1,0	2,5	5	3,5	35	15,00	0,50	0,61
19	3,0	2,5	5	7,5	35	15,00	0,39	0,54
20	1,0	5,0	20	7,5	35	45,00	0,40	0,56
21	3,0	5,0	20	7,5	35	15,00	0,45	0,65
22	3,0	5,0	5	7,5	35	45,00	0,52	0,53
23	1,0	5,0	5	3,5	35	45,00	0,32	0,52
24	3,0	2,5	20	3,5	35	15,00	0,39	0,55
25	3,0	2,5	20	7,5	35	15,00	0,33	0,48
26	1,0	5,0	5	7,5	35	45,00	0,38	0,59
27	3,0	5,0	20	3,5	35	45,00	0,47	0,69
28	1,0	5,0	20	3,5	35	15,00	0,44	0,61
29	3,0	2,5	5	3,5	35	45,00	0,52	0,66
30	3,0	5,0	5	3,5	35	15,00	0,37	0,57
31	1,0	2,5	20	3,5	35	15,00	0,42	0,50
32	1,0	2,5	20	7,5	35	45,00	0,44	0,61
33	2,0	1,5	12,5	5,5	30	30,00	0,43	0,50
34	2,0	1,5	12,5	5,5	30	30,00	0,44	0,47
35	2,0	1,5	12,5	5,5	30	30,00	0,41	0,34
36	2,0	1,5	12,5	5,5	30	30,00	0,46	0,37

Dando prosseguimento ao melhoramento da produção de proinsulina foi conduzido um delineamento composto central, com 4 variáveis e com 5 combinações para cada variável, a fim de se visualizar condições ótimas da produção de proinsulina, optou-se pelas seguintes condições: dextrose, pH, temperatura e peptona.

Assim realizou-se o planejamento experimental (2^4+8 axiais+ 6PC) total 30 ensaios, com os seguintes fatores e faixas ajustadas: reduziu-se a concentração de peptona de 1,75 a 6% para 1,25 a 5%, restringiu-se a temperatura de 25 a 35 °C para 17,5 a 27,5 °C e aumentou-se a concentração de dextrose de 1,0 a 3,0 % para 1,5 a 7,5% e por fim ampliou-se a faixa de pH de 3,5 a 7,5 para 3,0 a 9,0. O resultado do planejamento experimental foi utilizado para realizar a análise de variância (ANOVA), (tabela 3 e 4 em anexos), na qual pode-se observar que os efeitos principais influenciaram estatisticamente a resposta de produção de insulina em 48 e 72 horas ($p < 0,001$).

Os fatores nos níveis avaliados pH e peptona apresentaram significância individualmente e nas interações influenciando no aumento da produção de proinsulina ($p < 0,001$). O modelo estatístico mostrou-se adequado aos resultados experimentais da produção da proinsulina com R quadrado (0,668) e valor de p ($7,76e-12$), (valores detalhados na tabela 04 em anexos).

Os resultados das variáveis, nas faixas testadas com valores reais da produção de insulina em g/L estão mostrados na tabela 14.

A maior produção de proinsulina (0,8g/L) pelo clone A140 corresponde ao ensaio 14 nas seguintes condições experimentais: 72h de cultivo concentração de peptona de 5,0 g/L e extrato de levedura de 10 g/L, sob as condições de pH 7,5 e 25 °C.

Observou-se que a dextrose neste planejamento não apresentou efeito significativo na produção de proinsulina na concentração de 3% e, nem para concentrações de 6%.

Dentre as quatro variáveis estudadas, peptona e o pH foram estatisticamente significativas ($p < 0,001$). A variável temperatura e dextrose não apresentaram efeito significativo na produção de proinsulina. Houve diferença significativa em ambos períodos de tempo 48 e 72 horas (tabela 03 em anexo).

Os fatores peptona e pH apresentaram significância individual e também por interações peptona*pH. As tabelas 3 e 4 geradas pela análise estatística que detalham os valores da probabilidade (P) para a relação dos fatores com a variável resposta, encontram-se em Anexo1.

Pode-se determinar diferenças significativas entre as variáveis sobre a produção de proinsulina para determinar os parâmetros para o próximo experimento visando melhorar a produção de proinsulina.

Tabela 13. Matriz do experimento 2 (2^4+8 axiais+ 6PC) com um total de 30 ensaios mostrando as variáveis com os valores reais e resultados da produção da proinsulina (g/L) em 48 e 72 horas.

Ensaio	Dextrose (x1)	Peptona (x2)	pH (x3)	T°C (X4)	48h g/L	72h g/L
1	3,0	5,0	4,5	20,0	0,229	0,397
2	6,0	5,0	4,5	20,0	0,250	0,346
3	3,0	3,0	4,5	20,0	0,169	0,163
4	6,0	3,0	4,5	20,0	0,141	0,194
5	3,0	5,0	7,5	20,0	0,691	0,758
6	6,0	5,0	7,5	20,0	0,767	0,756
7	3,0	3,0	7,5	20,0	0,562	0,381
8	6,0	3,0	7,5	20,0	0,593	0,545
9	3,0	5,0	4,5	25,0	0,558	0,488
10	6,0	5,0	4,5	25,0	0,644	0,781
11	3,0	3,0	4,5	25,0	0,351	0,371
12	6,0	3,0	4,5	25,0	0,295	0,224
13	3,0	5,0	7,5	25,0	0,697	0,761
14	6,0	5,0	7,5	25,0	0,709	0,792
15	3,0	3,0	7,5	25,0	0,244	0,268
16	6,0	3,0	7,5	25,0	0,297	0,263
17	1,5	1,75	6,0	22,5	0,722	0,643
18	7,5	1,75	6,0	22,5	0,796	0,559
19	4,5	2,5	6,0	22,5	0,309	0,605
20	4,5	4,25	6,0	22,5	0,359	0,665
21	4,5	1,75	3,0	22,5	0,127	0,261
22	4,5	1,75	9,0	22,5	0,285	0,290
23	4,5	1,75	6,0	17,5	0,313	0,373
24	4,5	1,75	6,0	27,5	0,683	0,718
25	4,5	1,75	6,0	22,5	0,625	0,764
26	4,5	1,75	6,0	22,5	0,541	0,572
27	4,5	1,75	6,0	22,5	0,572	0,480
28	4,5	1,75	6,0	22,5	0,514	0,669
29	4,5	1,75	6,0	22,5	0,573	0,706
30	4,5	1,75	6,0	22,5	0,545	0,614

A partir dos dados da tabela 13 foram gerados os gráficos de superfície de resposta para a produção de proinsulina pelo clone A140 de *P. pastoris*.

A figura 26 mostra o gráfico de superfície de resposta para a produção pelo clone recombinante A140 em função da concentração de (x2) peptona e (x1) dextrose.

Pode-se observar a influência da peptona na produção da insulina, pois quando a fonte de nitrogênio está a um nível inferior ocorre o aumento da produção da insulina e em decorrência desse aumento, reduziu-se a concentração de peptona, de 1,75 a 5,0 para 0,15 a 1,8 % no planejamento seguinte.

A maior produção de proinsulina (0,8 g/L) ocorreu no ensaio 14 no qual se utilizou uma concentração de peptona de 5 g/L e extrato de levedura de 10 g/L, sob as condições de pH 7,5 e 25 °C em 72h de crescimento do clone recombinante A140.

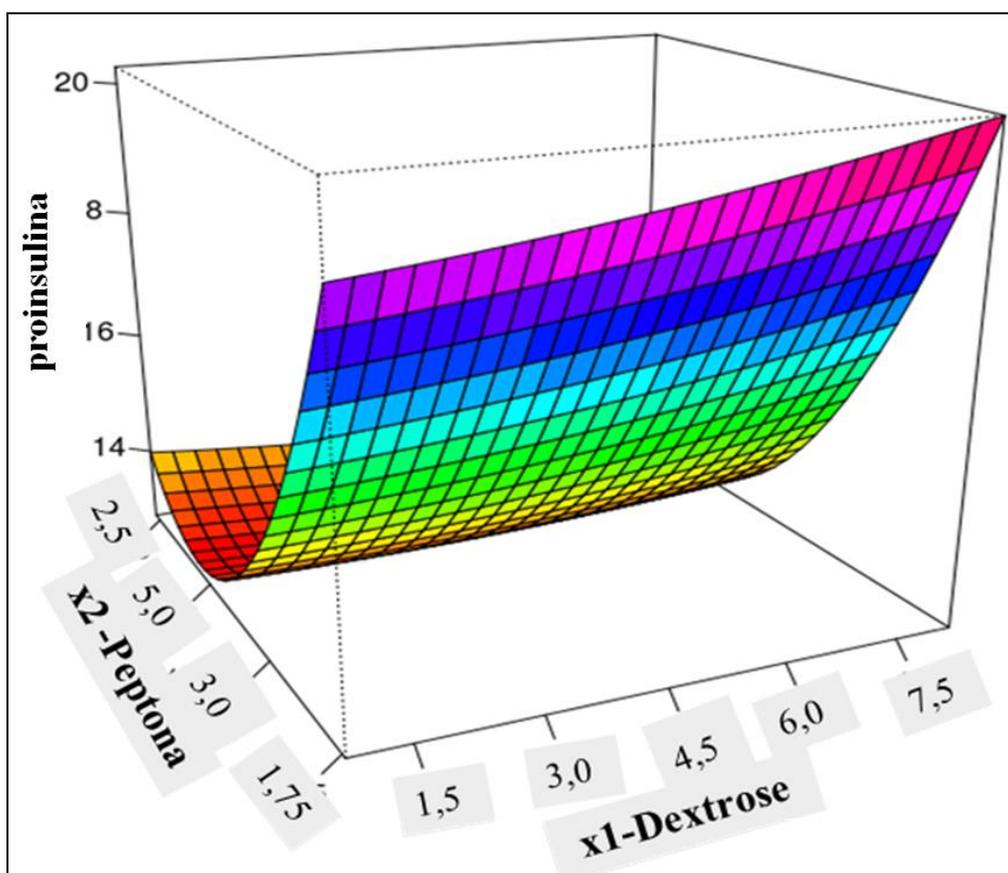


Figura 26. Superfície de resposta para a produção de proinsulina em *P. pastoris* (a) em função da concentração de x2-peptona e x1-Dextrose.

Com relação ao pH, a superfície de resposta apresentada na figura 27 mostra a produção de insulina em *P. pastoris* em função da concentração de (x2) peptona e (x3) pH. Podemos constatar que o pH tem um efeito importante, pois a maior produção de insulina (0,8 g/L) ocorreu sob as condições de pH 7,5. O trabalho de Soyaslan e Calik, (2011) apresentou a expressão maior em pH 7,0 e 8,0, provavelmente porque esta faixa de pH é que confere as melhores condições metabólicas para expressão e excreção do proinsulina e maior estabilidade da proteína no meio de cultivo.

Segundo Cregg et al (1993) a eficiência de expressão e secreção destas proteínas estão altamente relacionadas ao pH do meio. Os autores relatam também que o melhor pH do meio de cultura para expressão de proteínas recombinantes por *P. pastoris*, pode variar na faixa de pH de 3,0 a 7,0. Neste estudo a menor produção de proinsulina (0,1 g/L) ocorreu sob as condições de pH 3,0.

Chiruvol et al. (1998) relatam que uma das formas de minimizar a degradação proteolítica é alterar o pH da fase de crescimento de 5,0-6,0 para valores próximo a 3,0. Neste trabalho na expressão da proinsulina, quanto mais ácido o pH, menor foi a expressão, pois segundo Scorer et al. (1993) nas condições mais ácidas de pH 3,0-4,0, pode ocorrer a inativação de proteínas importantes para as rotas de transcrição, processamentos pós-traducionais, clivagem do peptídeo sinal e excreção da proinsulina pela *P. pastoris*.

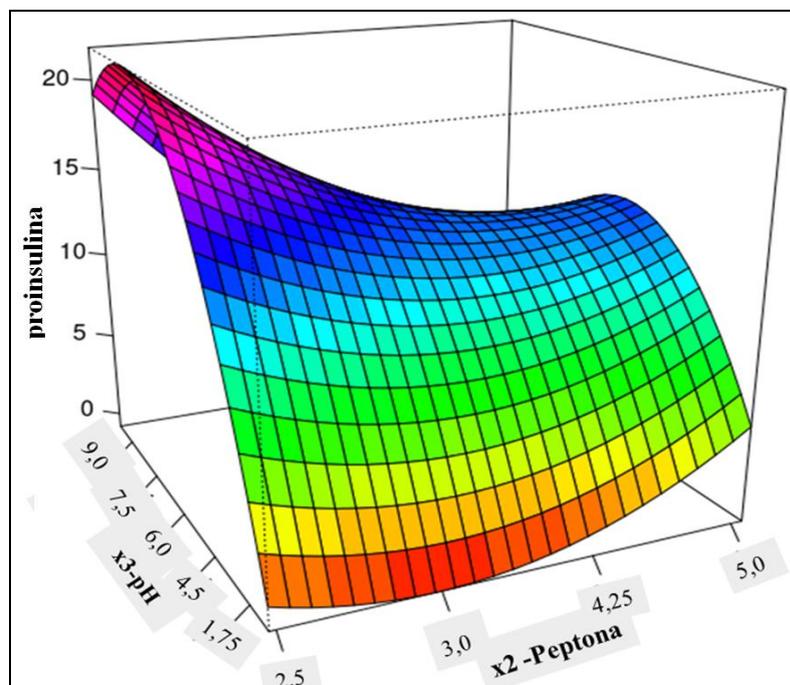


Figura 27. Superfície de resposta para a produção de insulina em *P. pastoris* em função da concentração de x2-peptona e x3-pH.

