

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ACTIVINA A EM *KOMAGATAELLA PHAFFII*: EXTENSÃO DO PERÍODO DE INDUÇÃO E USO DE SORBITOL

Stephany Gonçalves dos Santos^{1 e 2}, Ana Beatriz Ribeiro Silva¹, e Ivan Carlos dos Santos^{1 e 2}

¹Laboratório de Biomoléculas e Biofármacos, Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de São João del-Rei

²Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM), Universidade Federal de São João del-Rei

santosgstephany@aluno.ufsj.edu.br

RESUMO

INTRODUÇÃO: A activina A é proteína com grande potencial biotecnológico, podendo ser utilizada em diversas áreas, sendo sua produção recombinante extremamente benéfica. **OBJETIVO:** Neste projeto foi analisado a extensão do período de indução da expressão de activina A associada ao uso de sorbitol em *Komagataella phaffii*. **MÉTODOS:** Foi usada uma cepa recombinante de *K. phaffii* para expressar a proteína sob o controle do promotor AOX1. As células foram pré-cultivadas em meio YPD e transferidas para meio BSM. Durante a fase de indução, que variou de 48 a 96 horas, sorbitol (100 g/L) foi adicionado. A presença da activina A na amostra foi confirmada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração por prata. Ademais, a proteína foi quantificada utilizando o método de Bradford. **CONCLUSÃO:** A extensão do período de indução com sorbitol foi positiva, gerando um aumento na produção de 55% comparado ao controle. Desse modo, o sorbitol surge como um agente importante no aumento da produtividade das proteínas recombinantes.

Palavras-chave: Proteínas Recombinantes; Sorbitol; Activina A; *Komagataella phaffii*.

INTRODUÇÃO

A activina A (actA) desencadeia uma série de eventos biológicos fundamentais, incluindo a regulação do ciclo celular, do sistema imunológico e regeneração tecidual, o que a torna alvo importante na pesquisa científica para desenvolver terapias e diagnósticos inovadores (Bloise *et al.*, 2019; Ries *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2022; Barber *et al.*, 2023).

No entanto, sua obtenção é complexa e cara, pois é produzida naturalmente em células específicas, exigindo técnicas de isolamento de tecidos, o que dificulta sua investigação (Hajihassan *et al.*, 2021). A produção de proteínas recombinantes (PR) oferece alternativa

promissora, permitindo produção consistente em larga escala, garantindo qualidade e eficácia. Além disso, sua purificação é mais simples, o que diminui a presença de impurezas comparadas às produzidas a partir de fontes naturais (Jefferis, 2021; Pollet *et al.*, 2021).

A levedura *Komagataella phaffi* é uma hospedeira ideal para a produção de PR devido a sua capacidade de crescer até altas densidades, secretar proteínas dobradas e funcionais e seu promotor AOX1 (álcool oxidase I), induzido por metanol (Yamada *et al.*, 1995; Wollborn *et al.*, 2022). Apesar disso, desafios como regulação inadequada da expressão gênica, instabilidade da proteína e baixo rendimento de produção permanecem, sendo necessária a otimização das condições de cultivo (Türkanoğlu Özçelik *et al.*, 2019; Bustos *et al.*, 2022; Brabander *et al.*, 2023).

Uma proposta interessante é o uso de sorbitol, fonte de carbono pouco redutora e não repressiva para o promotor AOX1, como co-substrato. A alimentação mista de sorbitol/metanol leva a redução do consumo de oxigênio e da produção de calor, beneficiando o crescimento de biomassa e a produtividade proteica (Azadi *et al.*, 2017, 2018; Chen *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2022, 2023). Isso também abre a possibilidade de estender o período de indução, que normalmente não é vantajoso, pois após certo tempo de indução, devido a presença de proteases liberadas pelas leveduras, há maior taxa de degradação da proteína de interesse do que de sua expressão, com o sorbitol a levedura pode utilizar a fonte não repressora para crescimento de biomassa, enquanto secreta a PR pela indução com metanol, permitindo estender o processo sem afetar negativamente a produção, já que com mais biomassa haverá maior produção, que pode superar a taxa de degradação.

