



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LAURA SCHIRMBECK MARDER

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ANEXINA V HUMANA EM CULTIVOS DE  
*Escherichia coli* EM BATELADA ALIMENTADA**

Porto Alegre

2013

LAURA SCHIRMBECK MARDER

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ANEXINA V HUMANA EM CULTIVOS DE  
*Escherichia coli* em BATELADA ALIMENTADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Porto Alegre

2013

LAURA SCHIRMBECK MARDER

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ANEXINA V HUMANA EM CULTIVOS DE  
*Escherichia coli* em BATELADA ALIMENTADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Jarbas Rodrigues Oliveira– PUCRS

---

Profa. Dra. Giandra Volpato– IFRS

---

Prof. Dr. Rodrigo Guerino Stabeli – FIOCRUZ

Porto Alegre

2013

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Oswaldo e Magda Marder, que sempre  
me apoiaram e me incentivaram em  
todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Diógenes Santiago Santos por ter acreditado em mim e me proporcionado essa oportunidade, pelos ensinamentos e pelo apoio dispensado na realização deste trabalho.

À equipe da QuatroG P&D e aos colegas do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional pelo carinho, amizade, ajuda e força nos momentos difíceis que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao José Eduardo Sacconi Nunes, à Diana Carolina Rostirolla e ao Prof. Cristiano Valim Bizarro, pelos conselhos, pela ajuda, apoio, atenção e ensinamentos durante a execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS.

A CAPES pela bolsa fornecida durante o curso de Mestrado.

Um agradecimento em especial aos meus pais, Osvaldo e Magda e ao meu namorado, Alexander, pelo carinho, companheirismo, conforto e compreensão que foram essenciais para esta conquista.

Agradeço, enfim, a todos que de alguma forma, contribuíram não só para a realização deste trabalho, como também para a minha formação pessoal e profissional.

Muito Obrigada a todos!!

## RESUMO

A Anexina V é uma proteína humana endógena dependente de  $\text{Ca}^{+2}$ , com peso molecular de 35,8 kDa, amplamente distribuída intracelularmente em altas concentrações na placenta e em concentrações mais baixas nas células endoteliais, renais, miocárdicas, epiteliais, esqueléticas musculares, eritrócitos, plaquetas e monócitos. Apresenta como principal característica a capacidade de se ligar à fosfatidilserina, um fosfolípido presente na camada interna da bicamada lipídica, que durante a apoptose celular é translocada para a camada externa da membrana celular. Apesar de ser uma proteína de tamanho relativamente grande, a Anexina V apresentou a capacidade de penetrar em sítios de injúria isquêmica tanto miocárdica quanto cerebral, atravessando a Barreira Hemato-Encefálica, sendo cada vez mais utilizada para detecção de apoptose em diversas doenças como Alzheimer e Isquemia e em monitoramento de drogas anticâncer. Por esses motivos, se torna relevante a produção da proteína Anexina V humana através da técnica do DNA recombinante em larga escala para que possa ser comercializada no Brasil, aumentando e facilitando o acesso de laboratórios de pesquisa e indústrias farmacêuticas na aquisição deste produto. Desenvolvemos um protocolo para cultivo em biorreator de grandes quantidades de Anexina V recombinante, no qual aproximadamente 20 mg de proteína recombinante podem ser obtidos a partir de 3 g de célula úmida de *E. coli* BL21(DE3). As análises por sequenciamento N-terminal de aminoácidos e espectrometria de massas forneceram evidências para a identidade e pureza da proteína recombinante, assim como um desenvolvimento de um kit para marcação de apoptose in vitro apresentou muita semelhança com outro kit importado já comercializado no Brasil.

**Palavras-chave:** Anexina V humana recombinante; *Escherichia coli*; detecção de apoptose; cultivo em biorreator;

## **ABSTRACT**

Annexin V is an endogenous human protein  $\text{Ca}^{+2}$  dependent, with a molecular weight kDa, widely distributed intracellularly, with very high concentrations in the placenta and lower concentrations in endothelial cells, kidneys, myocardium, skeletal muscle, skin, red cells, platelets and monocytes. Annexin V binds preferably to phosphatidylserine, a phospholipid commonly present on inner leaflet of lipid bilayer, which during cell apoptosis is translocated to outer leaflet of cell membrane. Despite of Annexin V is a relatively large protein, it was shown early on that the protein can be internalized at sites of ischemic injury both in the heart and in the brain and cross the intact blood-brain barrier, being increasingly used as a tool to detect apoptosis in several diseases such as Alzheimer and Ischemia and in drug. Therefore, production of recombinant human Annexin V using recombinant DNA technique along with High Cell Density Culture and protein purification becomes applicable to commercialize it in Brazil, increasing and facilitating the access of pharmaceutical industries and research laboratories in purchase product. We developed a protocol to produce recombinant human annexin V in large scale, in which approximately 20 mg of recombinant protein was yielded from 3 g of *E. coli*BL21(DE3) wet cells. N-terminal amino acid sequencing and massspectrometry analysis provided evidence for the identity and purity of therecombinant protein, as well as an apoptosis/necrosis *in vitro* detectionkit produced performed similarities with an imported commercialized kit in Brazil.

**Keywords:** human recombinant Annexin V; *Escherichia coli*; apoptosis detection; bioreactor cultivation

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Visualização da membrana plasmática celular .....	12
<b>Figura 2</b> - Partes de uma molécula de fosfatidilcolina .....	13
<b>Figura 3</b> - Distribuição assimétrica dos fosfolipídeos e glicolipídeos na bicamada lipídica ....	14



## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

BCL2 - do inglês *B-cell lymphoma protein-2*

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

UV – Radiação Ultravioleta

RI – Radiação Ionizante

ANXA5 – proteína Anexina V humana

rhANXA5 – Anexina V humana recombinante

Ca<sup>+2</sup> – Cálcio

K<sub>d</sub> – constante de afinidade

*E. coli* – *Escherichia coli*

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FPLC – Cromatografia Líquida de alta performance (do inglês

*FastProteinLiquidChromatography*)

HCDC – Cultura de alta densidade celular (do inglês *High Cell-DensityCulture*)

OD<sub>600nm</sub> – Densidade óptica a 600 nm

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

IPTG – isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

LC MS/MS – Cromatografia Líquida aplicada a Espectrometria de Massas (do inglês

*LiquidChromatography – Mass Spectrometry*)

DO-stat – controle do suprimento de oxigênio dissolvido

pH-stat – controle de alimentação de acordo com o pH do meio de cultura

DMEM – meio de cultura - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

FBS – soro bovino fetal (do inglês *Fetal Bovine Serum*)

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
1.1	Membrana Plasmática.....	11
1.1.1	Bicamada Lipídica .....	12
1.2	APOPTOSE .....	14
1.3	ANEXINA VHUMANA .....	17
1.3.1	Aplicações da AnexinaV.....	18
1.4	CULTIVOS EM BIORREATOR .....	18
2	JUSTIFICATIVA .....	21
3	OBJETIVOS .....	22
3.1	OBJETIVO GERAL .....	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
4	MANUSCRITO.....	23
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	41
6	REFERÊNCIAS .....	44
7	ANEXOS .....	48
7.1	Anexo I .....	48

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Membrana Plasmática**

As membranas biológicas variam na sua composição, portanto, existem diversas atividades e propriedades comuns a todas elas, desempenhando quatro funções principais na célula: primeiro, e mais importante, envolvendo toda a célula, definindo o seu limite e agindo como uma barreira de permeabilidade que limita o movimento de substâncias para dentro ou para fora delas. Em eucariotos, além da membrana plasmática, existem ainda as membranas que revestem organelas como as mitocôndrias e o núcleo, atuando como barreiras para que não haja troca de conteúdos com o citoplasma [1].