A escolha do pH do meio deve ser avaliada individualmente levando em consideração a cepa utilizada e a estabilidade da proteína produzida. Chandrasekhar et al. (2010) relatam a produção e secreção em alto nível do precursor de proinsulina usando *P. pastoris*, com subsequente purificação e conversão para a proinsulina humana com cerca de aproximadamente 3 g/L de proteína secretada no meio de cultura com o pH entre 5 e 6. Com base nestes resultados, no planejamento fatorial 3 ampliamos a faixa de pH 3,6 a 10,7. Quando usou-se pH menor que 3,6 houve turvação do meio de cultivo, provavelmente por precipitação de nutrientes.

Na figura 28 é mostrado o gráfico de superfície de resposta para a produção de proinsulina por *P. pastoris* em função de (x3) - pH e (x4) - temperatura. Observou-se que a temperatura apresentou efeito significativo sobre a produção de proinsulina.

Assim, para a próxima fase de avaliação utilizou-se as variáveis dextrose, peptona e pH, a variável temperatura com níveis fixados em 25 °C.

De acordo com os estudos (LIN et al., 2007; WOO et al., 2002; LARENTIS et al., 2004; CAI et al., 2009; HOLMES et al., 2009; WAN et al., 2008; AIZEMBERG et al., 2011; SOYASLAN & CALIK, 2011; MAENG et al., 2012; HU et al., 2006; CALIK et al., 2010; DAMASCENO et al., 2004) não há uma condição de pH ótimo para a expressão de diferentes proteínas recombinantes em cultivos de *P. pastoris*, uma vez que há grande variação de melhor pH para fase de crescimento, indução e expressão.

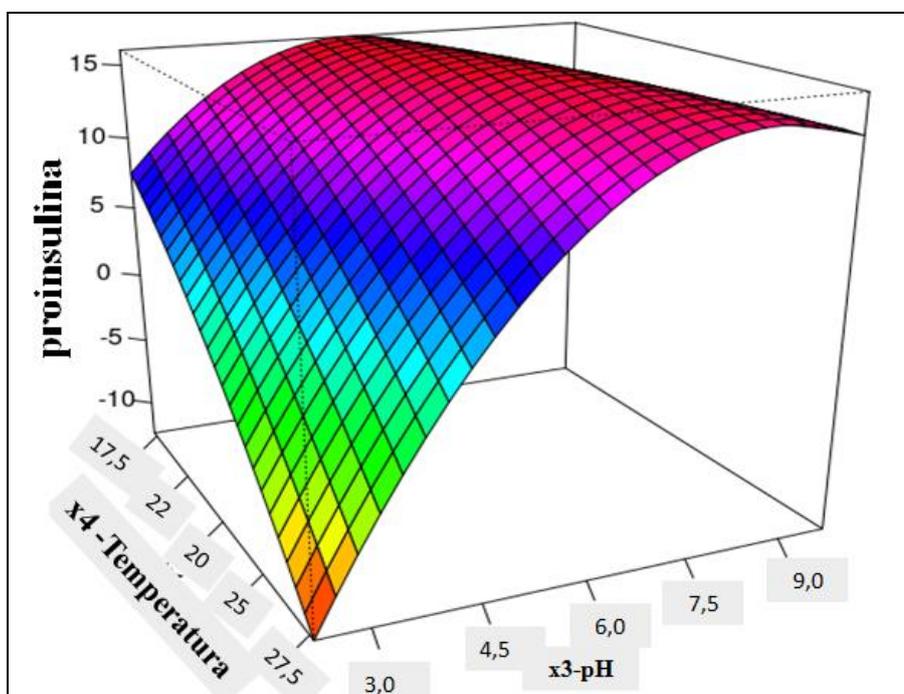


Figura 28. Superfície de resposta para a produção de proinsulina em *P. pastoris* em função de x3-pH e x4-temperatura

Dando sequência ao melhoramento da produção de proinsulina realizou-se o planejamento experimental (2^3) com (8 axiais + 6 Pontos Centrais) total 20 ensaios.

Para verificar as interações entre os fatores pH, peptona e dextrose novas faixas foram ajustadas, reduzindo a concentração de peptona de 1,75 a 5% para 0,5 a 1,5%, e aumentando a concentração de dextrose de 3 a 6 % para 5 a 10%, e ampliando a faixa de pH de 4,5 a 7,5 para 5 a 9. A partir dos resultados obtidos por meio dos ensaios no planejamento experimental (2^3) a análise de variância apresentou R quadrado de 0.8671 e valor de p $3.958e-10$ mostrados na Tabela 6 em anexos. Pode se observar que o fator peptona apresentou efeito significativo ($p < \text{level } 0,001$) no processo de produção de proinsulina individualmente e nas interações.

As variáveis, nas faixas testadas com valores reais e os resultados da produção de proinsulina em g/L estão mostrado na tabela 14, onde pode se observar que a produção de proinsulina ($\sim 0,83\text{g/L}$) em 72 horas corresponde ao ensaio nas seguintes condições, concentração de peptona de 0,15 %, extrato de levedura de 10 g/L, sob as condições de pH 7,0 e 25 °C. Houve diferença significativa somente no período de 72 horas ($p < \text{level } 5.272e-13$) tabela 06 da Anova em anexo.

Tabela 14. Matriz do planejamento experimental 3 com valores reais e resultados planejamento (2^3) com (8 axiais + 6PC) total 20 ensaios.

Ensaio	Dextrose % x1	Peptona % x2	PH x3	48horas g/L	72horas* g/L
1	5,00	0,50	5,00	0,127	0,548
2	10,00	0,50	5,00	0,176	0,698
3	5,00	1,50	5,00	0,103	0,285
4	10,00	1,50	5,00	0,113	0,256
5	5,00	0,50	9,00	0,187	0,698
6	10,00	0,50	9,00	0,149	0,529
7	5,00	1,50	9,00	0,139	0,409
8	10,00	1,50	9,00	0,154	0,311
9	3,30	1,00	7,00	0,147	0,708
10	11,70	1,00	7,00	0,192	0,736
11	7,50	0,15	7,00	0,284	0,827
12	7,50	1,84	7,00	0,256	0,442
13	7,50	1,00	3,63	0,138	0,266
14	7,50	1,00	10,36	0,125	0,363
15	7,50	1,00	7,00	0,204	0,635
16	7,50	1,00	7,00	0,246	0,614
17	7,50	1,00	7,00	0,127	0,654
18	7,50	1,00	7,00	0,127	0,631
19	7,50	1,00	7,00	0,194	0,616
20	7,50	1,00	7,00	0,194	0,603

A figura 29 mostra o gráfico de superfície de resposta para a produção de proinsulina em *P. pastoris* em função de (x1) dextrose e (x2) peptona. O efeito da concentração de peptona sobre a produção da proinsulina ocorre quando a fonte de nitrogênio está ao nível inferior.

E com relação ao pH de acordo com o gráfico de superfície de resposta (figura 28) a maior produção ocorreu em condições de pH de 7,0. A faixa de pH dos pontos axiais (3,63 e 10,36) pode estar relacionado a um estresse ácido que a levedura sofreu nesta faixa de pH. O estudo realizado por Shi et al. (2003) que avaliaram a atividade de proteases presentes no sobrenadante do cultivo de *P. pastoris*, e identificaram as proteínas proteolíticas do tipo asparato (pH 3,5-4,5), cisteíno (5,5-7,0) e serino-proteases (pH 10,0), corrobora com este trabalho, pois obtiveram maior crescimento em pH 7,0 e menor nível de expressão em pH 3,5 e 5,0, e maior produção em pH 7,0-9,0

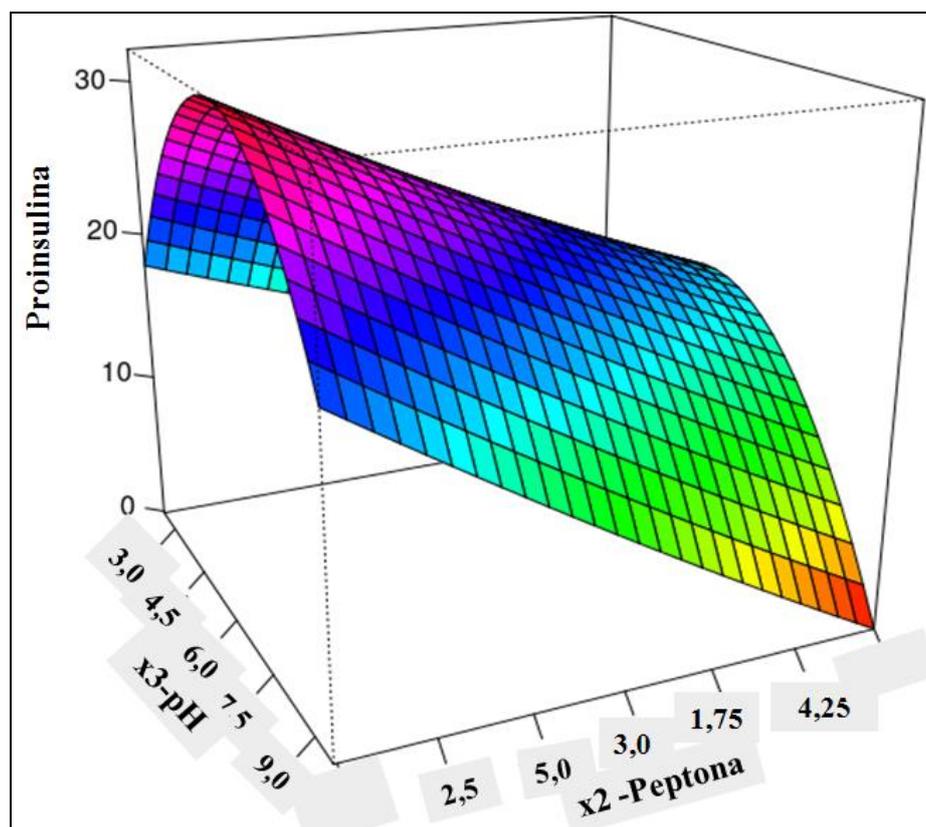


Figura 29. Superfície de resposta para a produção de proinsulina em *P. pastoris* em função de x1 (dextrose) e x2 (peptona).

Na figura 30 podemos observar o gráfico da superfície de resposta para a produção de proinsulina em *P. pastoris* em função de (x2) peptona e (x3) pH. Pode-se verificar que o efeito da concentração de peptona ocorre claramente quando em concentrações muito baixas, cerca de 0,15%. A dextrose varia na faixa de 3,3 a 11,7 e em toda a faixa a produção é constante, ou seja não exerce efeito significativo no processo, nas condições testadas. Segundo Macauley-Patrick et al. (2005), o aumento nas concentrações de nitrogênio e peptona no meio de cultivo podem prolongar a fase *lag* (fase de adaptação metabólica ao novo ambiente) e assim inibir o crescimento celular, especialmente nas concentrações iguais ou acima de 20 g/L. Kalil et al. (2000) afirmam em seus estudos que quando o meio de cultura contem na sua composição como fonte de nitrogênio 10g/L de extrato de levedura, a produção da proteína foi superior a 0,075g/L e que a concentração de peptona e baixa no nível de 1,68g/L a atividade permanece com 0,075g/L.

