Oportunidade de Nucleação de Novos Projetos de Pesquisa

DPDE/IPEN no. 4/2017

Expressão, purificação e caracterização do antagonista de prolactina humana delta 1-9 G129R-hPRL recombinante em bactérias *Escherichia coli*

Pesquisa Científica

Programa 8 - BIOTECNOLOGIA

Atividade 810 - Hormônios Hipofisários

Proponente/Coordenador: Dra. Miriam Fussae Suzuki

Centro de Biotecnologia

2017

1. Identificação da atividade e programa

O presente projeto de pesquisa pode ser incluído na atividade 810 Hormônios Hipofisários do Programa 8 de BIOTECNOLOGIA do IPEN – CNEN/SP.

2. Principal problema a ser abordado

As proteínas recombinantes podem ser classificadas conforme o organismo utilizado para a sua expressão. No caso de proteínas humanas, elas podem ser expressas em bactérias, leveduras, células vegetais e animais desde que transformados ou transfectados com vetores contendo o gene da proteína de interesse. A escolha do hospedeiro depende basicamente de três fatores: presença de glicosilação, rendimento de expressão e finalidade (1).

No caso de hormônios hipofisários, o domínio da tecnologia de expressão, tanto em bactérias como em células de mamíferos, já existe no IPEN como pode ser comprovado nas publicações do grupo em periódicos e patentes (2-5). O hormônio do crescimento (hGH), a prolactina (hPRL) e seus antagonistas (G120R-hGH, G129R-hPRL, S179D-hPRL) já foram expressos, purificados e caracterizados por técnicas físico-químicas e imunológicas, além da análise da atividade biológica (6, 7). Essas proteínas já foram utilizadas por pesquisadores da USP (8) que demonstraram interesse em outras proteínas como a leptina e o hormônio do crescimento de camundongo.

A prolactina humana é uma molécula proteica da família das citocinas com massa molecular de 23 kDa e 199 aminoácidos (9). Ela é produzida pelas células da hipófise e sua expressão é aumentada durante a lactação (10). Além da lactação, a prolactina tem como função agir no controle do sistema imune, hematopoiese, formação de vasos e trombos (11). A concentração sérica normal é de 5 a 20 ng/mL. Esta poderá alterar nos casos de alterações menstruais,

estresse, tumores da hipófise, galactorréia, infertilidade e hipogonadismo (12). Também o uso de medicamentos antipsicóticos, antidepressivos, anti-hipertensivos, estrógenos e outros podem levar a hiperprolactinemia. Já os antagonistas de dopamina como a bromocriptina diminuem a concentração sérica da prolactina (13). Embora tenha importância diagnóstica, não há uso terapêutico da prolactina aprovado (14). Estudos clínicos fase 2 foram feitos nos EUA para uso na indução da produção de leite (lactação) com resultados positivos (15, 16).

Entre os antagonistas de prolactina, uma das mais promissoras é a delta 1-9 G129R-hPRL que além da substituição da arginina na posição 129 pela glicina que impede a ligação da molécula ao segundo receptor de prolactina, teve deletado os primeiros 9 aminoácidos anulando qualquer atividade proliferativa residual mesmo em concentrações 10 vezes maiores que a da prolactina circulante (17-19). A atividade antiproliferativa foi verificada em vários tipos celulares como as de próstata, mama, pele e células neuronais de camundongos, ratos e humanos (20). Estes tecidos apresentam receptores de prolactina que se ligam à prolactina circulante e também produzem PRL localmente o que chamamos de ação autócrina e parácrina (9). O uso de anticorpo antiprolactina reduz a prolactina circulante, mas não age sobre a produção local. Em tumores onde há superexpressão de receptores de prolactina, o uso do delta 1-9 G129R-hPRL poderia impedir a ligação da PRL aos receptores e ter ação antiproliferativa local (14, 21, 22).