Segundo, as membranas organizam e compartimentalizam atividades específicas dentro e ao redor das células através da sua associação com proteínas específicas. Terceiro, regulam o transporte tanto ativo quanto passivo de moléculas para dentro e para fora das células e entre as organelas e o citoplasma. Essa atividade é regulada por proteínas específicas embebidas na membrana e que permitem a passagem seletiva de íons, glicose e outras moléculas pequenas [1,2].

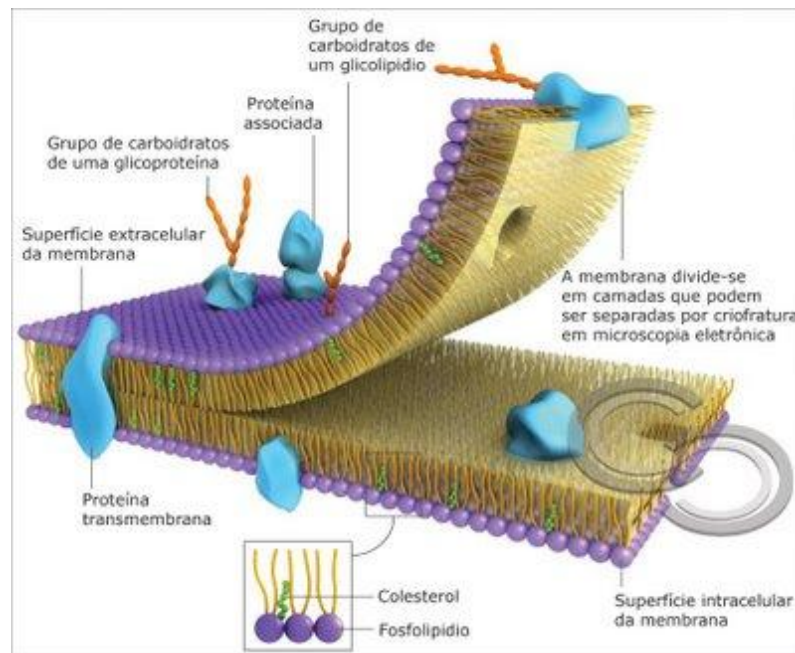
Quarto, a membrana plasmática recebe sinais externos, principalmente de outras células. Na maioria dos casos, são sinais extracelulares na forma de pequenas moléculas ou proteínas que são detectadas por receptores presentes na membrana, resultando em mudanças na célula [1].

A membrana plasmática, por sua vez, é constituída de duas camadas de moléculas lipídicas intercaladas com proteínas responsáveis pela função celular, com espessura aproximada de 7,5 nm a 10 nm e funciona como uma barreira de permeabilidade, permitindo à célula manter um meio químico apropriado para seus processos metabólicos, regulando o volume citoplasmático e transferindo informações sob a forma de sinais químicos e elétricos [3].

Todas as membranas biológicas são formadas por uma dupla camada de fosfolipídeos e por proteínas unidas por ligações covalentes que se comportam

segundo o modelo de Mosaico Fluido, descrito por Singer e Nicolson, em 1972 (Figura 1) [4].

**Figura 1.** Visualização da membrana plasmática celular.



**Fonte:** <http://fisiando.blogspot.com.br/search/label/Fisiologia%20Humana>

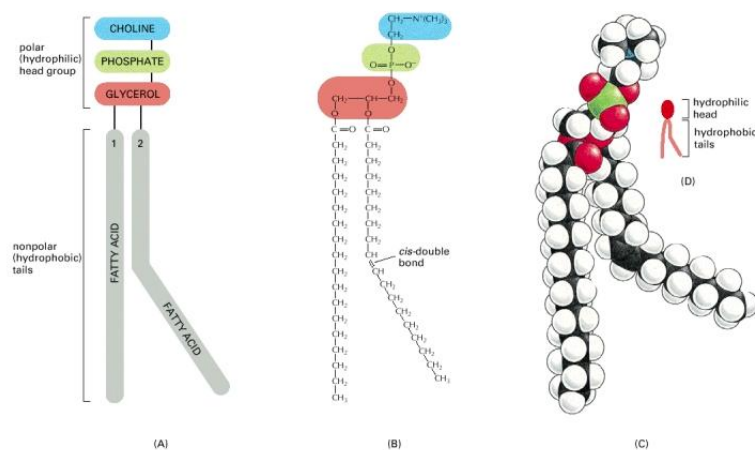
Todas as membranas celulares, incluindo a membrana plasmática, organelas celulares e vesículas intracelulares são compostas pelo mesmo material. O componente principal de todas as membranas celulares são lipídeos e proteínas. Diferentes formas de lipídeos existem para fornecer suporte, estrutura e função para a membrana [3].

### 1.1.1 Bicamada Lipídica

A bicamada lipídica fornece a estrutura básica de todas as membranas celulares, sendo esta estrutura atribuída exclusivamente pelas propriedades especiais das moléculas lipídicas, as quais são dispostas em bicamadas, até mesmo em simples condições artificiais [5].

As moléculas lipídicas presentes na membrana plasmática são de caráter anfifílico, ou seja, possuem uma parte da molécula hidrofílica polar e outra parte hidrofóbica, apolar. Os lipídeos mais abundantes da bicamada lipídica são os fosfolipídeos, que possuem uma cabeça polar e duas caudas de hidrocarbonetos apolares. Uma cauda, tipicamente possui uma ou mais ligações insaturadas (duplas) do tipo *cis*, enquanto que a outra cauda não possui esse tipo de ligação, sendo saturada. Cada ligação *cis* cria uma pequena torção na cauda (Figura 2). Por isso, diferenças no comprimento e na saturação das cadeias lipídicas influenciam no modo como as moléculas fosfolipídicas se acoplam umas com as outras, contribuindo para a fluidez da membrana [5].