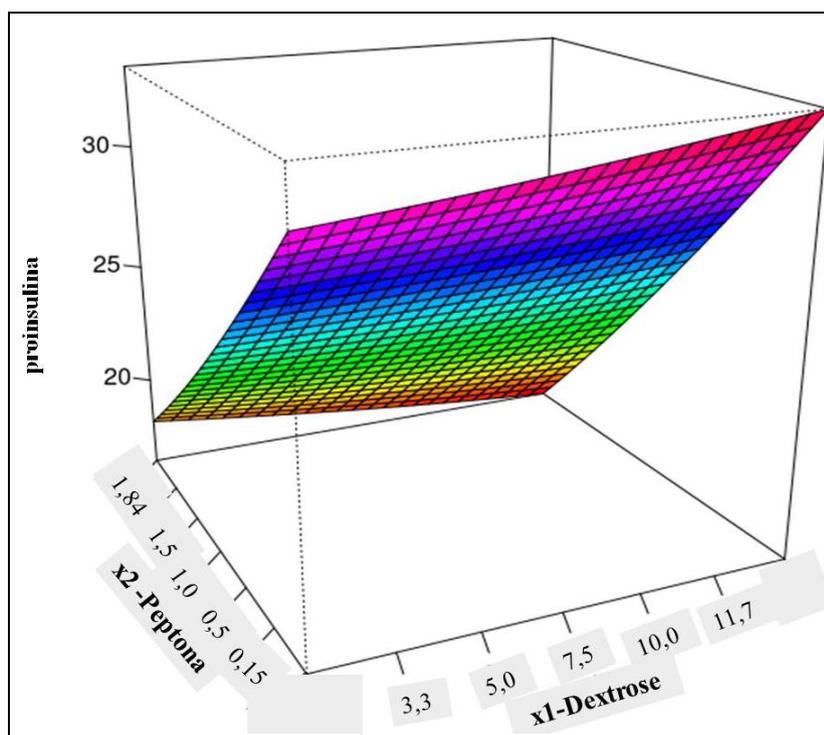


Figura 30. Superfície de resposta para a produção de proinsulina em *P. pastoris* em função de x2 (peptona) e x3 (pH).

Após a realização dos três planejamentos houve um substancial acréscimo na produção de proinsulina. O aumento passou de 0,065g/mL para 0,83g/mL de proinsulina com a biomassa de (50g/L) do clone recombinante A140 de *P. pastoris*, nas condições de concentração da fonte de carbono (7,5% de dextrose), concentração das fontes de nitrogênio (peptona 0,15%), temperatura 26 °C e tempo de 72 horas.

A figura 31 representa a média geral da produtividade do clone A140 (proinsulina (g/L)/biomassa (g/L)), onde pode-se observar que houve aumento na média da produtividade (produção de biomassa/produção de insulina) do clone A140. Segundo Cos et al (2006), a otimização da expressão de proteínas heterólogas, que consiste em maximizar a produtividade, depende de diferentes fatores como: promotor, meios de cultura e estratégias operacionais (MACAULEY-PATRICK, et al., 2005).

O clone A140 mostrou produção significativa no nível de produção no período de 48 e 72 horas, entretanto nessa média da produtividade observou-se que os três planejamentos destacaram-se em 72 horas. A utilização de nutrientes determinantes como fontes de carbono e nitrogênio, a variação na quantidade destas substâncias no meio de cultura e os ajustes na faixa de pH e temperatura demonstraram como a influência destes fatores elevaram a produção de proinsulina de 0,065 para 0,83 g/L; pois de acordo com Macauley-Patrick et al. (2005); Ya-kun & Shi-ping, (2004) esses fatores utilizados podem afetar consideravelmente a produtividade da proteína heteróloga.

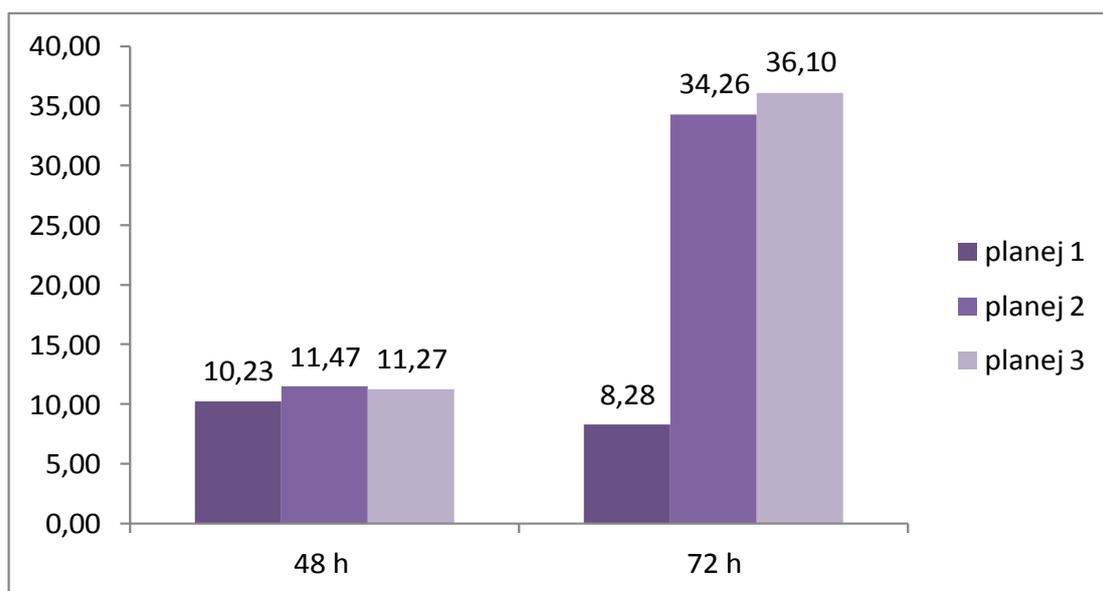


Figura 31. Gráfico de média da produtividade do clone A140.

Os resultados apresentados nesse trabalho alcançaram níveis de produção de proinsulina equivalentes ou superior aos alcançados nos estudos de Mansur et al. (2005); Pais-Chanfrau et al. (2004); Pais, et al. (2006); Zhu et al. (2009). Um grande diferencial do nosso estudo e que deve ser ressaltado é que a produção de proinsulina ocorreu em menor período de tempo (72 horas) e menor produção celular de biomassa 80g/L.

Apesar dos resultados altamente promissores, reconhecemos que a condição ideal ainda não foi estabelecida, pois outros estudos conseguiram resultados expressivos, passando de 0,25g/L para 0,95g/L, pós-otimização (CHANDRASEKHAR, et al., 2010; HAI-FENG HANG et al., 2008) (Tabela 15). Testes adicionais devem ser realizados para se chegar as condições ótimas para produção de proinsulina. Todavia, estes resultados preliminares são animadores, pois os resultados obtidos estão dentro dos valores encontrados em trabalhos já descritos.

Observou-se também que houve um incremento na produção de proinsulina, ainda foi observado um crescimento celular elevado (80g/L), que contribuiu para maior eficiência e rendimento do sistema de expressão. Diversos estudos que abrangem a produção da proinsulina humana em levedura *Pichia pastoris* afirmam ser um sistema bastante eficiente (WANG et al., 2001; PAIS et al., 2003; PAIS-CHANFRAU et al., 2004; MANSUR et al., 2005; PAIS et al., 2006; XIE et al., 2008; HAI-FENG HANG et al., 2008; ZHU et al., 2009; CHANDRASEKHAR, et al., 2010).

Tabela 15. Resultado geral das análise de tempo, produção de proinsulina g/L e biomassa.

Tempo (horas)	Proinsulina g/L	Biomassa/L	Referência
136	0,25	109	Mansur et al., 2005
101	0,95	58	Hai-feng Hang et al., 2008
110	0,30	89	Pais-Chanfrau et al., 2004
72	0,22	80-90	Pais et al., 2006
87	1,50	87	Wang et al., 2001
72	3,60	--	Xie et al., 2008
96	0,18	--	Zhu et al., 2009
88	3,84	88	Chandrasekhar et al., 2010
96	0,130	--	Dayrom et al., 2011
48	0,30	50	Este trabalho
72	0,83	80	Este trabalho

4.7 Análise da expressão do gene da proinsulina em nível de transcrição

Nesta etapa do trabalho a análise da expressão do gene da proinsulina em nível de transcrição foi realizada quantificando-se o mRNA de proinsulina do clone recombinante de *P. pastoris* A140 em duas condições contrastantes de cultivo: de menor e maior produção de proinsulina conforme determinado no experimento de melhoramento multifatorial (planejamento experimental). As condições utilizadas foram: de maior 0,830g/L e de menor 0,250g/L produção de proinsulina, e as análises se processaram em células de cultura com 8, 10 e 12 horas de crescimento.

O RNA total extraído foi avaliado qualitativa e quantitativamente por espectrofotometria (*NanoDrop Spectrophotometer*). As concentrações variaram de 50 a 387 ng/ μ L para amostra A1, enquanto que para A2, foram de 25 a 257ng/ μ L de RNA total. As relações 260/280 e 260/230, que determinam a pureza do RNA, tiveram suas razões médias com valor 2, sendo portanto, consideradas satisfatórias. A integridade dos amplicons foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, estando o resultado mostrado na figura 32. Pode se observar que os cDNAs estão do tamanho esperado e íntegros, bem como a eficiência e especificidade dos primers nas concentrações de 0,1pmol, 0,05pmol e 0,075pmol (dados não mostrados). Uma vez determinada que a concentração de 0,075pmol apresentou melhor desempenho, com amplicons bem visíveis, essa condição foi adotada nos experimentos posteriores.

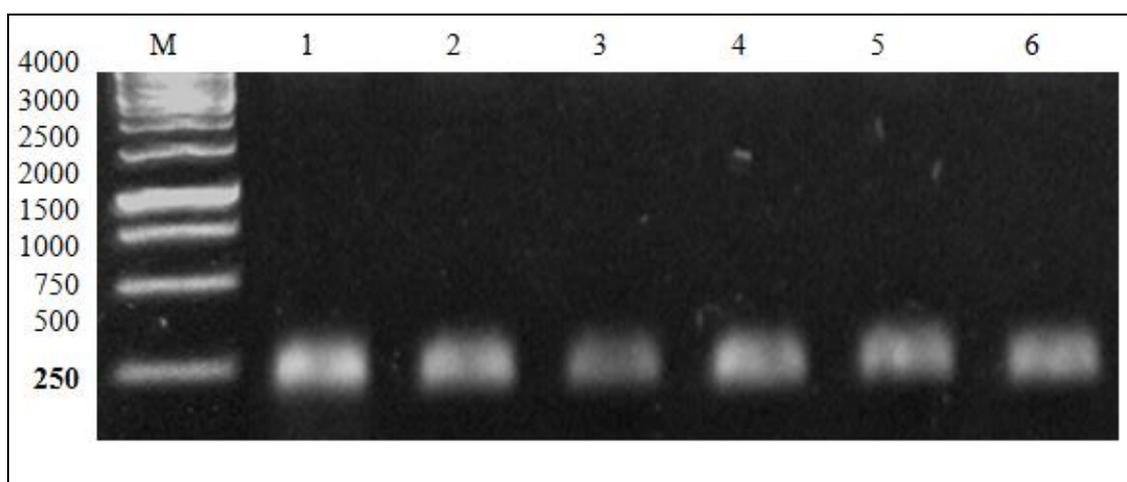


Figura 32. Perfil eletroforético dos amplicons de cDNA de proinsulina. As linhas de 1 a 6 mostram resultados da amplificação de cDNAs dos transcritos do gene da proinsulina em diferentes tempos de cultivo, amostras 1 e 2 (8 horas), 3 e 4 (10 horas) e 5 e 6 (12 horas) e Marcador de 1K ladder.

A qPCR monitorada por SYBR Green possibilitou a quantificação do mRNA da proinsulina com êxito para amostras 1 e 2 do clone A140. Em cada amostra, os valores médios e o desvio padrão de cada réplica foram analisados, sendo válidos os dados com desvio padrão inferior a 1 e valores médios de Ct menor que 28. A especificidade dos produtos amplificados foi analisada através das curvas de dissociação de cada amostra ($T_m = 78,44^\circ\text{C}$) (figura 33 A e B).