Muitas das moléculas antitumorais promissoras foram estudadas em culturas de células em modelo 2D *in vitro* e não tiveram comprovação de sua ação em modelos animais. Em alguns casos, quando a ação antiproliferativa foi comprovada em culturas em modelo 3D, houve comprovação no modelo animal, pois o microambiente é mais fiel ao modelo *in vivo* (23).

Este projeto tem como objetivo a produção da molécula delta 1-9 G129R-hPRL recombinante para ser testada futuramente em modelos tumorais 3D de câncer de mama e de próstata em desenvolvimento pelo pesquisador Dr. Daniel Perez Vieira em nosso Centro de Biotecnologia.

3. Objetivos

Obter a proteína delta 1-9 G129R-hPRL recombinante com pureza superior a 80%, em quantidade superior a 1 mg com atividade biológica *in vitro*.

4. Metodologia a ser empregada

A produção será feita em bactérias *E. coli* transformadas com o vetor contendo o cDNA da proteína delta 1-9 G129R-hPRL no periplasma bacteriano (24, 25), em escala laboratorial, em erlenmeyers e em biorreator (2, 4, 5). A purificação será conduzida em duas etapas cromatográficas seguindo protocolo da prolactina humana (cromatografia por afinidade a metais – IMAC e exclusão molecular – Sephacryl S100) (4). As condições como pH e gradiente de eluição poderão sofrer alterações pois a alteração de um aminoácido na proteína pode alterar as características físico-químicas (3). A caracterização será feita por meio de SDS-PAGE, Western Blotting (26), HPLC (27), espectrometria de massas (5) e ensaio biológico com células BaF-LLP *in vitro* (6, 12).

A sequência do cDNA do antagonista delta 1-9 G129R-hPRL contendo os sítios para as enzimas de restrição NdeI e BamHI será introduzido no cassete de expressão, desenvolvido em nosso laboratório, que contém o promotor λPL e o gene para resistência a ampicilina.

Foram desenhados dois oligonucleotídeos para a construção deste plasmídeo a partir do plasmídeo já existente no laboratório do antagonista G129R-hPRL que será utilizado como DNA molde para a reação de PCR.

Primer forward:

5’ GGAATTCCATATGCGATCCCAGGTGACCCTTCG 3’

Primer reverse:

5’ TTCGGATCCTTATCAGCAGTTGTTGT 3’

Após a amplificação por PCR, o fragmento será digerido com as enzimas de restrição NdeI e BamHI, purificado e ligado ao plasmídeo λPL por meio da reação com a enzima T4 DNA ligase. As bactérias *Escherichia coli* cepa DH5α serão transformadas por choque térmico e as colônias que crescerem em placa contendo ampicilina (1 µg/mL) serão selecionadas por meio de PCR e análise de restrição após amplificação dos plasmídeos por kit de miniprep.