**Figura 2.** Partes de uma molécula de fosfatidilcolina



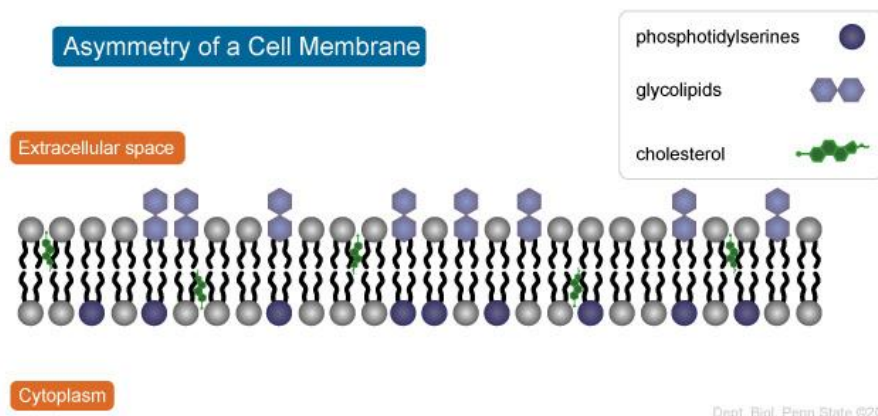
**Nota:** (A) representação esquemática; (B) representação por fórmula química; (C) por modelo de estrutura tridimensional; e (D) representação simbólica.

**Fonte:** Alberts, 2002.

Como mencionado anteriormente, os principais lipídeos presentes na membrana celular são os fosfolipídeos, como por exemplo, o colesterol e os glicolipídeos, apresentando distribuição assimétrica na bicamada lipídica. Dentre os fosfolipídeos, os mais abundantes são os ligados à colina, como a fosfatidilcolina e a esfingomiélna e ainda os aminofosfolipídios, como a fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina. O fosfatidilglicerol, o fosfatidilinositol e a cardiolipina são também importantes, porém estão presentes em menores quantidades [6]. As duas metades da bicamada frequentemente possuem

composições diferentes de moléculas de fosfolipídeos e glicolipídeos (Figura 3) [5]. Na camada externa da bicamada lipídica, pode-se encontrar principalmente fosfolipídeos como a fosfatidilcolina e a esfingomiéline, enquanto que na camada interna, encontram-se glicolipídeos, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina [7]. Já as proteínas, são embebidas na bicamada com orientações específicas cruciais para a sua função. A assimetria dos lipídeos é estabelecida durante a sua produção, para que a membrana cresça por igual, sendo para isso, uma proporção dos lipídeos recém-sintetizados, transferida para a monocamada oposta. Essa transferência é catalisada por enzimas chamadas flipases, que transferem seletivamente moléculas de fosfolipídeos para sua respectiva monocamada, fazendo com que cada uma tenha sua concentração específica de fosfolipídeos [8].

**Figura 3.** Distribuição assimétrica dos fosfolipídeos e glicolipídeos na bicamada lipídica



**Nota:** Fosfolipídeos e glicolipídeos têm distribuição assimétrica na bicamada lipídica da membrana plasmática. As moléculas de glicolipídeos encontram-se na monocamada externa da membrana plasmática, enquanto que os fosfolipídeos como a fosfatidilserina encontram-se na monocamada interna, e moléculas de colesterol apresentam-se distribuídos entre as duas camadas.

**Fonte:** PennStateUniversity, 2012.

A fluidez da membrana celular deve ser precisamente regulada, sendo determinada por fatores como temperatura, comprimento das cadeias de ácidos graxos, nível de saturação das cadeias e presença de colesterol [1].

## 1.2 APOPTOSE

O termo “*apoptosis*” foi primeiramente descrito por Kerr, Wylie e Currie, em 1972 [9], para descrever morfológicamente uma forma distinta de morte celular, embora certos componentes relacionados a esse fenômeno passaram a ser descritos somente anos mais tarde [9,10].

A apoptose é um tipo de morte celular programada, considerada como uma resposta celular fundamental que ocorre normalmente durante o desenvolvimento, o envelhecimento e como um mecanismo homeostático para manter a população celular adequada nos tecidos. A combinação de apoptose e proliferação celular é responsável pelo modelamento de tecidos e órgãos no desenvolvimento embrionário, como por exemplo, a apoptose localizada entre os dedos de nossas mãos e pés, que permite a sua separação [11].

O mecanismo apoptótico é definido como um caminho de regulação da morte celular que envolve a ativação sequencial de caspases e *cys* proteases e que é controlado tanto positivamente quanto negativamente pela família de proteínas BCL2 [12].

Patologicamente, existem duas situações opostas em que pode ocorrer apoptose: as que apresentam apoptose em excesso, levando a perda progressiva da funcionalidade tecidual, como são os casos de IAM, hipóxia cerebral [13], síndrome linfoproliferativa autoimune [14], desordens neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson e Huntington), inflamação, rejeição a transplante de órgãos e SIDA. Por outro lado, algumas patologias como, por exemplo, o Lupus Eritematoso Sistêmico, a Artrite Reumatóide e o câncer são patologias caracterizadas por apoptose insuficiente [15,16,17].

As células cancerosas possuem um elevado número de mutações que permitem ignorar os sinais celulares característicos, desregulando o crescimento celular e tornando-as mais proliferativas que o normal [11]. A expansão clonal de uma célula cancerosa depende de um descontrole de sua capacidade proliferativa e de uma crescente incapacidade de morrer por apoptose, sendo essa resistência a apoptose, uma das características mais marcantes dos tumores malignos [17,18].

Por esse motivo, medicamentos quimioterápicos e tratamentos radioterápicos resultam em danos no DNA celular, levando a morte por apoptose

através da via dependente de p53. Alguns hormônios, como os corticosteróides, levam algumas células a apoptose, enquanto outras não são nem sequer afetadas ou estimuladas [10]. Ainda assim, UV, RI, temperaturas elevadas, estresse oxidativo e reações imunológicas são outros fatores que podem levar a morte celular por apoptose [10,19]. É possível ainda encontrarmos apoptose em casos de rejeição a transplante de órgãos e medula óssea e ainda em resposta a quimioterapia e/ou radioterapia a tumores [20,21].

As células podem morrer por dois diferentes mecanismos: apoptose ou necrose. Em alguns casos, é o tipo de estímulo e a sua intensidade que determina por qual desses mecanismos a célula morrerá [10]. A apoptose ocorre de maneira sincronizada, sendo frequentemente dependente de energia. No processo de apoptose, podemos verificar a ocorrência de eventos como encolhimento celular, condensação do citoplasma e da cromatina, fragmentação do DNA e do núcleo celular, formação de bolhas (“*blebbing*”) na membrana plasmática e, por último, formação de corpos apoptóticos perdendo a sua assimetria e sua habilidade de atacar células de tecidos vizinhos [19], sendo estes facilmente engolfados por células fagocíticas, macrófagos e células dendríticas, que se ligam a fosfatidilserina na superfície da membrana [3]. Os macrófagos, por sua vez, internalizam e degradam as células apoptóticas, reduzindo assim o risco de inflamação por morte celular [3].