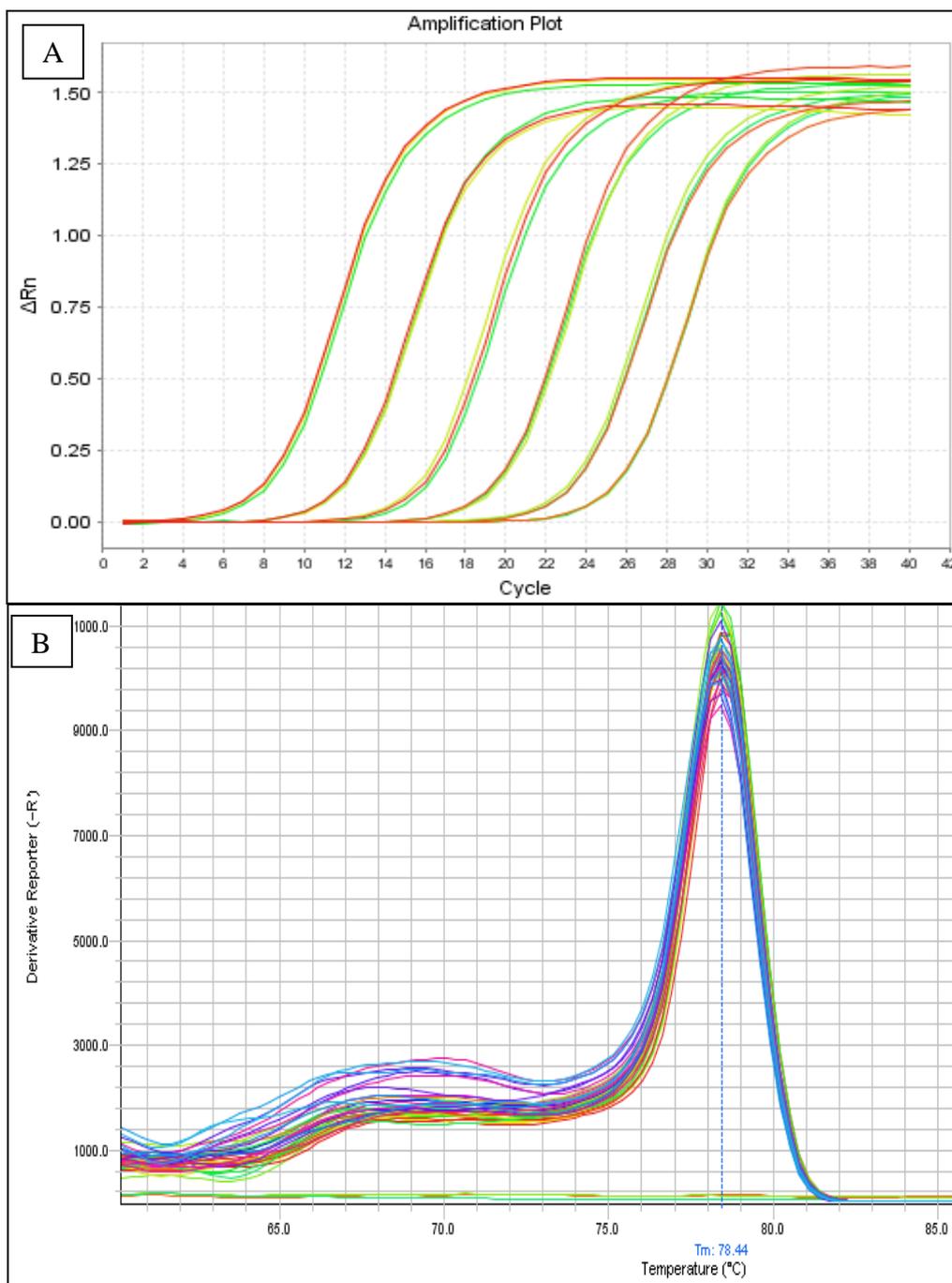


Figura 33. (A) Curva de amplificação e sua correspondente (B) curva de dissociação

Os resultados estão mostrados na figura 34 e 35, onde pode-se observar que as amostras de cDNA originárias da condição 1 (0,83g/L, maior produção de proinsulina) no tempo de crescimento de 12 horas, há maior quantidade de RNA mensageiro ou seja cerca de 72.000 cópias do cDNA enquanto na condição 2 (0,3g/L, menor produção de proinsulina) de cDNA da obtidas para os tempos de fermentação de 8 e 10 horas, o nível de expressão é menor cerca de 52.000 cópias de cDNA.

A comparação entre as amostras 1 e 2 referentes as condições de cultivo no tempo de 8 e 10 horas não revelou diferenças significativas, contudo é possível afirmar que houve diferença estatisticamente significativa para o tempo de 12h.

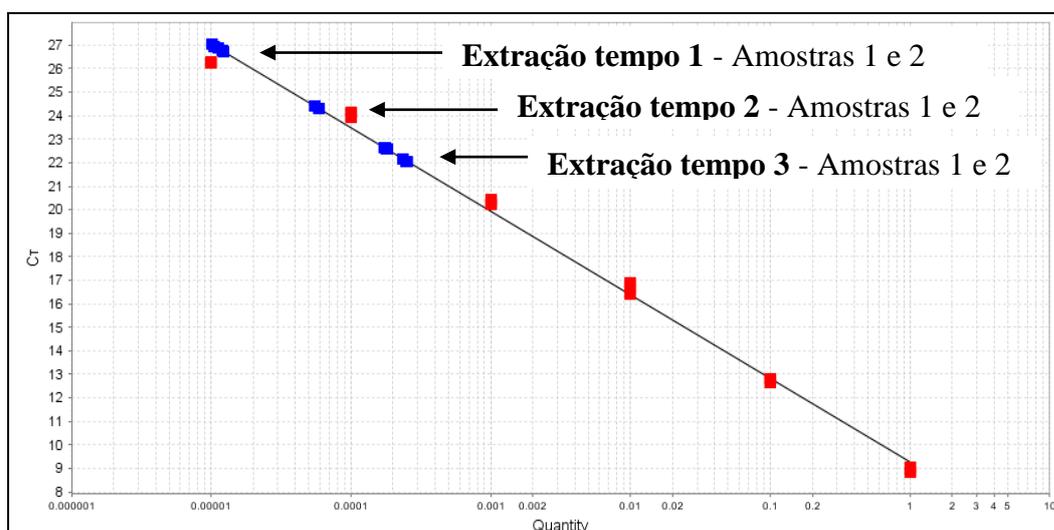


Figura 34. Concentração dos cDNAs diluídos no eixo das abscissas e o Ct para amplificação de cada cDNA no eixo das ordenadas.

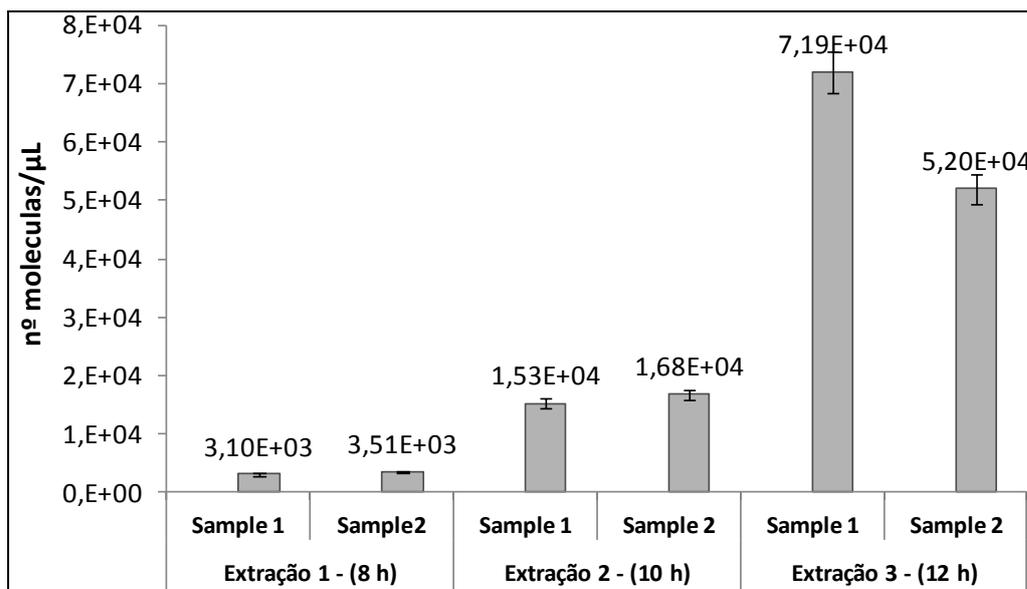


Figura 35. Análise de qPCR da expressão de proinsulina em *Pichia pastoris*. Histogramas de colunas com expoentes para $<0,05$.

A tabela 16 resume os resultados no que se refere a produção de biomassa, número de moléculas de mRNA de proinsulina e produção de proinsulina, mostrando que na melhor condição determinada pelo melhoramento multifatorial todas as grandezas são maiores do que a condição contrastante.

Os resultados obtidos por Mansur, et al. (2005) para maior expressão/secreção de proteínas em *P. pastoris* utilizando clones com maior número de cópias integradas, mostrou um aumento proporcional, de forma que, quanto maior o número de cópias integradas maior a expressão. No entanto há trabalhos que discordam desta afirmativa como Cregg *et al.* (1985) relatam que o alto número de cópias no genoma hospedeiro não está relacionado com altos rendimentos de produção da proteína recombinante. Por exemplo Mack et al., (2009) obtiveram expressão heteróloga tanto em *P. pastoris* quanto em *P. angusta* e para determinadas construções recombinantes com 9 cassetes de expressão integrados expressaram mais proteínas quando comparadas aos clones com 19 cópias. Uma possível explicação para essas divergências apontadas na literatura sugere que para determinadas proteínas, a multiplicidade de cópias exógenas integradas no genoma da levedura recombinante poderia levar a debilidade da maquinaria celular nos processos transcricionais e traducionais e ainda saturar a via de empacotamento (*foldi*ng) e secreção proteica, sendo portanto tóxicas ao hospedeiro.

Tabela 16. Resultado geral da biomassa, número de moléculas do RNA e RNAm e produção de proinsulina em g/L

Tempo	Amostra	Biomassa g/L	mRNA nº moléculas/µg	Proinsulina g/L
Ext 1(8h)	Amostra 1	18	3,10 x 10 ³	0,011
	Amostra 2	4,3	3,51 x 10 ³	0,005
Ext 2(10h)	Amostra 1	19,5	1,53 x 10 ⁴	0,015
	Amostra 2	6,5	1,68 x 10 ⁴	0,008
Ext 3(12h)	Amostra 1	8,5	7,19 x 10 ⁴	0,020
	Amostra 2	22,5	5,20 x 10⁴	0,009*

CONCLUSÕES

Utilizando-se um gene sintético, com diferentes mudanças nas sequências dos nucleotídeos, cadeia C e peptídeo espaçador e otimização dos códons para *P. pastoris* foi possível realizar a expressão funcional da proinsulina.

Os resultados deste projeto mostram que a levedura *P. pastoris* pode ser usada como plataforma genética para a produção de proinsulina recombinante utilizando promotor alternativo ao AOX1.

Os resultados de expressão heteróloga em *P. pastoris* a partir do promotor PGK1 mostram a expressão da proinsulina nas primeiras horas de cultivo e que não há necessidade de crescimento inicial em outra fonte de carbono, como ocorre com a expressão induzida com o metanol.

Os clones recombinantes com o maior número de cópias integradas (resistência a zeocina), mostraram-se melhores produtores de proinsulina apresentaram-se mais fortes no dot-blotting.

As análises com SDS-PAGE demonstraram a expressão da proinsulina recombinante com massa molecular aproximada de 7,5 kDa para o clone A140, o que foi confirmada por *western blotting*.

Obteve-se desta forma a expressão e a produção de proinsulina pelo clone recombinante A140 com ~ 0,9g/L utilizando promotor do gene PGK.

A partir do clone A140 obteve-se cerca de 7,3µg de RNA total e cerca de ~2,0 x10¹³ moléculas de mRNA de proinsulina recombinante.

A melhor combinação de variáveis para a produção de proinsulina foi: temperatura de 25°C, pH do meio igual a 7,0, e composição do meio de cultivo, (dextrose 7,5%, extrato de levedura 1% e peptona 0,15%) e com adição de 7,5% de glicose a cada 24 horas.

O procedimento de otimização do planejamento experimental utilizado possibilitou aumentar a produção de proinsulina de 0,07g/L para 0,83g/L, ou seja cerca de 12 vezes. Entretanto a condição ideal ainda não foi estabelecida.

PERSPECTIVAS

- ✓ A partir da análise dos resultados dos gráficos de superfícies de resposta continuar o processo de otimização, para que se possa atingir o ponto central e o ponto máximo da produção de proinsulina.
- ✓ As células de *P. pastoris* sob controle do PGK, expressaram a proinsulina em níveis mais altos a partir de um período mais curto de tempo, sendo importante selecionar novos clones para novos testes com diferentes número de cópias.
- ✓ Realizar o processo de melhoramento de produção do clone A140 utilizando fermentação submersa realizando alimentação de glicose continuamente.
- ✓ Ajustar o procedimento de purificação da proinsulina e sua conversão em insulina.

REFERÊNCIAS

AHN, W.S.; PARK, S .J., LEE SY. Production of poly(3-Hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.3624-3627, 2000.

ALMEIDA, J. R. M. Isolamento e Caracterização do gene *PGK1* (3-fosfoglicerato quinase) da levedura *Pichia pastoris*: Regulação e uso do seu promotor. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília. 94 pp. 2003.

ALMEIDA, J. R. M.; Moraes, L. M. P.; Torres, F. A. G. Molecular characterization of the phosphoglycerate kinase (*PGK1*) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*, 22:725-737. 2005.

AMARAL, F.M.R. Construção de novos vetores para expressão heteróloga na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. 138 pp. 2003.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diabetes mellitus and other categories of description of diabetes. *Diabetes Care*. volume 27. 2004.

ANASTÁCIO, G. S. Produção de quimosina bovina e de camelo recombinante por *Pichia pastoris*. Universidade de Brasília. 2014.

ANDERSON, M. J.; S. E. JONES, AND A. C. MINSON. Diagnosis of human parvovirus infection by dot-blotting hybridisation using cloned viral DNA. *J. Med. Virol.* 15:163-172. 1985.

ARAÚJO FEITOSA V., Produção de fragmento recombinante de anticorpo em *Pichia pastoris*. Dissertação de mestrado. Sao Paulo. 2014.