No entanto, cada proteína apresenta desafios específicos em relação à expressão, tornando crucial o desenvolvimento de estratégias personalizadas de bioprocessamento (Contesini *et al.*, 2020; Gordeeva *et al.*, 2022; Besleaga *et al.*, 2023).

Tendo isso em vista, este projeto concentrou-se na avaliação da expressão da actA em protocolo modificado, utilizando sorbitol durante um período de indução estendido. Se investigou como a modificação das condições de indução influenciam a produção da actA, proteína de interesse devido à múltiplas funções biológicas e aplicações terapêuticas.

METODOLOGIA

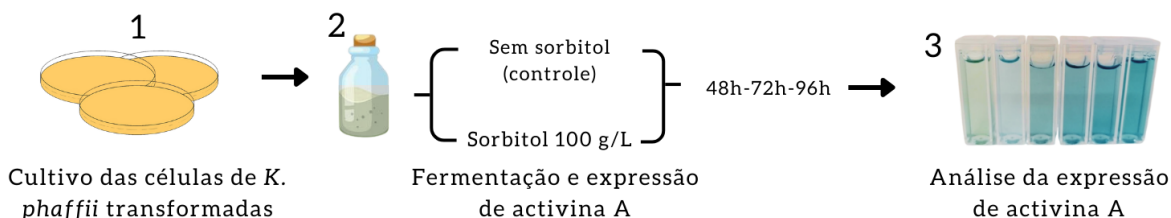


Figura 1: procedimentos do experimento. Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

Cultivo das células de *K. phaffii* transformadas: O procedimento de cultivo e fermentação segue o protocolo “EasySelect™Pichia Expression Kit” estabelecido pela Thermo Fisher Scientific, com modificações (Figura 1). Os clones (cAct) capazes de expressar a actA, de propriedade da Proteobras Desenvolvimento Biotecnológico Ltda., foram fornecidos em parceria pela empresa. O meio sólido YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2% e ágar 3%) foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 120 °C e 20 mL foram vertidos em placas de Petri, que foram estriadas com 20 µL do cAct e incubadas a 30°C por 48 horas.

Fermentação e expressão da actA: O meio líquido BSM (basal salts medium) foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 120 °C e, após o resfriamento, foi feita a transferência dos cAct para do YPD para BSM (5 placas para 300 mL), suplementado com de solução de minerais traços (PTM1, 4,35 mL/L). Os cAct foram cultivados sob agitação a 250xg e 30°C por 48 horas. Após isso foi feita a indução a cada 12 horas com adição de metanol (0,5%) e PTM1 (12 mL por litro de metanol), bem como sorbitol (100g/L, definido com base em experimentos anteriores) uma vez ao dia entre as induções. O período de indução variou entre os grupos: Grupo 1: 48 horas (padrão); Grupo 2: 72h e Grupo 3: 96h. Todo o processo da adição de soluções foi feito em capela de fluxo laminar com materiais esterilizados com álcool 70% e luz ultravioleta (20 minutos). Ao final do processo, o fermentado foi submetido à centrifugação por 20 minutos à 4.000xg para separação das células e, ao final do ciclo, retirou-se o sobrenadante, que foi transferido para filtros de ultracentrifugação (Amicon®) de 10 kDa, para concentração e diálise com tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0.

Análises: O material foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), em escala analítica, na concentração de 12,5%, para identificação da actA feita por comparação de seu fator de migração com os de proteínas padrão de massas conhecidas. A quantificação do conteúdo proteico foi realizada pelo método de Bradford, baseado na

ligação do corante, coomassie brilliant blue (G-250), à amostra de proteína, e na comparação desta ligação com uma curva padrão gerada pela reação de quantidades conhecidas da proteína padrão, albumina sérica bovina (Bradford, 1976). O experimento foi realizado em duplicata, a fim de se obter valores médios de maior precisão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suplementação sorbitol/metanol foi positiva em na expressão da actA em *K. Phaffii* (figura 2), especialmente na estratégia de indução estendida. Foi feita a adição de sorbitol em um grupo na concentração 100 (g/L) e observado sua expressão em comparação ao controle em 3 estratégias de indução (48, 72 e 96 horas).