Em células normais, os fosfolipídeos estão distribuídos assimetricamente na bicamada lipídica, sendo que a fosfatidilserina, um fosfolipídeo aniônico, encontra-se confinado na camada interna da membrana plasmática [22]. Ao passo que, durante os processos envolvidos na apoptose, a exposição da fosfatidilserina para a camada externa da bicamada lipídica [23] é vista como um dos principais eventos apoptóticos, podendo ser utilizado como marcador desse tipo de célula [8,24]. O processo de translocação da fosfatidilserina da camada interna para a camada externa da membrana plasmática parece [8] ocorrer por meio de dois mecanismos [21]:

-diminuição da atividade da translocase de fosfolipídeos, que normalmente transporta os lipídeos da monocamada não-citosólica para a monocamada citosólica [5, 24].



- ativação da *scramblase* dependente de cálcio, que transfere os fosfolípidos de forma inespecífica nas duas direções entre as duas monocamadas [5,24].

A fosfatidilserina é mais do que um marcador celular de apoptose, ela sinaliza células vizinhas e macrófagos a fagocitarem as células mortas [24,25], uma vez que passa para a camada externa da bicamada lipídica apenas em processos apoptóticos. Além disso, esse fosfolípido bloqueia a inflamação frequentemente associada à fagocitose: o engolfamento de células apoptóticas dependente de fosfatidilserina inibe a produção de proteínas sinalizadoras (citocinas) que induzem a inflamação por células fagocíticas [5].

### 1.3 ANEXINA V HUMANA

A proteína humana Anexina V foi descoberta inicialmente como um anticoagulante *in vitro* [26] devido ao seu efeito inibitório na ativação da protrombina e sua habilidade em prevenir a formação de trombos em condições fisiológicas normais [16], ligando-se fortemente a fosfolípidos [27], as plaquetas [28] e ao colágeno [29]. Apresentam ainda a capacidade de formar canais de voltagem dependentes de  $Ca^{+2}$  [30], inibindo a fosfolipase  $A_2$  [31] e a proteína quinase C [32,33], representando assim um importante papel na transdução de sinal, inflamação, desenvolvimento e diferenciação celular [34].

A anexina V humana (ANXA5), é também descrita como anexina A5, proteína anticoagulante placentária I, anticoagulante vascular alfa, endonexina II, lipocortina V, proteína placentária 4 e ancorina CII [16] e consiste em uma proteína endógena produzida pelas células epiteliais de diversos tecidos, assim como placenta, cordão umbilical, fígado, bazo, rins, coração, útero, músculo esquelético, eritrócitos, leucócitos, células endoteliais e plaquetas [35].

Esta proteína faz parte de uma família de proteínas que possuem a capacidade de se ligarem às membranas celulares na presença de íons  $Ca^{+2}$ , sendo formadas por um núcleo contendo de 4 a 8 repetições de uma sequência altamente conservada com aproximadamente 70 aminoácidos e uma região N-terminal mais variável, que confere diferentes propriedades para cada tipo de anexina [36].

O gene ANXA5 está localizado no braço longo do cromossomo 4 (4q27) [34] e abrange 29 kb contendo 13 éxons, codificando uma proteína madura com 320 aminoácidos, peso molecular de 35,8 kDa e ponto isoelétrico teórico (pI) de 4.93 [37].

Além disso, a anexina V é conhecida por se ligar seletivamente, com afinidade nanomolar ( $K_d = 0.5-7.0$  nM) aos resíduos de fosfatidilserina da membrana plasmática. Essa ligação não só ocorre muito rapidamente como é fortemente dependente da presença de íons  $Ca^{+2}$  [16].

A proteína recombinante humana pode ser produzida por expressão citoplasmática em *Escherichia coli* e devido ao seu baixo peso molecular, é possível obter-se altos rendimentos de proteína com excelente pureza, sendo muito improvável o desencadear de uma resposta imune [16] quando utilizada para detecção de apoptose *in vivo*.

### **1.3.1 APLICAÇÕES DA ANEXINA V**

A Anexina V tem sido amplamente utilizada como ferramenta para detecção de apoptose tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Com base em suas características, foi originalmente complexada com diferentes compostos fluorescentes (FITC), sendo utilizada rotineiramente em laboratórios para identificar e quantificar células apoptóticas *in vitro*. Devido a sua ausência de imunogenicidade e toxicidade *in vivo*, a Anexina V tem sido utilizada ainda no diagnóstico de apoptose *in vivo* através da complexação com radionuclídeos para monitoramento de terapias contra o câncer [20,22], sendo capaz de identificar estágios iniciais de apoptose.

### **1.4 CULTIVOS EM BIORREATOR**

Atualmente, diversas proteínas com aplicação industrial e terapêutica estão sendo produzidas em *E. coli* através da técnica do DNA recombinante. Por esse motivo, estratégias para aumentar a produção de biomassa e de proteína

recombinante por meios de cultivos de *E. coli* em batelada alimentada empregando biorreatores estão sendo amplamente desenvolvidas.

Proteínas recombinantes apresentam atualmente um crescimento no mercado mundial de 5 a 15 % ao ano. *E. coli* tem sido o hospedeiro mais utilizado para a produção de proteínas recombinantes principalmente devido ao seu sistema ser bem caracterizado e estudado até hoje [38].

As culturas em agitador orbital de bancada (*shaker*) são normalmente realizadas em batelada, sendo todos os componentes da cultura adicionados no início do cultivo, sem monitoramento nem controle de nenhum parâmetro como pH ou níveis de oxigênio dissolvido. Sob tais circunstâncias, altas densidades celulares não podem ser alcançadas, pois a taxa respiratória das bactérias em crescimento é muito alta e rapidamente excede a capacidade de transferência de oxigênio do frasco [39].

Um dos métodos mais utilizados em cultivos de alta densidade em biorreatores é conduzido em batelada-alimentada, sendo possível atingir concentrações celulares superiores a 50 gramas de célula seca por litro (g/L) tanto para *E. coli* não recombinante, quanto para recombinante[38].

A técnica de HCDC tem alguns problemas que devem ser superados para que as culturas possam atingir altas densidades celulares. A limitação da capacidade de transferência de oxigênio, a formação de produtos que inibem o crescimento celular, a inibição pelo substrato e a limitação da dissipação de calor, são alguns exemplos [38]. Células cultivadas em batelada alimentada podem sofrer estresse devido à elevada pressão osmótica causada pela alimentação, a indução da expressão de proteínas heterólogas e a falta de nutrientes. Para isso, diversas estratégias de alimentação têm sido desenvolvidas a fim de controlar a velocidade específica de crescimento, limitando os nutrientes essenciais como fonte de carbono e nitrogênio [38].