A sequência de nucleotídeos (573 bases) e os aminoácidos (191 aminoácidos) correspondentes a serem confirmados por sequenciamento a ser realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (IB-USP) serão os apresentados na Figura 1.

```
>delta 1 9

1     ATG CGA TCC CAG GTG ACC CTT CGA GAC CTG TTT GAC CGC GCC GTC   45
1      M   R   S   Q   V   T   L   R   D   L   F   D   R   A   V    15

46    GTC CTG TCC CAC TAC ATC CAT AAC CTC TCC TCA GAA ATG TTC AGC   90
16     V   L   S   H   Y   I   H   N   L   S   S   E   M   F   S    30

91    GAA TTC GAT AAA CGG TAT ACC CAT GGC CGG GGG TTC ATT ACC AAG   135
31     E   F   D   K   R   Y   T   H   G   R   G   F   I   T   K    45

136   GCC ATC AAC AGC TGC CAC ACT TCT TCC CTT GCC ACC CCC GAA GAC   180
46     A   I   N   S   C   H   T   S   S   L   A   T   P   E   D    60

181   AAG GAG CAA GCC CAA CAG ATG AAT CAA AAA GAC TTT CTG AGC CTG   225
61     K   E   Q   A   Q   Q   M   N   Q   K   D   F   L   S   L    75

226   ATA GTC AGC ATA TTG CGA TCC TGG AAT GAG CCT CTG TAT CAT CTG   270
76     I   V   S   I   L   R   S   W   N   E   P   L   Y   H   L    90

271   GTC ACG GAA GTA CGT GGT ATG CAA GAA GCC CCG GAG GCT ATC CTA   315
91     V   T   E   V   R   G   M   Q   E   A   P   E   A   I   L    105

316   TCC AAA GCT GTA GAG ATT GAG GAG CAA ACC AAA CGG CTT CTA GAG   360
106    S   K   A   V   E   I   E   E   Q   T   K   R   L   L   E    120

361   CGC ATG GAG CTG ATA GTC AGC CAG GTT CAT CCT GAA ACC AAA GAA   405
121    R   M   E   L   I   V   S   Q   V   H   P   E   T   K   E    135

406   AAT GAG ATC TAC CCT GTC TGG TCG GGA CTT CCA TCC CTG CAG ATG   450
136    N   E   I   Y   P   V   W   S   G   L   P   S   L   Q   M    150

451   GCT GAT GAA GAG TCT CGC CTT TCT GCT TAT TAT AAC CTG CTC CAC   495
151    A   D   E   E   S   R   L   S   A   Y   Y   N   L   L   H    165

496   TGC CTA CGC AGG GAT TCA CAT AAA ATC GAC AAT TAT CTC AAG CTC   540
166    C   L   R   R   D   S   H   K   I   D   N   Y   L   K   L    180

541   CTG AAG TGC CGA ATC ATC CAC AAC AAC AAC TGC TGA TAA          585
181    L   K   C   R   I   I   H   N   N   N   C   *   *
```

Figura 1. Sequencia de nucleotídeos e aminoácidos da construção do plasmídeo para expressão do antagonista delta 1-9 G129R-hPRL.

Após confirmação da correta construção, o plasmídeo será amplificado com kit de miniprep e introduzido por choque térmico das cepas de expressão W3110 e RRI de *Escherichia coli*.

O crescimento dos clones será realizado a 30 °C até uma densidade óptica máxima (A_{600} 3,0), seguida da elevação da temperatura para expressão da proteína, por um período de 6 horas. Serão comparadas diferentes temperaturas:

30 °C, 32 °C, 35 °C e 37 °C. Nesse estudo o promotor atuará de forma constitutiva sem repressor. O resultado desta etapa definirá a melhor cepa e condições de cultivo para expressão do antagonista em erlenmeyer (produção de 1 L de meio se produtividade acima de 1 µg/mL/A_{600}) ou no biorreator (produção de 5 L de meio se produtividade abaixo de 1 µg/mL/A_{600}).

A eletroforese em gel de poliacrilamida 15% com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em condição não-reduzida será realizada em todas as etapas de produção e purificação. Para a coloração será utilizado Coomassie Brilliant Blue G-250 após fixação com metanol 40% e ácido acético 10%. Será possível confirmar a presença de proteína na região esperada em comparação ao marcador de massa molecular e ao padrão interno de hPRL.

Para a realização do Western Blotting, será seguida basicamente a técnica de transferência semi-seca para membrana de nitrocelulose. A membrana será incubada com o soro anti-prolactina humana produzido em coelho (1:25.000) overnight e após lavagens, com o anticorpo secundário produzido em cabra contra IgG de coelho conjugado à HRP (1:10.000) incubado por uma hora e revelado com luminol (Luminata, Millipore). Esta etapa é importante, pois haverá o reconhecimento da proteína pelo anticorpo específico para hPRL.

O sistema de HPLC do CB – IPEN é da marca Shimadzu Modelo SCL-10 A, acoplado a um detector de UV SPD-10 AV (Shimadzu, MD, EUA), controlado pelo software Class VP, também da Shimadzu.