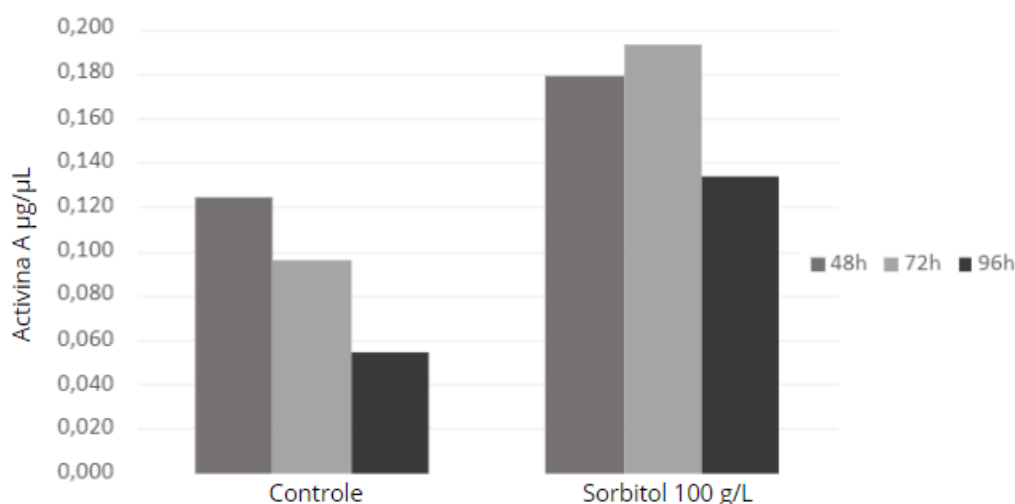


Figura 2- Produção de activina A (µg/µL) ao longo do período de indução estendido (de 24 a 96h). Um dos grupos recebeu suplementação com sorbitol (100 g/L). Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

A indução por 72 horas suplementada por sorbitol 100 g/L foi a mais eficiente, visto que gerou aumento aproximado de 55% comparado a maior expressão obtida no grupo controle (48h), além disso, ela também é superior a expressão obtida com a suplementação de sorbitol às 48 horas em cerca de 8,5%, mostrando que a extensão do período de indução foi positiva na otimização do processo. Essa relação positiva não é observada no grupo controle devido a fatores como consumo de oxigênio e produção de calor (Ali *et. al*, 2019) e principalmente a degradação da actA pelas proteases liberadas pela *K.phaffii*. A melhora do processo com a utilização do sorbitol revela que os problemas envolvendo a oxidação do metanol podem ser atenuados, o que potencializou a produção de actA recombinante.

Na literatura, podemos encontrar estudos que demonstram a ação do sorbitol, como o da equipe de Azadi (2017), que demonstrou resultados significativos com sorbitol 60 g/L, atingindo aumento de 99,4%. Já o estudo da equipe de Chen (2017) alcançou aumento de 80,9% na produção do precursor de insulina suína com sorbitol 50 g/L. Na estratégia relatada por Celik e colaboradores (2009), utilizando sorbitol 50 g/L, houve aumento de 62,5% na produção de hormônio de crescimento humano recombinante. Outros estudos já alcançaram taxas melhores utilizando concentrações mais baixas, como o da equipe de Li (2013) que alcançou 101% na produção de β -galactosidase derivada de metagenoma com sorbitol 20 g/L.

Essa variação se dá por diversos fatores, como variações de clones, linhagens e características da proteína de interesse (Contesini *et al.*, 2020; Gordeeva *et al.*, 2022; Offei *et al.*, 2022). Bem como as estratégias de co-alimentação, incluindo o momento da adição de sorbitol, também podem afetar significativamente os resultados (García Ortega *et al.*, 2019; Brabander *et al.*, 2023). Essa variação de estratégias ocorre, em parte, pois a descrição detalhada sobre a alimentação de sorbitol na fermentação é escassa na literatura.