Estratégias de alimentação com elevação gradual, linear ou em degraus da vazão de alimentação acompanham o crescimento celular quando bem ajustadas às condições de cultivo. Dentre estas estratégias estão a DO-stat, pHstat e linear. O

método de alimentação DO-stat baseia-se no princípio de que quando o substrato é depletado do meio de cultura, ocorre um aumento brusco na porcentagem de oxigênio dissolvido, fazendo com que entre nutrientes para o meio de cultivo. O método pHstatocorre o aumento do pH a medida que aumenta a concentração de  $\text{NH}_4^+$  excretado pelas células, tendo como princípio a mudança do pH quando a principal fonte de carbono do meio estiver esgotada. A vazão linear de alimentação, por sua vez, é baseada na seguinte equação:

$$F = at + b,$$

onde  $F$  é a taxa de alimentação (mL/min),  $t$  é o tempo de cultivo após o início da alimentação (min) e,  $a$  e  $b$  são constantes para o perfil de alimentação linear.

Outro parâmetro a ser avaliado no cultivo de células em biorreatores é o horário em que as células devem ser induzidas com IPTG, uma vez que pode levar a um estresse da célula, levando a perda do plasmídeo [40,41].

## 2 JUSTIFICATIVA

Durante a apoptose, as células perdem a assimetria da bicamada lipídica, fazendo com que fosfolípidos, como a fosfatidilserina, que localizam-se originalmente na camada interna da bicamada lipídica, sejam translocados para a camada externa, sendo este evento caracterizado como um dos principais ocorridos durante a morte celular programada.

A Anexina V humana é uma proteína intracelular que apresenta alta afinidade pela fosfatidilserina, sendo considerada atualmente, um excelente marcador de apoptose tanto *in vivo*, para acompanhar a eficácia de tratamentos quimioterápicos em Medicina Nuclear, quanto *in vitro*, em laboratórios de pesquisa para estudos de viabilidade e morte celular.

Atualmente, os kits comercializados no Brasil e na América Latina para detecção *in vitro* de células em apoptose têm sido adquiridos de representantes comerciais por preços altos e com um prazo de entrega de 60 dias. Por esse motivo, torna-se de grande relevância o desenvolvimento de um protocolo para produção em larga escala da proteína recombinante em território brasileiro, podendo ser marcada com fluoresceína ou com elementos radioativos, diminuindo os custos do produto acabado e o tempo de espera para o recebimento do pedido de compra.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo geral o desenvolvimento de um processo eficiente e de alto rendimento para a produção, em cultivos em biorreator e posterior purificação da proteína recombinante Anexina V humana com alto grau de pureza, de modo a obter a matéria-prima para a produção de kits para detecção de apoptose tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

### 3.2 Objetivos Específicos

Esse trabalho possui os seguintes objetivos específicos:

- Construção do gene que codifica a Anexina V humana através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Clonagem do fragmento amplificado em vetor de clonagem procariótico;
- Subclonagem em vetor de expressão pET-30a(+);
- Testar a expressão da proteína em cepa de *E.coli* em agitador orbital horizontal (*shaker*) para determinar a sua melhor condição de expressão na forma solúvel;
- A partir dos resultados obtidos nos cultivos em *shaker*, escalonar o crescimento da proteína utilizando biorreator de 2 L;
- Purificação da proteína através da técnica de FPLC;
- Quantificação total da proteína;
- Análise da pureza e identidade da proteína recombinante purificada, por espectrometria de massas e mapeamento peptídico por LC-MS/MS.

#### **4 MANUSCRITO**

TITLE OF ARTICLE:

Production of recombinant human annexin V by fedbatch cultivation

PERIODIC CHOSEN FOR SUBMISSION:

Microbial Cell Factories

**Production of recombinant human annexin V by fedbatch  
cultivation**

Laura Schirmbeck Marder <sup>1,2</sup>

Email: lauramarder@gmail.com

Diana Carolina Rostirolla <sup>1,3</sup>

Email: diana\_rostirolla@yahoo.com.br

Guilherme Oliveira Petersen <sup>1,2,4</sup>

Email: guipetersen@gmail.com

Jose Eduardo Sacconi Nunes <sup>4</sup>

Email: zehsacconi@hotmail.com

Ana Paula Duarte de Souza <sup>5</sup>

Email: ana.duarte@pucrs.br

Cristiano Valim Bizarro <sup>1,2</sup>

Email: cristiano.bizarro@pucrs.br

Jocelei Maria Chies <sup>4</sup>

Email: joceleichies@gmail.com

Luiz Augusto Basso <sup>1,2,3</sup>

Email: luiz.basso@pucrs.br

Diogenes Santiago Santos <sup>1,2,3\*</sup>

\*Corresponding author

Email: diogenes@pucrs.br

1 Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciencia e Tuberculose (INCT-TB), Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Porto Alegre, 90619-900, Brazil.

2 Programa de Pos-Graduacao em Biologia Celular e Molecular – PUCRS. Porto Alegre, 90619-900, Brazil.

3 Programa de Pos-Graduacao em Medicina e Ciencias da Saude – PUCRS. Porto Alegre, 90619-900, Brazil

4 Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento LTDA. Porto Alegre, 90619-900, Brazil

5 Instituto de Pesquisas Biomedicas (IPB), Laboratorio de Imunologia Molecular (PUCRS).



Porto Alegre, 90619-900, Brazil.

## Abstract

**Background:** Annexin V, a 35.8 kDa intracellular protein, is a  $\text{Ca}^{+2}$ -dependent phospholipid binding protein with high affinity to phosphatidylserine (PS), which is a well-known hallmark of apoptosis. It is a sensitive probe for PS exposure upon the cell membrane, being Production of recombinant human annexin V in large-scale is worth of effort due to its wide use in Nuclear Medicine, radiolabeled with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , for the evaluation of cancer chemotherapy treatments, being also used for the identification of apoptotic cells on histologic studies. Here, we describe the high-yield production of a tag-free version of human annexin V recombinant protein by linear fed-batch cultivation in a bioreactor.

**Results:** We cloned the human ANXA5 coding sequence (rhANXA5) into the pET-30a(+) expression vector and optimized the growth conditions in shaker cultivations. Optimized growth conditions were applied to batch and fed-batch cultures. Using the *E. coli* BL21(DE3) strain in a semi-defined medium at 37 °C, pH 7 in fed-batch cultures, we obtained a 48.75 fold increase in biomass production, respective to shaker cultivations. We developed a singlestep protocol for rhANXA5 purification using a strong anion-exchange column (MonoQ HR16/10). Using these procedures, we obtain 21 mg of homogeneous, nontagged and active human annexin V recombinant protein from 3 g of bacterial cells from bioreactor cultures. The identity and molecular mass of rhANXA5 was confirmed by mass spectrometry. Moreover, the purified rhANXA5 protein was functionally evaluated in a FITC-annexin V binding experiment where we show that rhANXA5 detects apoptotic cells similarly to a commercial kit. **Conclusions:** We describe a new fed-batch method to produce recombinant human annexin V, being useful for several researchers and radiopharmaceuticals companies.