ARAÚJO, J. A. Produção de quimosina B de *Bos taurus* em *Pichia pastoris*. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília. 135 pp. 2008. ARAÚJO FEITOSA V., Produção de fragmento recombinante de anticorpo em *Pichia pastoris*. Dissertação de mestrado. Sao Paulo. 2014.

ARCELLONI, C. Processing and release of human proinsulin-cleavage products into culture media by different engineered non-endocrine cells: a specific assessment by capillary electrophoresis. *J. Endocrinol.* **166**, 437–45. 2000.

ARRUDA, A. Utilização do promotor do gene PGK1 de *Pichia pastoris* para expressão heteróloga. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília. 2008.

ASTOLFI FILHO, S.; AZEVEDO, M. O.; PEREIRA, J. O.; XAVIER, M. A. S. *Noções Básicas de tecnologia do DNA recombinante*. Ed. EDUA, Manaus, Amazonas. 61pp. 2005.

ASTOLFI-FILHO, SPARTACO; LIMA, DOLABELA DE; JOSEF ERNST THIEMANN; HELOISA RIBEIRO; TUNES DE SOUSA; LUCIANO VILELA. United States Patent Date of Patent: Vetor para expressão de proteína heteróloga e métodos para extrair proteína recombinante e para purificar proinsulina recombinante isolada. Patent Number: 6,068,993, Date of Patent: Jul. 2, 1997, May 30, Biobras SA, Montes Claros; Universidade de Brasilia, Brasilia, both of Brazil. 2000.

BAKER, H. V. GCR1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTCC sequence motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88: 9443–9447. 1991.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5): 411-421. 1999.

BARBIRATO, F.; SOUCAILLE, F.; BORIES, A. Physiologic Mechanisms Involved in Accumulation of 3-Hydroxypropionaldehyde during Fermentation of Glycerol by *Enterobacter agglomerans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.4405-4409, 1996.

BARR, K.; HOPKINS, S. A.; SREEKRISHNA, K. Protocol for efficient secretion of HAS developed from *Pichia pastoris*. *Pharm. Eng.* 12: 48-51. 1992.

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Fed-batch fermentation to oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *Process Biochemistry*, v.34, p.501-509, 1999.

BIRNBOIM H. C. & DOLY, J. A. rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acid. Res. 7:1513-23, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Institut de Recherche en Biologie Moléculaire, Paris, France. 1979.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8: 93-99.1987.

BOADO, R.; JI, A.; PARDRIDGE, W. Cloning and expression in pichia pastoris of a genetically engineered single chain antibody against the rat transferrin receptor. Journal of Drug Targeting, v. 8, n. 6, p. 403-412, 2000

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. *Proteínas em biotecnologia: Produção, Aplicação e mercado*. Interciência. Rio de Janeiro, Brasil. 305pp. 2008.

BOX, G. E. P. & Wilson, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions", J. Roy. Statist.Soc., B13, 1-38. 1951.

BRITO, N.; FILHO, C. L. R. Expressão recombinante e caracterização molecular e funcional da pró-insulina humana , do hormônio de crescimento humano e do fator IX de coagulação sanguínea em plantas transgênicas de soja [*Glycine max L . (Merrill)*]. 2012.

BROSTOFF JM, KEEN H, BROSTOFF J. A diabetic life before and after insulin era. Diabetologia. 2007;50:1351-3.

BUTLER, J. M. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers, Second Edition. Elsevier Academic Press, 688 pp, 2005.

CAI, H. et al. High-level expression of a functional humanized anti-CTLA4 single-chain variable fragment antibody in *Pichia pastoris*. Appl Microbiol Biotechnol, v. 82, n. 1, p. 41-8, Feb 2009.

CALIK, P. et al. Influence of pH on recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 85, n. 12, p. 1628- 1635, DEC 2010.

CANETTIERI, E. V.; ALMEIDA E SILVA, J. B. FELIPE, M. G. A, Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.94, p.159-168, 2001.

CARIOCA, J. O. B; ARORA, H. L. *Biomassa: fundamentos e aplicações tecnológicas*. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 331pp. 1984.

CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 10:422-427.79. 1999.

CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 45-66. 2000.

CEREGHINO, G. P. L.; GODFREY, L.; DE LA CRUZ, B.; JOHNSON, S.; KHUONGSATHIENE, S.; TOLSTORUKOV, I ; YAN, M.; CEREGHINO, J. L.; VEENHUIS, M.; SUBRAMANI, S.; CREGG, J. M. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Molecular Cellular Biology*, 26(3): 883– 897. 2006.

CHANG, S. G.; KIM, D. Y.; CHOI, K. D.; SHIN, J. M.; SHIN, H. C. Human insulin production from a novel mini-proinsulin which has high receptor-binding activity. *The Biochemical journal*, pg 631-5. 1988.

CHANG, S. W.; LEE, G. C.; SHAW, J. F. Codon optimization of *Candida rugosa* lip1 gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase. *J. Agric. Food. Chem.* 54: 815-822. 2006.

CHASSY, B. M.; FLICKINGER, J. L. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology letters*, v, p. 17-177, 1987.

CHIRUVOLU, V. Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 75, n. 2-3, p. 163-173, NOV-DEC 1998.

CLARE, J. J., RAYMENT, F. B., BALLANTINE, S. P., SREEKRISHNA, K. & ROMANOS, M. A. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio-Technology* 9, 455–460, 1991.

CORE, R. Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015. URL <http://www.R-project.org/>.

COS, O.; RAMON, R.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F. A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 95, p. 145-154, 2006.

COUDERC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agricultural and biological chemistry*, 44: 2279-2289. 1980.

COUDERC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agric Biol Chem* 44: 2279-2289. 1980.

CREGG J. M. Heterologous proteins expressed in *Pichia pastoris*. [<http://faculty.kgi.edu/cregg>]. 2004.

CREGG J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C.; Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 11: 905-910. 1993.

CREGG, J.M.; CEREGHINO, L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotech* 16: 23-52. 2000.

DALL, M.T.L.; NICAUD, J.M.; TRETON, B.Y.; GAILLARDIN, C.M. The 3-phosphoglycerate kinase gene of the yeast *Yarrowa lipolytica* de-represses on gluconeogenic substrates. *Current Genetics*, 29: 446-456. 1996.

DALY, R.; HEARN, M. P. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris* and useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 18: 119-138. 2000.

DAMASCENO, L. M. An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, v. 37, n. 1, p. 18- 26, Sep 2004

DAMASO, M. C. T.; ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E.; MARTINS, O. B.; PEREIRA, N. J.; ANDRADE, C. M. M. C.; ALBANO, R. M. (2004). Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces laniginosus* in *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 10: 6064-6072

DEMAIN, L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* 27: 297-306. 2009.

DEMINOFF, S. J.; SANTANGELO, G. M. RAP1P requires Gcr1p and Gcr2p homodimers to activate ribosomal protein and glycolytic genes, respectively. *Genetics*, 158: 133-143. 2001.

DIABETES BLUE CIRCLE SYMBOL. International Diabetes Federation. 17 de Março de 2006.

DOLABELA, B.L. A produção de proinsulina humana por ENGENHARIA GENÉTICA. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* - nº 23 - novembro/dezembro 2001.

ELDIN, P. et al. High-level secretion of two antibody single chain Fv fragments by *Pichia pastoris*. *Journal of Immunological Methods*, v. 201, n. 1, p. 67-75, 1997.

EURODIAB ACE Study Group. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet*. 355:873-6. 2000.

FANG, B.; LIANG, B.; HE, G. Synonymous codon usage bias and overexpression of a synthetic gene. *Virol. Sinica* 22: 226-232. 2007.

FRAENKEL, D.G. Carbohydrate metabolism. In: *The molecular Biology of the yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*, Strathern Jn, Jones E.W.(eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Harbor, NY;1-37. 1982.

GANCEDO, C.; SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. In: Rose AH, Harrison JS (eds) *The yeasts III*. New York: Academic Press, p. 205–259. 1989.

GANCEDO, C; GANCEDO, J. M; SOLS, A. Glycerol Metabolism in Yeasts. *European Journal of Biochemistry*, v.6, n.2, p.165-172, 1968.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 741-75. 2000.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C. JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G.; Life with 6000 genes. *Science* 5287: 546-567. 1996.

GOLDMAN, J.; BALDWIN, D.; RUBENSTEIN, A. H.; KLINK, D. D. Characterization of circulating insulin and proinsulin-binding antibodies in autoimmune hypoglycemia. *The Journal of Clinical Investigation.* 63: 1050-1059. 1979.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; ANDRADE J.C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLE, P, Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metabolic Engineering.* v.7, p.329-336, 2005.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; SOUCAILLE, P.; VASCONCELOS, I. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol: Physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5). *Applied and Environment Microbiology*, v.72, p. 96-101, 2006.

GRANGE, D. C.; PRETORIUS, I. S.; VAN, Z. Y. L W. H.; Expression of a *Trichoderma reesei* β -xylanase gene XYN2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *App Environ Microbiol* 62: 1036–1044. 1996.

GURRAMKONDA, C.; POLEZ, S.; SKOKO, N.; ADNAN, A.; GÄBEL, T.; CHUGH, D; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N.; TISMINETZKY, S. & RINAS, U. Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microb. Cell Fact.* **9**, 31 (2010).

HAI-FENG, H.; WEN, C.; MEI-JIN, G.; JU, C.; YING-PING, Z.; SILIANG, Z. A simple unstructured model-based control for efficient expression of recombinant porcine insulin precursor by *Pichia pastoris*. *Korean J. Chem. Eng.*, 25(5), 1065-1069. 2008.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, New York, v. 11, p. 1026-1030, 1993

HIRSCH, I. B. Insulin analogues. *N Engl J Med.* 2005;352:174-83.

HOLLAND, M. J.; HOLLAND, J. P. Isolation and characterization of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and phosphoglycerate kinase. *Biochemistry*, 17: 4900-4907. 1978.

HOLMES, W. J. et al. Developing a scalable model of recombinant protein yield from *Pichia pastoris*: the influence of culture conditions, biomass and induction regime. *Microb Cell Fact*, v. 8, p. 35, 2009.

HU, S.; LI, L.; QIAO, J.; GUO, Y.; CHENG, L.; LIU, J. Códon optimization, expression, and characterization of na internalizing anti-ErbB2 single-chain antibody in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.*,v.47.p.249-257, 2006.

INAN, M. et al. Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, n. 7, p. 438-445, MAY 15 1999.

INAN, M.; ARYASOMAYAJULA, B.; SINHA, J.; MEAGHER, M. M. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfid isomerase. *Biotechnol. Bioeng.* 4: 771-778. 2006.

IWATA, T.; TANAKA, R.; SUETSUGU, M.; ISHIBASHI, M.; TOKUNAGA, H.; KIKUCHI, M.; TOKUNAGA, M. Efficient secretion of human lysozyme from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol. Lett.* 26:1803-1808. 2004.

JAFARI, R.; SUNDSTRÖM, B. E.; HOLM, P. Optimization of production of the anti-keratin 8 single-chain Fv TS1-218 in *Pichia pastoris* using design of experiments. *Microb Cell Fact*, v. 10, p. 34, 2011.

JAHIC, M.; GUSTAVSSON, M.; JANSEN, A. K.; MARTINELLE, M.; ENFORS, S. O. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *J Biotechnol.*, v.102, p. 45-53, 2003.

JOHANSSON, B.; HAHN-HÄGERDAL, B. Overproduction of pentose phosphate pathway enzymes using a new CRE-loxP expression vector for repeated genomic integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19: 225-231. 2002.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr.Opin.Biotechnol.* 6: 494-500. 1995.

KAUFMANN, J. E.; IRMINGER, J. C.; MUNGALL, J. & HALBAN, P. A.; Proinsulin conversion in GH3 cells after coexpression of human proinsulin with the endoproteases PC2 and/or PC3. *Diabetes.* 46: 978-982. 1997.

KING KM. A history of insulin: from discovery to modern alternatives. *Br J Nurs.* 2003;12(19):1137-41.

KINGSMAN, S. M.; KINGSMAN, A. J.; DOBSON, M. J.; ROBERTS, N. A. Heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 3: 377- 416. 1985.

KJELDSEN, T. Yest secretory expression of insulin precursors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 277-286. 2000.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A. & ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 2006.

KUMAR, VINAY; FAUSTO, NELSON; ABBAS, ABUL K.; COTRAN, RAMZI S. ; ROBBINS, STANLEY L.; ROBBINS & COTRAN. *Pathologic Basis of Disease.* 7th ed. Philadelphia, Pa.: Saunders, 1194–1195 p. ISBN 0-7216-0187-1. 2005.

KUSNADI A. R. NIKOLOV ZL & HOWARD J. A. Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering*, 56: 473-484. 1997.

LI, T. Construction, production, and characterization of recombinant scFv antibodies against methamidophos expressed in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 24, n. 6, p. 867-874, JUN 2008.

LI, Z.J.; XIONG, F.; LIN, Q.S.; D'ANJOU, M.; DAUGULIS, A J.; YANG, D.S.C.; HEW, C.L. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif.*, v.21.p.438-445, 2001.