Além disso, o equipamento de cultivo é fator crucial. Biorreatores e frascos oferecem diferentes níveis de controle sobre as condições do ambiente. Os experimentos em frascos podem ser mais sensíveis às variações nas condições ambientais, tornando o desenvolvimento de estratégias de otimização ainda mais vital. A maior parte da literatura disponível é voltada ao uso de biorreatores, sendo que entre os estudos citados anteriormente apenas o de Li e colaboradores (2013) detalha a co-alimentação na fermentação em frascos. Compreender essas variações e adequar o experimento a elas é essencial para maximizar a produtividade do sistema de expressão de proteína e garantir a qualidade do produto final.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de sorbitol mostra-se uma estratégia eficaz na produção de actA recombinante, sendo a extensão do período de indução por 72 horas uma abordagem promissora. A produção de actA suplementada com sorbitol foi superior ao controle em todos os períodos, sendo que período com maior otimização da produção foi o de 72 horas, em 55%. Os dados obtidos destacam a importância de realizar experimentos de otimização para garantir a maximização da produtividade, tornando estudos relacionados a actA mais viáveis.

REFERÊNCIAS

- ALI, N.; ZHANG, Q.; LIU, Z. Y.; LI, F. L.; LU, M.; FANG, X. C. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 2, p. 455–473, 1 jan. 2020.
- AZADI, S.; MAHBOUBI, A.; NAGHDI, N.; SOLAIMANIAN, R.; MORTAZAVI, S. A. Evaluation of Sorbitol-Methanol Co-Feeding Strategy on Production of Recombinant Human Growth Hormone in *Pichia Pastoris*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR**, v. 16, n. 4, p. 1555, 1 set. 2017.
- BARBER, C. V.; YO, J. H.; RAHMAN, R. A.; WALLACE, E. M.; PALMER, K. R.; MARSHALL, S. A. Activin A and pathologies of pregnancy: a review. **Placenta**, v. 136, p. 35–41, 1 maio 2023.
- BESLEAGA, M.; VIGNOLLE, G. A.; KOPP, J.; SPADIUT, O.; MACH, R. L.; MACH-AIGNER, A. R.; ZIMMERMANN, C. Evaluation of reference genes for transcript analyses in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 1 dez. 2023.
- BLOISE, E.; CIARMELA, P.; CRUZ, C. DELA; LUISI, S.; PETRAGLIA, F.; REIS, F. M. Activin A in Mammalian Physiology. **Physiological reviews**, v. 99, n. 1, p. 739–780, 1 jan. 2019.
- BRABANDER, P.; UITTERHAEGEN, E.; DELMULLE, T.; WINTER, K. DE; SOETAERT, W. Challenges and progress towards industrial recombinant protein production in yeasts: A review. **Biotechnology Advances**, v. 64, p. 108121, 1 maio 2023.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BUSTOS, C.; QUEZADA, J.; VEAS, R.; ALTAMIRANO, C.; BRAUN-GALLEANI, S.; FICKERS, P.; BERRIOS, J. Advances in Cell Engineering of the *Komagataella phaffii* Platform for Recombinant Protein Production. **Metabolites**, v. 12, n. 4, p. 346, 14 abr. 2022.

ÇELİK, E.; ÇALIK, P.; OLIVER, S. G. Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co substrate sorbitol. **Yeast**, v. 26, n. 9, p. 473–484, 1 set. 2009.

CHEN, L.; MOHSIN, A.; CHU, J.; ZHUANG, Y.; LIU, Y.; GUO, M. Enhanced Protein Production by Sorbitol Co-feeding with Methanol in Recombinant *Pichia pastoris* Strains. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 767–773, 2017.

CONTESINI, F. J.; DAVANÇO, M. G.; BORIN, G. P.; VANEGAS, K. G.; CIRINO, J. P. G.; MELO, R. R. DE; MORTENSEN, U. H.; HILDÉN, K.; CAMPOS, D. R.; CARVALHO, P. DE O. Advances in Recombinant Lipases: Production, Engineering, Immobilization and Application in the Pharmaceutical Industry. **Catalysts**, v. 10, n. 9, p. 1032, 9 set. 2020.