**Keywords:** recombinant human annexin V; fed-batch cultivation; large-scale; apoptosis detection.

## Background

Annexin V, formerly known as human placental anticoagulation protein, is a member of a calcium-dependent family of intracellular proteins and binds preferentially to phosphatidylserine (PS), a negatively charged phospholipid located on the cytosolic face of the plasma membrane [1], showing minimal capacity to bind to phospholipids such as phosphatidylcholine and sphingomyelin, which are constitutively present in the outer leaflet of plasma membranes [2].

The PS-binding activity of annexin V is widely used for detection of the initial stage of apoptosis [3]. During the early stages of apoptosis, cells lose their phospholipid membrane asymmetry and expose PS at the cell surface, a phenomenon described as one of the hallmarks of apoptosis. The exposed PS residues can be bound selectively by annexin V with nanomolar affinity ( $K_d \sim 0.5 - 7 \text{ nM}$ ) [4]. Apoptosis was originally described by [5] in 1972 as a mechanism of controlled cell deletion essential for development and maintenance of homeostasis. Cell shrinkage, cytoplasmic condensation, DNA fragmentation, chromatin condensation, nuclear fragmentation, cytoplasmic membrane blebbing, and formation of apoptotic bodies without initiating a systemic inflammatory response are characteristics found in apoptotic cell death [6]. Excessive apoptosis is involved in several diseases resulting in progressive loss in tissue functionality, as occurs in acute myocardial infarction [7], hypoxic brain injury [8], heart failure [9], allograft rejection [10], stroke [11], neurodegenerative disorders (e.g. Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's disease) [12-14] and inflammation [15]. In contrast, insufficient apoptosis can result in autoimmune lymphoproliferative syndrome [16] and cancer, where deregulation of apoptotic signaling pathways may impair the elimination of neoplastic cells [17].

Annexin V was originally labeled with different fluorescent tags (e.g. fluorescein isothiocyanate - FITC) and is routinely used for histological and cell-sorting studies to identify and quantify apoptotic cells [4]. Nowadays, recombinant human annexin V (rhANXA5) is being used as an important *in vivo* diagnostic tool labeled with different radionuclides, such as iodine-123 ( $^{123}\text{I}$ ) and the metastable isotope technetium-99 ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), providing a broad range of imaging applications in apoptosis research from Single-Photon Emission Computed Tomography and autoradiography to Positron Emission Tomography [4]. In Nuclear Medicine, annexin V radiolabeled with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  or  $^{123}\text{I}$  is being useful in evaluating the efficacy of cancer therapy and disease progression or regression [18].

Due to its widespread use as a diagnostic tool, rhANXA5 is commercially produced in microorganisms such as *Escherichia coli* by using recombinant DNA techniques [19-21]. The ANXA5 gene is located on human chromosome 4q27 locus and spans a region of DNA 29 kb in length containing 13 exons and 12 introns, encoding a single mature transcript of approximately 1.6 kb and a protein product with a molecular weight of 35.8 kDa and 320 amino-acids residues [22].

To produce rhANXA5 in large scale, we used *Escherichia coli*, the most commonly used host for recombinant protein production [23]. In shake flask cultures, all components are already added at the start of the cultivation, without monitoring and control of any parameter such as pH or the level of dissolved oxygen, leading to a slow growth and a low recombinant protein production [24]. High Cell-Density Culture techniques have been developed in order to improve productivity and to provide advantages such as reduced culture volume, enhanced downstream processing, reduce wastewater, lower production costs and reduced investment in equipment [23]. Fed-batch cultivation is an effective and simple method [25], allowing substantial concentration of glucose, an inexpensive and readily usable carbon and energy source [26]. To our knowledge, there is currently no protocol available for a bioreactor-based, large-scale production of rhANXA5. In this work, we describe a procedure for the production of 21 mg of homogeneous, nontagged rhANXA5 from 3 grams of bacterial cells from bioreactor cultures. Parameters such as feeding media, fed-batch strategies and induction time were optimized in order to improve biomass and rhANXA5 protein production. The identity and absence of host contaminants in purified rhANXA5 was confirmed by LC-MS/MS peptide mapping experiments. The molecular mass determination of intact rhANXA5 confirmed the integrity of the purified protein. Additionally, the produced rhANXA5 protein was shown to be functional in a bioassay for apoptosis/necrosis *in vitro* detection where it performed similarly to a commercially available kit.

## **Results and discussion**

### **Cloning and expression of rhANXA5**

The human ANXA5 coding sequence was subcloned into the pET-30a(+) expression vector (NovagenR) (see Methods section for details). Both the identity and the absence of PCR-introduced mutations on ANXA5 coding sequence were confirmed by automated DNA

sequencing the pET-30a(+):ANXA5 construct. The *E. coli* strains BL21(DE3) (NovagenR) and C41(DE3) (LucigenR Corporation) were transformed by electroporation with the pET-30a(+):ANXA5 construct. Expression profiles were tested in lysogeny broth (LB) and in our semi-defined medium (see Methods section).

The best results of soluble recombinant protein production from shaker cultivations were obtained using the BL21(DE3) strain in semidefined medium induced with 1mM IPTG at 37°C (see supplementary information).

### **Bioreactor cultivation**

Optimized growth conditions from shaker cultivations were applied to the bioreactor batch and fed-batch cultures. We employed our semidefined medium and a temperature of 37°C in all experiments. Transformed *E. coli* BL21(DE3) was grown from a master cell bank (MCB) under batch cultivation in 1L of semi-defined medium at 37°C monitoring glucose consumption. Within 4 hours, glucose was depleted from media, indicating this was the right time to start feeding. At this point, the biomass of the culture reached 5.62 grams dry cell weight per liter of culture broth. During fed-batch cultivation, the biomass production reached approximately 30.18 g L<sup>-1</sup> at 30 h of cultivation, which corresponded to an OD600nm of 89.7, in contrast with an OD600nm = 1.84 in shaker cultivation. This represents a 48.75 fold increase in biomass. Following biomass optimization, annexin V production was attained by induction with 1 mM IPTG. Induction after 18 hours of cultivation (biomass concentration of 20.6 gram dry cell weight per liter of culture medium and an OD600nm of 60.50) produced higher yields (figure 1).

### **Purification**

The overexpressed protein was purified by a single-step protocol consisting of a strong anion-exchange column (MonoQ HR16/10). Figure 2 shows the three steps of cell preparation. The target protein eluted at approximately 250 mM of NaCl from MonoQ HR 16/10 column and SDS-PAGE 12% analysis showed that rhANXA5 was homogeneous (Figure 3). The eluted protein was pooled and dialyzed against HEPES 100 mM NaCl pH 7.2 and concentrated using an AMICON ultra-filtration membrane and stored at -80°C in aliquots of 1 mL. This purification protocol yielded 21 mg of recombinant protein from 3 g of cells.