LUEKING, A.; HOLTZ,C.; GOTTHOLD,C.; LEHRACH,H.;CAHILL,D. A system for dual protein expression in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif*, 20(3): 372-378. 2000.

MA, H.; SHIEH, K. J.; CHEN, G.; QIAO, T.; CHUANG, M. Y. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *The Journal of American Science*, v. 2, p. 1-15, 2006.

MACAULEY-PATRICK S, FAZENDA ML, MCNEIL B, HARVEY LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22: 249-270. 2005.

MACK, M.; WANNEMACHER, M.; HOBL, B.; PIETSCHMANN, P.; HOCK, B. Comparison of two expression platforms in respect to protein yield and quality: *Pichia pastoris* versus *Pichia angusta*. *Protein Expression and Purification*, 66:165-171. 2009.

MAENG, B. Functional expression of recombinant anti-BNP scFv in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and application as a recognition molecule in electrochemical sensors. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 28, n. 3, p. 1027-1034, 2012.

MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 60(3): 512-538. 1996.

MANSUR M, CABELLO C, HERNANDEZ L, PAIS J, VARAS L, VALDES J, TERRERO Y, HIDALGO A, PLANA L, BESADA V, GARCIA L, LAMAZARES E, CASTELLANOS L, Martinez E: Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 27:339-345, 2005.

MASUDA, Y.; PARK, S. M.; OHKUMA, M.; OHTA, A.; TAKAGI, M. Expression of an endogenous and a heterologous gene in *Candida maltosa* by using a promoter of a newly- isolated phosphoglycerate kinase PGK gene. *Curr Genet* 25: 412–417. 1994.

MATTANOVICH D, GRAF A, STADLMANN J, DRAGOSITS M, REDL A, MAURER M, KLEINHEINZ M, SAUER M, ALTMANN F, GASSER B. 2009. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* 8: 29.

MIRANDA, M. I. PIRES DE; MOREIRA, C.; QUINTÃO, T.; GONÇALVES, F. M.; SAGREIRA, L.; GOULÃO, I. *DIABETES*; *Actas Bioq.* 8: 65-78. 2007.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P. Central pathways of carbohydrate metabolism. Em: *Microbial physiology*, MOAT, A. G.; FOSTER, J. W. & Spector, M. P. (eds), New York: Wiley-Liss, 2002.

MOUILLESSEAU, K. P.; KLIMPEL, K. R.; DHAR, A. K. Improvement in the specificity and sensitivity of detection for the Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp by increasing the amplicon size in SYBR Green real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods*, v.111, 2003.

MULLER, G. Clonagem e Expressão do Gene α -amilase de *Bacillus subtilis* variedade D2 na levedura *Pichia pastoris*. Mestrado – Programa Multinstitucional de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2008.

NAMBIAR, K. P., J. STACKHOUSE, D. M. STAUFFER, W. P. KENNEDY, J. K. ELDREDGE et al. Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein. *Science* 223: 1299-1301. 1984.

NASCIMENTO, MARTHA. Desenvolvimento e padronização da técnica de radioimunoensaio para a determinação de proinsulina humana e sua aplicação no estudo do diabetes mellitus tipo 2 associado à obesidade. Tese de doutorado. Instituto de Petroquímica Energéticas e Nuclear. SÃO PAULO. 1996.

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M.; LEHNINGER, A. L. 2006. *Principles of biochemistry*. University of Wisconsin-Madison,[S.l.]. 248pp.

NERI, A. L. Palavras chave em Gerontologia. Campinas, SP: Editora Alínea, 2001. In: CLAUDINO, R.; SCHVEITZER, V. Estudo do perfil das comorbidades para o risco de ocorrência de doenças crônicas em idosos institucionalizados. *EFDeportes.com, Revista Digital*. Buenos Aires, n. 141, ano 14, fev. 2010.

NILSSON, J.; JONASSON, P.; SAMUELSSON, E.; STAHL, S. Integrated production of human insulin and its C-peptide. *Journal of Biotechnology*. 48: 241-250, 1996.

OLIVEIRA, R. J.; OLIVEIRA, A. C. F. J. Diabetes e exercício. In: *Saúde e atividade física*. Rio de Janeiro: Shape, cap. 10, p. 189-202, 2005.

PAIS, J. M.; VARAS, L.; VALDES, J.; CABELLO, C.; RODRIGUEZ, L.; MANSUR, M.; Modeling of mini-proinsulin production in *Pichia pastoris* using the AOX promoter. *Biotechnol Lett* 25:251-255, 2003.

PAIS-CHANFRAU, J. M.; GARCIA, Y.; LICOR, L.; BESADA, V. CASTELLANOS-SERRA, L.; CABELLO, C. I.; HERNANDEZ, L.; MANSUR M, PLANA L, HIDALGO A, TAMBARA, Y.; DEL CA-P DEL, T. Y.; VALDES, J. MARTINEZ, E.; Improving the expression of mini-proinsulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 2004, 26:1269-1272.

PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J.P. Principles and technical aspects of PCR amplification, Springer, 332 p, 2008.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v.29, p.2002-2007, 2001.

PINHEIRO, R. R.; OLORTEGUI, C. D. C.; GOUVEIA, A. M. G.; ARAUJO, S.C.; ANDRIOLI, A. The development of dot-blotting for the detection of antibodies to Caprine Arthritis Encephalitis virus in goat. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 101, p. 51-56, 2006.

PIPER, P.; CURRAN, B.; DAVIS, M. A heat shock element in the phosphoglycerate kinase gene promoter of yeast. *Nucleic Acids Res* 16: 1333–1348. 1988.

PIRES, A. C.; CHACRA, A. R. A Evolução da Insulinoterapia no Diabetes Melito Tipo 1; *Arq Bras Endocrinol Metab*;52/2. 2008.

RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R. P.; WITTEWER, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, v.270, p.154–160, 1997.

ROMANOS, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 6: 527-533. 1995.

ROSENFELD, S. A.; NADEAU, D.; TIRADO, J. Production and purification of recombinant hirudin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Methods Enzymol* 306: 154- 169. 1999.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, & MANIATIS. T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., p. 1.25-1.31. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.1989.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. Commonly used techniques in molecular cloning. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, Appendix 8-A8.20, 2001.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G., Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, v. 166, n. 2. p. 368-379. 1987.

SCORER, C. The Intracellular production and Secretion Of Hiv-1 Envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia-pastoris*. *Gene*, v. 136, n. 1-2, p. 111-119, dec 22 1993.

SERIO, M.; ARAMO, P.; ALTERIIS, E.; TESSER, R.; SANTACESARIA, E. Quantitative Analysis of the Key Factors Affecting Yeast Growth. *Industrial Engineering and Chemistry Research*, v.42, p.5109-5116, 2003.

SEUNG-GU, C.; KI-DOO, C.; SEUNG-HWAN, J & HANG-CHEOL, S. Role of Disulfide Bonds in the Structure and Activity of Human Insulin *Department of Bioinformatics and Life Science, Soongsil University, Seoul 156-743, Korea*. *Mol. Cells*, Vol. 16, No. 3, pp. 323-330, 1998.

SHI, X. et al. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, v. 28, n. 2, p. 321-30, Apr 2003.

SHOBACK, edited by David G. Gardner, Dolores Greenspan's basic & clinical endocrinology. 9th ed. New York: McGraw-Hill Medical, Chapter 17 p.ISBN 0-07-162243-8, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002. Diagnóstico e classificação do diabete melito e tratamento do diabete melito do tipo 2. Rio de Janeiro: Diagraphic Editora, 2003. www.diabetes.org.br/educacao/docs/diretrizes.pdf . Acessado em 14.07.2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Posicionamento Oficial nº 4 de 2007. Novas diretrizes da SBD para o controle glicêmico do diabetes tipo 2. www.diabetes.org.br/educacao/docs/diretrizes.pdf . Acessado em 14.07.2014.

SOUZA, L.J.; CHALITA, F.E.B.; REIS, A.F.F.; TEIXEIRA, C.L.; NETO, C.G.; BASTOS, D.A.; FILHO, J.T.D.S.; SOUZA, T.F.; CÔRTEZ, V.A. Prevalência de diabetes mellitus e fatores de risco em Campos dos Goytacazes, RJ. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo*. v. 47, n. 1. São Paulo, Feb. 2003.

SOYASLAN, E.; CALIK, P. Enhanced recombinant human erythropoietin production by *Pichia pastoris* in methanol fed-batch/sorbitol batch fermentation through pH optimization. *Biochemical Engineering Journal*, v. 55, n. 1, p. 59-65, JUN 15 2011.

SREEKRISHNA K, ROMANOS M. A.; High level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology* 9:455-460, 1991.

SREEKRISHNA, K.; BRANKAMP, R. G.; KROPP, K. E.; BLANKENSHIP, D. T.; TSAY, B. J. T.; SMITH, P. L.; WIERSCHKE, J. D.; SUBRANANIAN, A.; BIRKENBIRGIR, L. A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190: 55-62, 1997.

STEINER, D.F & PHILIP, E. OYER The biosynthesis of insulin and a Probable Precursor of Insulin by a human Islet cell adenoma. *proc Nat Acad Sci* 57:473, 1967.

STEINER, D.F.; CHAN, S.J.; WELSH, J.M. & KWOW, S.C.M. Structure and evolution of the insulin gene. *Ann. Rev. Genet.*, 19: 463-84. 1985.

SURRIBAS, A.; STAHN, R.; MONTESINOS, J. L.; ENFORS, S. O.; VALERO, F.; JAHIC, M. Production of a *Rhizopus oryzae* lipase from *Pichia pastoris* using alternative operational strategies. *J. Biotechnol.* 130: 291-299, 2007.

TAKAYA, N.; YANAI, K.; HORIUCHI, H.; OHTA, A.; TAKAGI, M. Cloning and characterization of two 3-phosphoglycerate kinase genes of *Rhizopus niveus* and heterologous gene expression using their promoters. *Curr Genet* 25: 524–530, 1994.

TANAKA, R.; ISHIBASHI, M.; TOKUNAGA, H.; TOKUNAGA, M. Secretion of hen egg white lysozyme from *Kluyveromyces lactis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 2716-2718, 2000.

The insulin A and B chains contain sufficient structural information to form the native molecule. *TIBS*, 16: 279-81, NG, S. H.; YANG, T. S.; LIN, S. M.; TSAI, M. S.; WU, S. C.; MAO, S. J. Expression, characterization, and purification of recombinant porcine lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, v. 25, p. 41-49, 2002.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 20-22, 2001.

TSCHOPP, J. F.; SVERLOW, G.; KOSSON, R.; CRAIG, W.; GRINNA, L. High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol.* 5: 1305-1308, 1987.

VAN DEN BRINK, H. M.; PETERSEN, S. G.; RAHBEEK-NIELSEN, H.; HELLMUTH, K.; HARBOE, M. Increased production of chymosin by glycosylation. *J. Biotechnol.* 125: 304-310, 2006.

VANHANEN, S.; PENTTILA, M.; LEHTOVAARA, P.; KNOWLES, J. Isolation and characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (*pgk*) from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Curr Genet* 15: 181–186, 1989.

VASSILEVA, A.; CHUNGH, D. A.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *J. Biotechnol.* 88: 21-35 2001.

WAGSTAFF, A. J.; REYNOLDS, N. A. Insulin aspart: a review of its use in the management of type 1 or 2 diabetes mellitus. *Drugs.* 2004;64(17):1957-4.

WALKER, G. M. Yeast Metabolism. In: *Yeast Physiology and Biotechnology*. London – England: John Wiley & Sons, p 233, 1998.

WAN, L. High-level expression of a functional humanized single-chain variable fragment antibody against CD25 in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 81, n. 1, p. 33-41, Nov 2008.

WANG, Y.; LIANG, Z. H.; ZHANG, Y. S.; YAO, S. Y.; XU, Y.G.; TANG, Y.H.; ZHU, S. Q.; UI, D. F.; FENG, Y. M. Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnol Bioeng*, 73:74-79. 2001.

WATERHAM, H. R.; DIGAN, M. E; KOUTZ, P. J.; LAIR, SL, CREGG JM. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* 186: 37-44, 1997.

WEGNER, G. Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 7: 279-283, 1990.

WHITE, C. E. KEMPI, N. M. & KOMIVES, E.A. Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. *Struct.* 2,808-811, 1994.

WHO/NCD/NCS/99.2: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and ITS COMPLICATIONS WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999.

WITTRUP, M.; JAHIC, M.; HULT, K.; ENFORS, S. Inducible versus constitutive expression of a lipase in *Pichia pastoris*: A comparative study using different fermentation techniques. *J. Biotechnol.* 131: 149. 2007.

WOO, J. H. Gene optimization is necessary to express a bivalent anti-human anti-T cell immunotoxin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, v. 25, n. 2, p. 270-82, 2002.

XIE, T.; LIU, Q.; XIE, F.; LIU, H.; ZHANG, Y. Secretory expression of insulin precursor in *Pichia pastoris* and simple procedure for producing recombinant human insulin. *Prep Biochem Biotechnol*, 38:308-317, 2008.