Para RP-HPLC será utilizada uma coluna C4 Vydac 214TP54 (25 cm x 4,6 mm ID, diâmetro dos poros de 300 Å e diâmetro das partículas de 5 µm). Para a proteção da coluna principal, uma coluna de sílica empacotada com LiChrosorb Si-60, 7,9-12,4 µm (Merck, Darmstadt, Alemanha) é instalada entre a bomba e o injetor. A fase móvel consistirá em tampão Tris-HCl 71% (50 mM, pH 7,5) e n-propanol 29%. O fluxo será de 0,5 mL/min, com leitura do detector no comprimento de onda de 220 nm. A temperatura da coluna será mantida a 45° C e o volume máximo da amostra aplicado será de 500 µL. Esperamos obter um pico com tempo de retenção próximo ao da prolactina humana padrão que é de 28

minutos nestas condições. A hidrofobicidade geralmente é alterada com a troca e deleção de aminoácidos. Já observamos diferenças de 5 minutos em relação ao padrão com a presença de uma metionina a mais na cadeia de aminoácidos no caso da prolactina murina (28).

Para HPSEC será utilizada uma coluna de aço inoxidável TSK G2000 SW (60 cm x 7,5 mm I.D., com tamanho das partículas de 10 μm e tamanho dos poros de 125 Å) (TosoHaas, Montgomeryville, PA, EUA) acoplada a uma pré-coluna TSK SW de 7,5 cm x 7,5 mm I.D. A fase móvel será constituída de bicarbonato de amônio 0,025 M, pH 7,0 ajustado com ácido fosfórico 2%. O fluxo será de 1,0 mL/min e o comprimento de onda de 220 nm. O produto final purificado do antagonista deverá ter tempo de retenção semelhante ao da hPRL, pois a ausência de 9 aminoácidos deverá aumentar o tempo de retenção nestas condições.

A análise por espectrometria de massas é realizada pela empresa CEMSA. Para essa determinação é utilizado um espectrômetro híbrido (MS/MS) (3200 QTrap, AB Sciex), acoplado a um HPLC Agilent 1260 e leitor UV-VIS (1290), uma coluna cromatográfica Jupiter C4 (250 mm x 4,6 mm) com poros de 5,0 µM e diâmetro de 300 Å (Phenomenex, Torrance, CA, USA), com fluxo de 0,6 mL/min, a temperatura de 60 °C. A fase móvel A consistirá em água 95%, acetonitrila 5% e TFA 0,1% e a fase móvel B de acetonitrila 95%, água 5% e TFA 0,1%. O modo de aquisição será o eletrospray positivo - MS. Resultados anteriores comprovaram que 200 µL de proteína purificada na concentração de 500 µg/mL são suficientes para a análise com precisão de 0,05%.

Os ensaios de proliferação celular serão realizados com a linhagem BaF-LLP cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 com adição de soro fetal bovino 10% e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Estas células foram selecionadas para responder a concentração de 1 ng/mL de prolactina, em placas de 96 poços, com 10.000 células/poço em 200 µl de meio de cultura incluindo-se a amostra. Serão avaliados os efeitos de inibição de concentrações crescentes do antagonista (10 – 1000 ng/mL) no crescimento celular na presença da hPRL (1

ng/mL). A leitura será feita na absorbância de 490 nm após adição de MTS/PMS. Brevemente, 2 mg/mL de MTS [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolina (Promega Corp., Madison, WI, USA)] dissolvidos em solução fosfato-salina (PBS) foram misturados na proporção de 20:1 (v/v) com fenazina metosulfato (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), 0,92 mg/mL em PBS. Vinte microlitros da mistura serão adicionados a cada poço e após 2 h de incubação a 37° C a absorbância será lida no comprimento de onda de 490 nm utilizando-se um leitor de microplacas (Thermo Electron Corporation, Multiscan EX, Shangai, China). É importante salientar que resultados antiproliferativos são esperados já nesta fase de cultura em suspensão como já relatado na literatura neste ensaio clássico, podendo ser comparado com outros antagonistas já produzidos por esta equipe (G120R-hGH e G129R-hPRL).