### **rhANXA5 identification by Mass Spectrometry**

Homogeneous rhANXA5 samples were desalted, digested with trypsin, and the peptide mixtures analyzed in LC-MS/MS peptide mapping experiments (see Methods section). A total of 320 spectra were identified with 29 different peptides derived from rhANXA5 protein. These peptides covered 80 % of the rhANXA5 sequence.

### **Determination of rhANXA5 molecular mass**

The spectra of intact rhANXA5 samples were recorded with a linear ion trap analyzer (see Methods section for details). Peaks spanning charge states 18+ to 39+ were detected (Figure 4a) and the spectra deconvoluted. We obtained a value of 35,804 Da for the average molecular mass of rhANXA5 (figure 4b), consistent with the posttranslational removal of the N- terminal methionine (theoretical average molecular mass of 35,937 Da with methionine and 35,805 Da without methionine).

### **FITC-annexin V binding test**

After the disruption B16F10 melanoma cells by freezing and thawing, cells were stained with our home-made kit and with a commercial kit from BD Biosciences, to compare the efficacy of rhANXA5. We could verify that our kit obtained similar results to BD Biosciences kit, particularly when we analyzed the annexin V positive population (apoptotic cells) and the double positive population (secondary necrotic cells) (Figure 5). However when we analyzed the cell PI positive we found some variation that may be due to the freezingthawing methodology.

### **Conclusions**

Fed-batch cultivations represent an alternative to shaker cultivations allowing control of process variables and improvement on biomass concentration and product yields [24]. We were able to increase biomass by 165% employing a linear ascending feed strategy, which is a simple-to-set, not dependent on any process variable feeding strategy. Although the cultivation time increased from 6 to 30 h from shaker to bioreactor, productivity was improved from 0.0878 g/L·h to 1.003 g/L·h (11-fold) and host protein contaminant profile was comparable. A chimeric protein, containing the C-terminus of hirudin fused to annexin

V, was previously expressed in large scale using fedbatch fermentation [27]. However, to the best of our knowledge, this is the first report of a scale up of rhANXA5 production.

Recombinant protein production methods have to increase continuously to meet commercial demands [23,28]. In this work, we produced 21 mg of a purified recombinant human annexin V from 3 g of bacterial cells obtained in fed-batch cultures induced with IPTG. rhANXA5 is a protein that could be commercially distributed to several research groups and to radiopharmaceutical companies. The use of fluorescence-labeled annexin V to identify apoptotic cells is currently limited to histologic and cell-sorting studies done *in vitro*. Its use for *in vivo* imaging studies is hampered mainly by costs issues. Hence, production in large scale may expand the commercial utilities for rhANXA5, reducing costs and allowing a greater access of scientific and physician's community to this product.

## Methods

### Gene synthesis, cloning and expression of rhANXA5

Oligonucleotides were designed based on the human ANXA5 coding sequence on GenBank (Accession number: NM\_001154.3) the National Institute of Health (NIH) genetic sequence database [22]. Specific primers were designed to contain *Nde*I (forward primer: 5' GCG CAT ATG GCA CAG GTT CTC AGA GGC ACT 3') and *Hind*III (reverse primer: 5' GCG AAG CTT TTA GTC ATC TTC TCC ACA GAG C 3') (New England BioLabsR) restriction sites (underlined). The human ANXA5 gene sequence was PCR-amplified from a human blood cDNA sample. The amplified ANXA5 coding sequence was cloned into the PCRBlunt R vector (Invitrogen), cleaved with *Nde*I and *Hind*III restriction endonucleases and subcloned into the pET-30a(+) expression vector (NovagenR), previously digested with the same restriction enzymes. The cloned ANXA5 sequence was confirmed by automated DNA sequencing. Electrocompetent *E. coli* strains were transformed with pET-30a(+):ANXA5 recombinant vector by electroporation and selected on Lysogeny Broth (LB) (tryptone, 10 g L<sup>-1</sup>; yeast extract, 5 g L<sup>-1</sup>; NaCl, 10 g L<sup>-1</sup>) agar plates containing 30 µg mL<sup>-1</sup> kanamycin [29]. The same strains were transformed with pET-30a(+) vector as control. Aliquots of a 5 mL cell culture grown from a single colony were used to inoculate 500 mL of LB pH 7.2 or a semi-defined media (NaCl, 0.5 g L<sup>-1</sup>; NH<sub>4</sub>Cl, 1 g L<sup>-1</sup>; yeast extract, 20 g L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g L<sup>-1</sup>; glucose, 500 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>, 0.1 g L<sup>-1</sup>; 1 mL of trace solution (FeSO<sub>4</sub>, 2.8 g L<sup>-1</sup>; MnCl<sub>2</sub>, 2 g L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub>, 2 g L<sup>-1</sup>;

1; CuCl<sub>2</sub>, 0.26 g L<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>, 0.3 g L<sup>-1</sup>); thiamine, 1 g L<sup>-1</sup>) supplemented with 30 µg mL<sup>-1</sup> kanamycin, grown at 37°C and 180 rpm to an optical density (OD<sub>600nm</sub>) of 0.4-0.6. At this growth stage, the protein expression was carried out using 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. Six hours after induction, cells were harvested by centrifugation (11,800 g) for 30min at 4°C and the pellet was stored at – 20°C. The expression of the recombinant soluble protein was confirmed by 12% sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) stained with CoomassieR Brilliant Blue R-250 staining.

### **Bioreactor cultivation**

A master cell bank (MCB) was prepared in 50% glycerol and stored at -20°C. The pre-inoculum medium was prepared with 250 mL of LB, 30 µg mL<sup>-1</sup> kanamycin added with 150 µL of MCB. The culture was grown overnight in shaker at 180 rpm, 37°C. This culture was the used to inoculate the bioreactor at final OD<sub>600</sub>=0.1. Batch and fed-batch culture experiments were conducted in a BIOSTATR B Plus bioreactor (Sartorius Stedim, Germany) with two 2 L stirred tanks, filled with 1 L of semi-defined media each, at 37°C, pH 7 and supplemented with kanamycin. For pH control, 12 % (v/v) ammonium hydroxide and 10 % (v/v) phosphoric acid were employed. The bioreactor was equipped with two Rushton turbines, and with agitation, aeration, temperature and pH controllers. A polarographic electrode was used to measure the dissolved oxygen concentration (DOC) in the culture. The pO<sub>2</sub>, pH, stirrer speed, base and acid consumption and aeration rate were measured online and were recorded by an external data acquisition and control system (Sartorius Stedim, Germany).

In the batch culture, the DOC was maintained at 30 % by cascading agitation (400-1000 rpm) with constant aeration rate (1 vvm) and the process was finished when the biomass reached stationary phase. Fed-batch cultivations were started as batch cultures with feeding starting at 4 hours of cultivation (approximately OD<sub>600nm</sub> 16.0) containing 2 X semi-defined medium, 300 g L<sup>-1</sup> glucose, 40 mM MgSO<sub>4</sub> and 30 µg mL<sup>-1</sup> kanamycin. Different feeding strategies were tested for additional 26 h. In the fed-batch cultures, the agitation was maintained at 800 rpm and DOC was kept in cascade agitation. For linear ascending feeding profile we used the following equation:

$$F = at + b$$

where  $F$  is the feeding rate ( $\text{mL min}^{-1}$ ),  $t$  the cultivation time after initiation of the fed-batch culture (min) and,  $a$  and  $b$  are constants for the linear ascending feeding profile.