GARCÍA-ORTEGA, X.; CÁMARA, E.; FERRER, P.; ALBIOL, J.; MONTESINOS-SEGUÍ, J. L.; VALERO, F. Rational development of bioprocess engineering strategies for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) using the methanol-free GAP promoter. Where do we stand? **New Biotechnology**, v. 53, p. 24–34, 25 nov. 2019.

GORDEEVA, T. L.; BORSCHEVSKAYA, L. N.; FEDAY, T. D.; TKACHENKO, A. A.; SINEOKY, S. P. The Expression Potential of Novel *Komagataella* Strains. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 916–922, 1 dez. 2022.

HAJIHASSAN, Z.; NAZARI, N.; ARMAGHAN, F. Improved Production of Recombinant Human Activin A in *Escherichia coli*. **Journal of Sciences**, Islamic Republic of Iran, v. 32, n. 3, p. 205–211, 1 set. 2021.

JEFFERIS, R. Recombinant Proteins and Monoclonal Antibodies. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 175, p. 281–318, 2021.

LI, C.-J.; ZHANG, X.; ZHANG, L.-P.; WANG, A.; MAO, R.-Q.; LI, G. Medium optimization for the production of a metagenome-derived β -galactosidase by *Pichia pastoris* using response surface methodology. **African Journal of Microbiology**, v. 7, n. 13, p. 1077–1085, 2013.

LIU, B.; CONG, W.; ZHAO, Y.; ZHOU, H.; ZHANG, J. An inducible *Komagataella phaffii* system for protein expression using sorbitol dehydrogenase promoter. **Biotechnology Letters**, p. 1–11, 19 abr. 2023a.

OFFEI, B.; BRAUN-GALLEANI, S.; VENKATESH, A.; CASEY, W. T.; O’CONNOR, K. E.; BYRNE, K. P.; WOLFE, K. H. Identification of genetic variants of the industrial yeast *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) that contribute to increased yields of secreted heterologous proteins. **PLOS Biology**, v. 20, n. 12, p. e3001877, 1 dez. 2022.

POLLET, J.; CHEN, W. H.; STRYCH, U. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 170, p. 71–82, 1 mar. 2021.

PA5-47004: Thermo Fisher. Disponível em:

<<https://www.thermofisher.com/antibody/product/Activin-A-Antibody-Polyclonal/PA5-47004>>. Acesso em: 30 mar. 2024.

RIES, A.; SCHELCH, K.; FALCH, D.; PANY, L.; HODA, M. A.; GRUSCH, M. Activin A: an emerging target for improving cancer treatment? **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, 2 out. 2020.

TÜRKANOĞLU ÖZÇELİK, A.; YILMAZ, S.; INAN, M. *Pichia pastoris* promoters. **Methods in Molecular Biology**, v. 1923, p. 97–112, 2019.

WANG, B.; NESBETH, D.; KESHAVERZ-MOORE, E. Sorbitol/methanol mixed induction reduces process impurities and improves centrifugal dewatering in *Pichia pastoris* culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 130, p. 109366, 1 nov. 2019.

WOLLBORN, D.; MUNKLER, L. P.; HORSTMANN, R.; GERMER, A.; BLANK, L. M.; BÜCHS, J. Predicting high recombinant protein producer strains of *Pichia pastoris* MutS using the oxygen transfer rate as an indicator of metabolic burden. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2 jul. 2022.

WONG, G. P.; ANDRES, F.; WALKER, S. P.; MACDONALD, T. M.; CANNON, P.; NGUYEN, T. V.; KEENAN, E.; HANNAN, N. J.; TONG, S.; KAITU’U-LINO, T. J.

Circulating Activin A is elevated at 36 weeks' gestation preceding a diagnosis of preeclampsia. **Pregnancy Hypertension**, v. 27, p. 23–26, 1 mar. 2022

YAMADA, Y.; MATSUDA, M.; MAEDA, K.; MIKATA, K. The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (Saccharomycetaceae). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 3, p. 439–444, 1 jan. 1995.