5. Principais contribuições científicas ou tecnológicas da proposta

Os estudos de expressão, purificação e caracterização da proteína delta 1-9 G129R-hPRL poderão ser publicados em periódicos internacionais e possibilitar a continuação das pesquisas com culturas de células tumorais em 3D como colaboração interna (CB – IPEN) e despertar o interesse de outros grupos por este antagonista que estudam a ação da prolactina no sistema nervoso central e imune (29-31).

6. Orçamento estimado

Etapa	Materiais/Serviços	Custo materiais/reagentes
Construção do plasmídeo	Enzimas de restrição Enzima de ligação Antibiótico ampicilina Marcadores de DNA Microtubos de 0,6 e 1,5 mL Reagentes para PCR Oligômeros para PCR Kit para miniprep e midiprep Reagentes para gel de agarose Sequenciamento de DNA Tubos plásticos com tampa de 15 mL e 50 mL estéreis	R$5.000,00
Produção da proteína	Meios de cultura LB Antibiótico ampicilina Bactérias competentes DH5α, W3110 e RRI Criotubos de 2 mL Tubos de 400 mL autoclaváveis Erlenmeyers de 1 L	R$3.000,00
Purificação da proteína	Colunas e resinas cromatográficas	R$10.000,00
Caracterização da proteína	Reagentes para gel de SDS-PAGE, Western Blotting e HPLC Marcadores de proteína Anticorpo primário Anticorpo secundário Membrana de nitrocelulose Análise por espectrometria de massas Reagentes para cultura de células BaF-LLP	R$10.000,00
Publicação	Revisão inglês	

Etapa	Equipamentos	Custo equipamentos
Construção do plasmídeo	Cuba e fonte de eletroforese Centrífuga para microtubos Termociclador Vortex Balanças Freezer – 20 °C	Já adquiridos no CB
Produção da proteína	Shaker com agitação de 200 rpm e para temperatura até 37 °C Centrífuga refrigerada até 4 °C com capacidade para tubos de 400 mL e rotação de 9000 rpm Geladeira Freezer – 80 °C	Já adquiridos no CB
Purificação da proteína	Equipamento e software de purificação FPLC – AKTA Geladeira	Já adquiridos no CB
Caracterização da proteína	Cuba e fonte de eletroforese Equipamento e software de cromatografia líquida de alto desempenho HPLC Banho-maria Microscópio Leitor de placas de 96 poços Incubadora CO_2	Já adquiridos no CB
Publicação	Microcomputador e software de análise estatística e tratamento de dados, compilação de referências e figuras de alta definição para publicação Impressora	Já adquiridos no CB

7. Cronograma

Etapa	1º. Semestre	2º. Semestre	3º. Semestre	4º. Semestre
Construção do plasmídeo	xxxx			
Produção da proteína		xxxx		
Purificação da proteína		xxxx	xxxxx	
Caracterização da proteína			xxxxx	xxxx
Publicação				xxxx
Revisão bibliográfica	xxxx	xxxx	xxxx	xxxx

8. Identificação dos demais participantes do projeto

Dr. Carlos Roberto Jorge Soares

Dr. Paolo Bartolini

Dra. Regina Affonso

Dr. João Ezequiel de Oliveira

Aluno de iniciação científica

Renan Passos Freire

Aluno de mestrado

Felipe Douglas Silva

9. Disponibilidade efetiva de infraestrutura e de apoio técnico para o desenvolvimento do projeto, estimativa dos recursos financeiros de outras fontes, se pertinente e anuência do responsável pela unidade do IPEN (documento em anexo)

O Centro de Biotecnologia do IPEN/CNEN-SP tem efetiva disponibilidade de infraestrutura e equipamentos adequados, com o Certificado de Qualidade em Biossegurança (N° CQB 0057/98).