ZARLENGA., D. S.; HIGGINS, J. PCR as diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*, v. 101, n. 3-4, p. 215-230, 2001.

ZHAO, Y-N.; CHEN, G.; YAO, S-J. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemistry Engineering Journal*, v.32, p.93-99, 2006.

ZHENG, M.; STRECK, R. D.; SCOTT, R. E.; SEIDAH, N. G. & PINTAR, J. E. The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2, and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity. *J. Neurosci.* **14**, 4656–73, 1994.

ZHENG, Z. M.; HU, Q. L.; HAO, J.; XU, F.; GUO, N-N.; SUNA, Y.; LIU, D-H. Statistical optimization of culture conditions for 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* AC 15 via central composite design. *BioresoucesTechnology*, 2007. In press. DOI:10.1016/j.biortech. 02.038, 2007.

ZHU, T.; GUO, M.; TANG, Z.; ZHANG, M.; ZHUANG, Y.; CHU, J.; ZHANG, S.; Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *J Appl Microbiol*, 107:954-963, 2009.

ANEXO

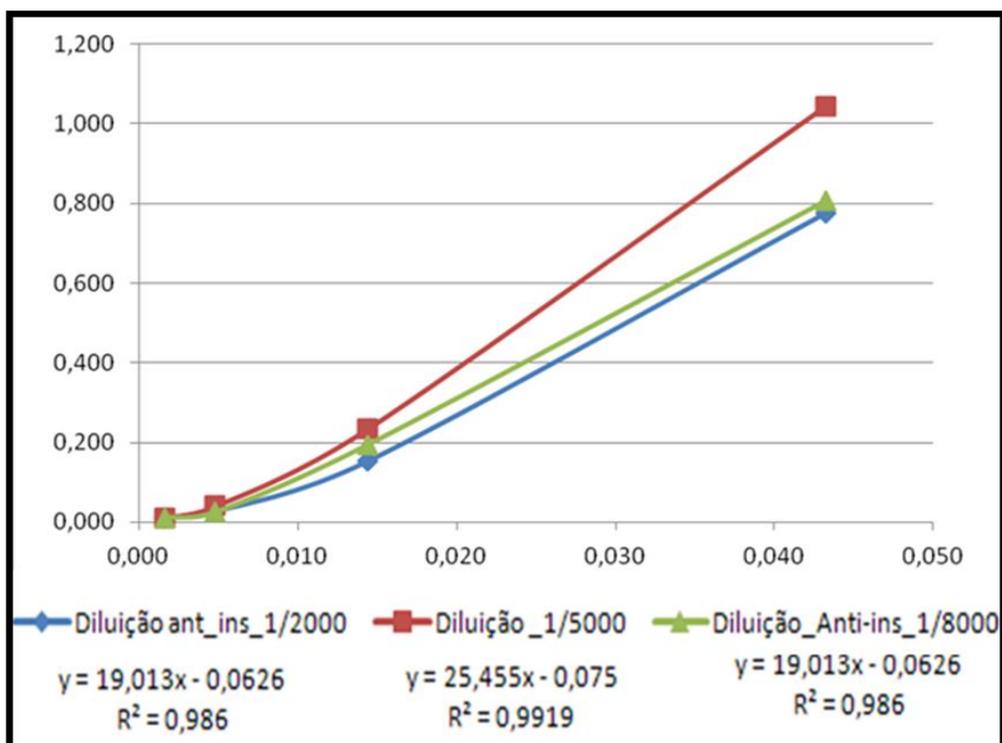
Anexo 1 - Padronização do ensaio imuno-enzimático (ELISA)

Os sobrenadantes provenientes do clones A140 foi submetido a padronizações. Iniciou-se com várias diluições do anticorpo primário e secundário ate chegar ao ideal. Posteriormente, para que ocorra a padronização destas condições para a ELISA, separadamente os testes foram testados com os sobrenadantes contendo a proinsulina. Entretanto, para a padronização, foram realizados diversos testes com diferentes concentrações de antígenos e diferentes diluições, sempre com diluições seriadas.

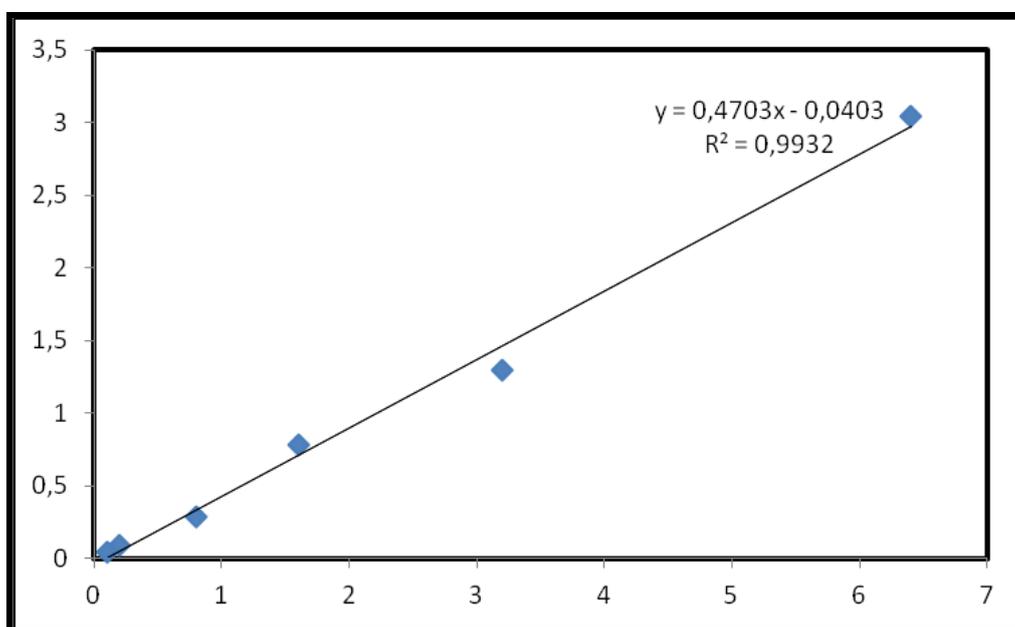
Os testes preliminares com as maiores concentrações demonstraram valores superiores à absorvância máxima do leitor de microplaca. Através das curvas geradas, foi possível observar e determinar as melhores concentrações do antígeno e diluição do anticorpo primário, que possibilitassem uma diferença no sobrenadante com a proinsulina (positivo) do sobrenadante sem proinsulina (negativo), ou com as menores quantidades possíveis.

Nas curvas geradas foi possível determinar as melhores concentrações de amostra e diluição do anticorpo primário e secundário. As condições estabelecidas por trabalhar com a diluição de 1/5000 apresentou valor R^2 de 0,9919 (figura 23). Com a padronização das condições para o ELISA, determinou-se que a concentração era de 0,001 μg ate 1,1 μg e a diluição do anticorpo primário 1: 5000 e 1: 5000 para a diluição do anticorpo secundário (figura 24).

Foram utilizados quatro controles para os ensaios imuno-enzimáticos: controle 1 -branco (contendo todos os reagentes do ensaio, exceto o antígeno), controle dois (contendo todos os reagentes do ensaio, exceto o anticorpo primário), Controle três (contendo todos os reagentes do ensaio, exceto o anticorpo secundário) e controle quatro (contendo todos os reagentes do ensaio, exceto o bloqueador)



Anexo-Figura 1 Padronização da concentração de antígeno e diluição de anticorpo primário e secundário para o teste de ELISA.



Anexo-Figura 2. Curva padrão da proinsulina humana do cultura do clone A140

Anexo 2 - Tabela 1. Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear múltipla planejamento fracionado ($2^{6-1} + 4PC$) total 36 ensaios

Coefficients:	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	Sig
Intercepto	18.76977	0.90547	20.729	< 2e-16	***
Tempo 72	-8.54058	1.28053	-6.670	6.11e-08	***
x1 Dextrose	0.51190	0.67910	0.754	0.4555	
X2 Peptona	-1.21865	0.67910	-1.794	0.0805	
X3 E. Levedura	-0.01358	0.67910	-0.020	0.9841	
X4 pH	0.69947	0.67910	1.030	0.3094	
X5 Temperatura	-1.35294	0.67910	-1.992	0.0534	
x1:x2	-0.01369	0.67910	-0.020	0.9840	
x1:x3	-0.50949	0.67910	-0.750	0.4576	
x1:x4	0.38529	0.67910	0.567	0.5737	
x1:x5	-0.61044	0.67910	-0.899	0.3742	
x2:x3	0.50331	0.67910	0.741	0.4631	
x2:x4	-0.55304	0.67910	-0.814	0.4204	
x2:x5	0.58523	0.67910	0.862	0.3941	
x3:x4	-0.17686	0.67910	-0.260	0.7959	
x3:x5	-0.17961	0.67910	-0.264	0.7928	
x4:x5	-1.05560	0.67910	-1.554	0.1282	
x1:x2:x3	0.73087	0.67910	1.076	0.2884	
x1:x2:x4	0.05792	0.67910	0.085	0.9325	
x1:x2:x5	0.49242	0.67910	0.725	0.4727	
x1:x3:x4	0.72377	0.67910	1.066	0.2931	
x1:x3:x5	0.10387	0.67910	0.153	0.8792	
x1:x4:x5	-0.55235	0.67910	-0.813	0.4210	
x2:x3:x4	0.84396	0.67910	1.243	0.2214	
x2:x3:x5	-0.13756	0.67910	-0.203	0.8405	
x2:x4:x5	0.92772	0.67910	1.366	0.1797	
x3:x4:x5	0.12553	0.67910	0.185	0.8543	
x1:x2:x3:x4	0.62190	0.67910	0.916	0.3654	
x1:x2:x3:x5	-0.56106	0.67910	-0.826	0.4137	
x1:x2:x4:x5	0.30233	0.67910	0.445	0.6586	
x1:x3:x4:x5	0.52038	0.67910	0.766	0.4481	
x2:x3:x4:x5	-0.17182	0.67910	-0.253	0.8016	
x1:x2:x3:x4:x5	-7.00328	0.67910	-10.313	1.06e-12	***

Signif. codes: *** 0.001

Residual standard error: 5.433 on 39 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.8179, Adjusted R-squared: 0.6686

F-statistic: 5.476 on 32 and 39 DF, p-value: 5.39e-07

Anexo 1 - Tabela 2. Análise de variância para a produtividade do clone A140

	GL	Soma q	Media q	F valor	Pr(>F)	Sig
Tempo 72	3	182.42	60.806	9.2494	1.526e-05	*
x1, x2, x3, x4, X5	22	323.67	14.712	2.2379	0.003088	**
Residuals	118	775.73	6.574			

Signif. codes: * 0.001 '**' 0.01

Anexo 2 - Tabela 3. Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear múltipla do experimento 2 (2^4+8 axiais+ 6PC) total 30 ensaios

Variáveis	Efeito	Erro-padrão	valor t	Pr(> t)	Sig
Intercepto	11.85188	1.15550	10.257	8.55e-16	***
48h	3.91000	1.10940	3.524	0.000737	***
72h	5.17933	1.10940	4.669	1.35e-05	***
X1 Dextrose	0.26422	0.81019	0.326	0.745265	
X2 Peptona	-6.33026	1.12033	-5.650	2.91e-07	***
X3 pH	48.30444	8.10193	5.962	8.15e-08	***
X4 Temp	14.52133	4.86116	2.987	0.003832	
x1:x2	-0.43072	1.90518	-0.226	0.821772	
x1:x3	-3.30133	15.87647	-0.208	0.835856	
x1:x4	2.81280	9.52588	0.295	0.768618	
x2:x3	-51.34720	19.05176	-2.695	0.008727	
x2:x4	-27.54432	11.43106	-2.410	0.018492	
x3:x4	-271.32800	95.25880	-2.848	0.005706	
x1^2	0.08428	1.20174	0.070	0.944281	
x2^2	4.90978	2.28277	2.151	0.034803	
x3^2	-619.73200	120.17404	-5.157	2.07e-06	***
x4^2	-38.32272	43.26265	-0.886	0.378626	

Signif. codes: ***0.001

Residual standard error: 4.297 on 73 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.6678, Adjusted R-squared: 0.595

F-statistic: 9.173 on 16 and 73 DF, p-value: 7.76e-12

Anexo 2 - Tabela 4 Análise de variância para a produção de proinsulina experimento 2 (2^4+8 axiais+ 6PC) total 30 ensaios

	GL	Soma q	Media q	F valor	Pr(>F)	Sig
block	1	24.17	24.168	1.8989	0.1752	
x1,x2,x3,x4	14	1677.43	119.816	9.4138	4.267e-09	***
Residuals	44	560.02	12.728			

Signif. codes: *** 0.001

Anexo 2 - Tabela 5. Análise de variância para a produção de proinsulina do planejamento (2^3) 8 axiais+ 6PC) total 20 ensaios.