Principais laboratórios:

- ✓ Laboratório de cultura celular
- ✓ Laboratório de biologia molecular
- ✓ Laboratório de purificação de proteínas
- ✓ Laboratório de eletroforese
- ✓ Laboratório de HPLC
- ✓ Sala de preparo de materiais e reagentes
- ✓ Sala de lavagem de material

10. Referências bibliográficas

1. **Hunt I** 2005 From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. Protein Expr Purif 40:1-22
2. **Morganti L, Soares CR, Affonso R, Gout PW, Bartolini P** 1998 Synthesis and characterization of recombinant, authentic human prolactin secreted into the periplasmic space of Escherichia coli. Biotechnol Appl Biochem 27 (Pt 1):63-70
3. **Soares CR, Camargo IM, Morganti L, Gimbo E, Ezequiel de Oliveira J, Legoux R, Ferrara P, Bartolini P** 2002 Reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of prolactin in bacterial extracts and in its purified form. Journal of chromatography A 955:229-236
4. **Soares CR, Ueda EK, Oliveira TL, Gomide FI, Heller SR, Bartolini P** 2008 Distinct human prolactin (hPRL) and growth hormone (hGH) behavior under bacteriophage lambda PL promoter control: temperature plays a major role in protein yields. Journal of biotechnology 133:27-35
5. **Suzuki MF, Arthuso FS, Oliveira JE, Oliveira NAJ, Goulart HR, Capone MVN, Ribela MTCP, Bartolini P, Soares CRJ** 2012 Expression, purification, and characterization of authentic mouse prolactin obtained in Escherichia coli periplasmic space. Biotechnol Appl Bioc 59:178-185
6. **Soares CR, Glezer A, Okazaki K, Ueda EK, Heller SR, Walker AM, Goffin V, Bartolini P** 2006 Physico-chemical and biological characterizations of two human prolactin analogs exhibiting controversial bioactivity, synthesized in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Protein Expr Purif 48:182-194
7. **Menezes A, Suzuki MF, Oliveira JE, Ribela M, Furigo IC, Donato J, Jr., Bartolini P, Soares CRJ** 2017 Expression, purification and characterization of the authentic form of human growth hormone receptor antagonist G120R-hGH obtained in Escherichia coli periplasmic space. Protein Expr Purif 131:91-100
8. **Furigo LC, Donato J, Suzuki MF, Zampieri TT, Pedroso JAB, Lobo AMR, Alencar A, Oliveira JE, Bartolini P, Soares CRJ** 2014 Uncovering the Mechanism of Action of the Anti-Diabetic Effects of Bromocriptine: The Role of Prolactin. Endocrine reviews 35
9. **Sinha YN** 1995 Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. Endocr Rev 16:354-369
10. **Bernichtein S, Touraine P, Goffin V** 2010 New concepts in prolactin biology. J Endocrinol 206:1-11
11. **Ueda E, Ozerdem U, Chen YH, Yao M, Huang KT, Sun H, Martins-Green M, Bartolini P, Walker AM** 2006 A molecular mimic demonstrates that phosphorylated human prolactin is a potent anti-angiogenic hormone. Endocr Relat Cancer 13:95-111
12. **Glezer A, Soares CR, Vieira JG, Giannella-Neto D, Ribela MT, Goffin V, Bronstein MD** 2006 Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. J Clin Endocrinol Metab 91:1048-1055
13. **Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW** 1996 Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. Endocr Rev 17:639-669
14. **Goffin V, Bernichtein S, Touraine P, Kelly PA** 2005 Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. Endocr Rev 26:400-422
15. **Powe CE, Puopolo KM, Newburg DS, Lonnerdal B, Chen C, Allen M, Merewood A, Worden S, Welt CK** 2011 Effects of recombinant human prolactin on breast milk composition. Pediatrics 127:e359-366