	GL	Soma q	Media q	F valor	Pr(>F)
Temperat.72	1	4897.4	4897.4	150.5404	5.2e-13***
x1, x2, x3	3	560.2	186.7	5.7402	0.003284
x1, x2, x3	3	63.5	21.2	0.6509	0.588808
x1, x2, x3	3	635.5	211.8	6.5111	0.001672
Residuals	29		943.4	32.5	

Signif. codes: *** 0.001

Tabela 6 Estimativa dos parâmetros do modelo de regressão linear múltipla planejamento (2^3) 8 axiais+ 6PC) total 20 ensaios.

Variáveis	Efeito	Erro-padrão	valor t	Pr(> t)	Sig
Intercepto	12.92586	1.87601	6.8901	1.433e-07	***
Tempo 72	22.13000	1.80366	12.2695	5.272e-13	***
Dextrose (x1)	0.15891	6.11427	0.0260	0.9794431	
Peptona (x2)	-123.87992	30.49776	-4.0619	0.0003380	***
pH (x3)	6.15829	7.63815	0.8063	0.4266592	
x1:x2	-53.70400	223.58413	-0.2402	0.8118682	
x1:x3	-68.30600	55.89603	-1.2220	0.2315408	
x2:x3	177.13500	279.48016	0.6338	0.5311779	
x1^2	1.54882	33.38041	0.0464	0.9633103	
x2^2	134.72651	826.47285	0.1630	0.8716382	
x3^2	-226.68409	52.03132	-4.3567	0.0001508	***

Signif. codes: *** 0.001

Multiple R-squared: 0.8671, Adjusted R-squared: 0.8213

F-statistic: 18.92 on 10 and 29 DF, p-value: 3.958e-10

Anexo 3 - Curva padrão do plasmídeo pPGK para PCR em tempo real

A concentração das amostras foi obtida por interpolação com a curva padrão ($R^2 = 0,992$) (Fig. 40). Os valores médios de Ct para as réplicas técnicas das diluições variaram de 8,88 (equivalente a $3,0 \times 10^2$ cópias) a 26,28 (para $3,0 \times 10^7$ cópias). A curva de dissociação, necessária para se avaliar existência de dímeros de iniciadores e/ou amplificação inespecífica, exibiu um único pico com temperatura de dissociação (T_m) de $78,36^\circ$, resultado que indica especificidade dos iniciadores e ausência de homo e heterodímeros.

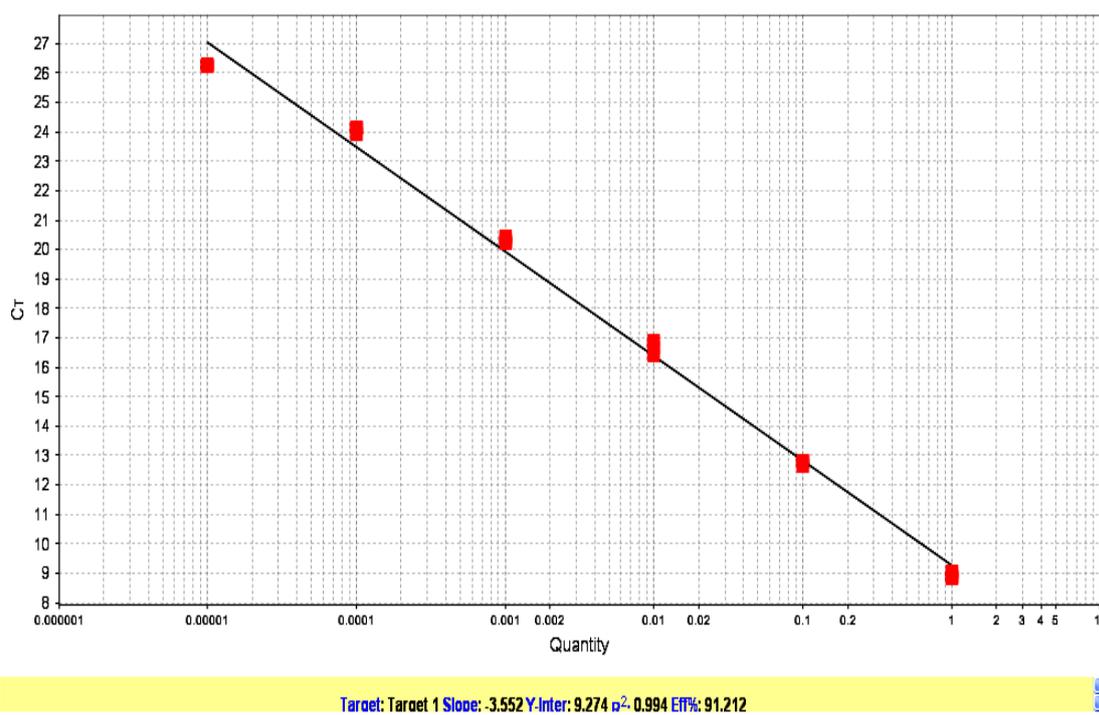


Figura 1. Interface do *software* STEPONE Applied biosystem, mostrando Regressão linear a partir da curva padrão construída com concentrações conhecidas de DNA plasmidial variando entre 10^{-2} ng a 10^{-7} ng. Os pontos vermelhos representam os C_t s gerados pelo número de cópias de cada concentração de DNA padrão. Coeficiente de Correlação ($R^2=0,994$), e slope=-3,5. Nota: Amostras em triplicata. Fonte: Applied Biosystems 2015.

Anexo 3 - Resultado do número de moléculas obtidos por PCR em tempo real (qPCR)

Anexo 3 - Tabela 1. Resultado do número de moléculas de mRNA da proinsulina usado para a análise de Regressão ($P \leq 0,05$).

	Amostras	Concentração[ng/uL	Número de moléculas/ul
Extração_1 (8 horas)	Sample 1	1,12E-05	3,28E+03
	Sample 1	1,05E-05	3,07E+03
	Sample 1	1,01E-05	2,96E+03
	Sample 2	1,22E-05	3,55E+03
	Sample 2	1,20E-05	3,50E+03
	Sample 2	1,20E-05	3,50E+03
Extração_2 (10 horas)	Sample 1	5,93E-05	1,73E+04
	Sample 1	5,87E-05	1,71E+04
	Sample 1	3,91E-05	1,14E+04
	Sample 2	5,47E-05	1,60E+04
	Sample 2	5,90E-05	1,72E+04
	Sample 2	5,92E-05	1,73E+04
Extração_3 (12 horas)*	Sample 1*	2,53E-04	7,38E+04
	Sample 1*	2,36E-04	6,90E+04
	Sample 1*	2,50E-04	7,30E+04
	Sample 2*	1,82E-04	5,30E+04
	Sample 2*	1,78E-04	5,20E+04
	Sample 2*	1,75E-04	5,10E+04

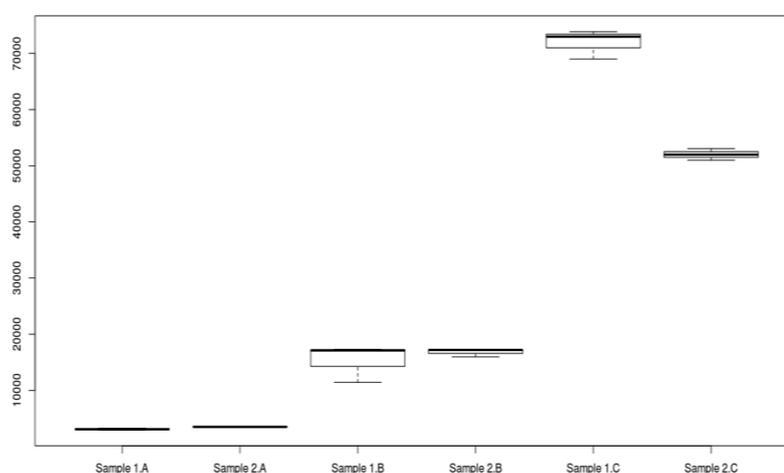
Anexo 3 - Tabela 2. A concentração média obtida em ng/uL para n° moléculas/uL mRNA da proinsulina

Tratamento	ng/uL	moléculas/ul
Sample 1	1,06E-05	3,10E+03
Sample 2	1,20E-05	3,51E+03
Sample 1	5,24E-05	1,53E+04
Sample 2	5,76E-05	1,68E+04
Sample 1	2,47E-04	7,19E+04
Sample 2	1,78E-04	5,20E+04

Anexo 3 - Resultado geral da biomassa, número de moléculas do RNAm e produção de proinsulina em g/L

Anexo 3 - Tabela 3. Resultado geral da biomassa, número de moléculas do RNAm e produção de proinsulina em g/L

Tempo	Amostra	Biomassa g/L	mRNA nº moléculas	Proinsulina g/L
Ext 1(8h)	Amostra 1	40	2,4E+12	0,15
	Amostra 2	18	1,2E+12	0,07
Ext 2(10h)	Amostra 1	44	5,4E+12	0,18
	Amostra 2	20	1,9E+12	0,08
Ext 3(12h)	Amostra 1	50	2,0E+13	0,20
	Amostra 2	22	1,2E+13	0,09



Anexo 3 - Figura 2. Gráficos de resíduos - mostra análise estatística de comparação entre número de moléculas do RNAm da amostra 1 e 2 com tempos de 8, 10 e 12 horas.

Anexo 3 - Tabela 4. Análises de variância

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
amostra	1	1.6213e+08	162129806	49.745	1.332e-05*
time	2	1.1424e+10	5712070490	1752.574	1.577e-15*
amostra:time	2	4.3826e+08	219131902	67.234	3.024e-07*
Residuals	12	3.9111e+07	3259246		

Anexo 3 - Tabela 5. Análise de Regressão considerando os três tempos

	Estimado	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	3101.0	1042.3	2.975	0.0116*
Amostra 2 time B/C	413.4	1474.1	0.280	0.7839
amostra:time B	12184.3	1474.1	8.266	2.69e-06*
amostra2:time C	68839.2	1474.1	46.701	6.07e-15*
	1110.1	2084.6	0.533	0.6041
	-0357.6	2084.6	-9.766	4.62e-07*

Residual standard error: 1805 on 12 degrees of freedom

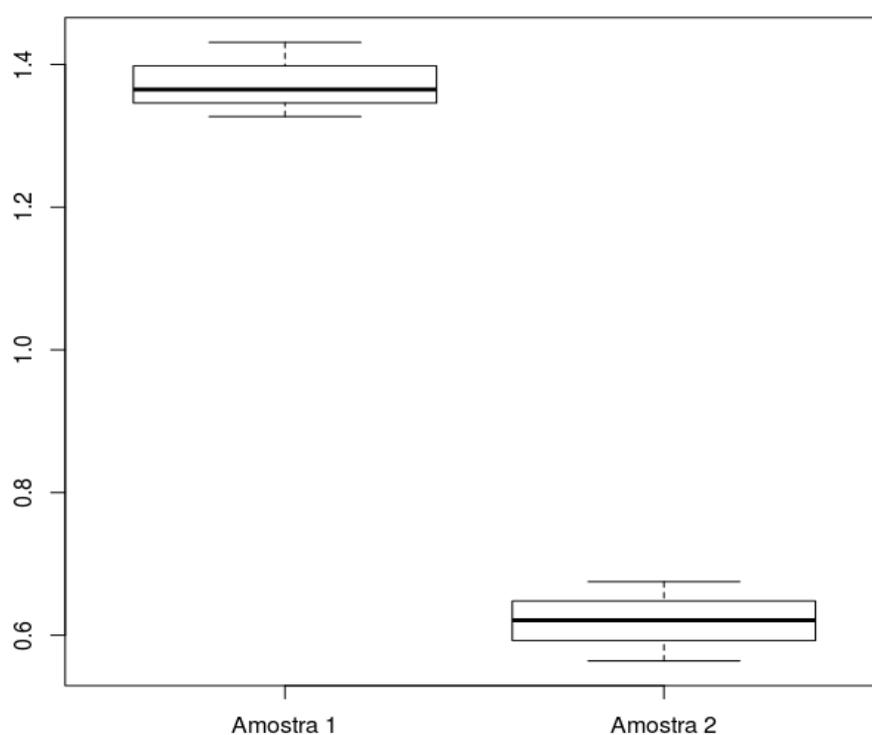
Multiple R-squared: 0.9968, Adjusted R-squared: 0.9954

F-statistic: 737.9 on 5 and 12 DF, p-value: 1.696e-14

Anexo 3 - Análise estatística de comparação entre as biomassas da amostra 1 e 2 maior e menor produção de proinsulina

Anexo 3 - Tabela 6. Análise de variância de experimento entre as biomassas da amostra 1 e 2 maior e menor produção de proinsulina

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
amostra	1	0.85353	0.85353	291.79	6.889e-05*
Residuals	4	0.01170	0.00293		



Anexo 3 - Figura 3. Gráficos de resíduos - mostra análise estatística de comparação entre as biomassas da amostra 1 e 2 maior e menor produção de proinsulina.