16. **Iwama S, Welt CK, Romero CJ, Radovick S, Caturegli P** 2013 Isolated prolactin deficiency associated with serum autoantibodies against prolactin-secreting cells. J Clin Endocrinol Metab 98:3920-3925
17. **Bernichtein S, Jomain JB, Kelly PA, Goffin V** 2003 The N-terminus of human prolactin modulates its biological properties. Mol Cell Endocrinol 208:11-21
18. **Bernichtein S, Kayser C, Dillner K, Moulin S, Kopchick JJ, Martial JA, Norstedt G, Isaksson O, Kelly PA, Goffin V** 2003 Development of pure prolactin receptor antagonists. J Biol Chem 278:35988-35999
19. **Tallet E, Rouet V, Jomain JB, Kelly PA, Bernichtein S, Goffin V** 2008 Rational design of competitive prolactin/growth hormone receptor antagonists. J Mammary Gland Biol Neoplasia 13:105-117
20. **Manhes C, Goffin V, Kelly PA, Touraine P** 2005 Autocrine prolactin as a promotor of mammary tumour growth. The Journal of dairy research 72 Spec No:58-65
21. **Jomain JB, Tallet E, Broutin I, Hoos S, van Agthoven J, Ducruix A, Kelly PA, Kragelund BB, England P, Goffin V** 2007 Structural and thermodynamic bases for the design of pure prolactin receptor antagonists: X-ray structure of Del1-9-G129R-hPRL. J Biol Chem 282:33118-33131
22. **Clevenger CV** 2003 Role of prolactin/prolactin receptor signaling in human breast cancer. Breast disease 18:75-86
23. **Jaganathan H, Gage J, Leonard F, Srinivasan S, Souza GR, Dave B, Godin B** 2014 Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. Scientific reports 4:6468
24. **Dalmora S, de Oliveira JE, Affonso R, Gimbo E, Ribela MT, Bartolini P** 1997 Analysis of recombinant human growth hormone directly in osmotic shock fluids. Journal of chromatography A 782:199-210
25. **Soares CR, Gomide FI, Ueda EK, Bartolini P** 2003 Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the lambdaPL promoter: use of HPLC for product quantification. Protein engineering 16:1131-1138
26. **Heller SR, Rodrigues Goulart H, Arthuso FS, Oliveira TL, Bartolini P, Soares CR** 2010 Synthesis, purification and characterization of recombinant glycosylated human prolactin (G-hPRL) secreted by cycloheximide-treated CHO cells. J Biotechnol 145:334-340
27. **de Oliveira JE, Soares CR, Peroni CN, Gimbo E, Camargo IM, Morganti L, Bellini MH, Affonso R, Arkaten RR, Bartolini P, Ribela MT** 1999 High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in Escherichia coli periplasmic space. Journal of chromatography A 852:441-450
28. **Suzuki MF, Arthuso FS, Oliveira JE, Oliveira NA, Goulart HR, Capone MV, Ribela MT, Bartolini P, Soares CR** 2012 Expression, purification, and characterization of authentic mouse prolactin obtained in Escherichia coli periplasmic space. Biotechnol Appl Biochem 59:178-185
29. **Ferraris J, Bernichtein S, Pisera D, Goffin V** 2013 Use of prolactin receptor antagonist to better understand prolactin regulation of pituitary homeostasis. Neuroendocrinology 98:171-179
30. **Furigo IC, Donato J, Suzuki MF, Zampieri TT, Pedroso JA, Lobo AM, Alencar A, Oliveira JE, Bartolini P, Soares CR** Uncovering the Mechanism of Action of the Anti-Diabetic Effects of Bromocriptine: The Role of Prolactin. In: Diabetes: Clinical Physiology and Treatment; SUN-0999-SUN-0999
31. **Furigo IC, Kim KW, Nagaishi VS, Ramos-Lobo AM, de Alencar A, Pedroso JA, Metzger M, Donato J, Jr.** 2014 Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor-alpha and

depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin. Brain research 1566:47-59