After selecting the feeding strategy, different induction times were tested (12, 18 and 24 hours after start of cultivation) using 1 mM of IPTG. Thereafter, the resulting biomass was collected by centrifugation at 38,900  $g$  and  $4^{\circ}\text{C}$  for 30 min and was stored in aliquots at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Analytical methods**

Samples were withdrawn periodically for quantitative analysis along the cultivation. Cell growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) in a spectrophotometer. One optical density unit was found to be equivalent to 0.32  $\text{g L}^{-1}$  of dry cell weight. Glucose concentration in the medium was measured with a glucose analyzer (model 2700 select, Yellow Springs Instruments, USA). Acetate concentration was determined by high performance liquid chromatography (Akta Purifier, GE, Sweden) equipped with an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad Laboratories, USA), using 0.005 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  as mobile phase. The protein expression was analyzed by SDS-PAGE 12% stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 staining.

The annexin V protein produced was quantified using QubitR Protein Assay Kit (Invitrogen™) and a QubitR 2.0 Fluorometer (Invitrogen™).

### **Purification**

ANXA5 recombinant protein was purified using a Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) AKTA Purifier System (GE HealthCare c). All chromatographic steps were carried out at  $4^{\circ}\text{C}$ .

Sample elution was monitored by UV detection at 215, 254 and 280 nm and fractions were analyzed by SDS-PAGE 12%. According to [30] frozen cells (3 g) were suspended in 30 mL of buffer A (50 mM Tris HCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  pH 7.2) and incubated with 1 mM of phenylmethanesulfonylfluoride for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The cells were disrupted by sonication (eight pulses of 10") and centrifuged at 38,900  $g$  for 30 min. The supernatant was discarded and the pellet was completely dissolved in 30 mL of buffer B (50 mM Tris HCl, 20 mM EDTA



pH 7.2) and stirred for 30 min at 4°C and clarified by centrifugation at 38,900 *g* for 30 min at 4°C. The supernatant was dialyzed against 20 mM Tris HCl pH 8.0 (3 x 2 L, 3 h each). Residual precipitate was removed by centrifugation (38,900 *g* for 20 min) and the supernatant was loaded on a MonoQ HR 16/10 anion exchange column (GE Healthcare) previously equilibrated with 20 mM Tris HCl pH 8.0. Protein was eluted with 25% linear gradient of 20 mM Tris HCl, NaCl 1 M pH 8.0 at 1 mL min<sup>-1</sup> flow rate. Homogeneous rhANXA5 was eluted at approximately 250 mM NaCl. Fractions containing homogeneous rhANXA5 were pooled, dialyzed against 20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid (HEPES), 100 mM NaCl pH 7.2 and concentrated using an AMICON (Millipore Corporation, Bedford, MA) ultra-filtration membrane (MWCO = 10 kDa), and stored at -80°C. Protein concentration was determined with QubitR Protein Assay Kit (Invitrogen™) using a QubitR 2.0 Fluorometer (Invitrogen™).

#### **rhANXA5 identification by mass spectrometry**

rhANXA5 preparations (1nmol) were desalted and subjected to proteolytic degradation using trypsin. The resulting peptides were separated by chromatography using 15 cm capillary columns (150 µm i.d., Kinetex C18 core-shell particles – Phenomenex, Inc.) and a nanoLC Ultra 1D plus equipment (Eksigent, USA). Separated peptides were analysed using an LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer (Thermo Electron Corporation). The chromatographic method used a step gradient from mobile phase A (0.1% formic acid in water) to mobile phase B (0.1% formic acid in acetonitrile): 0–2% B over 5 min; 2–10% B over 3 min; 10–60% B over 60 min; 60–80% B over 2 min; 80% B isocratic for 10 min; 80–2% B over 2 min; and 2% B isocratic for 8 min. We performed MS/MS fragmentation using collision-induced dissociation (CID) with an activation Q of 0.250, an activation time of 30.0 ms, and an isolation width of 1.0 Da. Using the Proteome Discoverer software (v. 1.3), we compared experimentally obtained MS and MS2 spectra with the in-silico trypsin digestion of the human proteome. We allowed a precursor tolerance of 10 ppm, a fragment tolerance of 0.8 Da, static carbamidomethylation on cysteines, and oxidation on methionine residues. We restricted our analysis to matches with a Xcorr score > 2.0 for doubly charged ions and Xcorr score > 2.5 for triply charged ions.

### **Determination of rhANXA5 molecular mass**

Purified rhANXA5 samples were desalted, reconstituted in acetonitrile 50%/MilliQ-water 49%/formic acid 1% and directly injected using a 500  $\mu$ L syringe (Hamilton Company, USA) in a static mode into an IonMax electrospray ion source. The electrospray source parameters were as follows: positive ion mode, 4.5 kV of applied voltage to the electrospray source, 5 arbitrary units (range 0–100) of sheath gas flow, 45.6 V of capillary voltage, 250 °C of capillary temperature, and 238.8 V of tube lens voltage. Full spectra (600 – 2000 m/z range) were collected on a Thermo Orbitrap Discovery XL in profile mode using the linear ion trap analyzer (ITMS mode). The average spectrum was processed with the software MagTran [31] for charge state deconvolution.

### **FITC-annexin V binding test**

To confirm whether the recombinant annexin V produced binds to PS and detects cells undergoing apoptosis, we produced a home-made kit labeling rhANXA5 with FluoroTag™ FITC Conjugation Kit (SigmaAldrich R Co.). Our home-made kit also contained Propidium Iodide (PI) solution (Sigma-AldrichR Co.) and a 10 x binding buffer (HEPESNaOH 0.1 M pH 7.4, NaCl 1.4 M, CaCl<sub>2</sub> 25 mM). B16F10 melanoma cells, a kind gift from Dr. Peter Henson (National Jewish Center for Immunology, Denver, CO, USA) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), Gentamicin 80 mg L<sup>-1</sup> (Novafarma, Anapolis, Brazil), and Fungisone, 5 mg L<sup>-1</sup> (Bristol Myers Squibb, New York, NY, USA). Cells were disrupted by freezing and thawing, stained at the concentration of 10<sup>5</sup> cells ml<sup>-1</sup> in 100  $\mu$ l of 10 X Binding Buffer using 5 ml of annexin-FITC and 5 ml of PI from BD Bioscience FITC Annexin Apoptosis Detection kit II (San Diego, CA, USA) and compared with our produced kit. All data were collected in a FACS Canto II flow cytometer (BD Bioscience), and analysed using FlowJo software (Tree Stat, San Carlos, CA).

### **List of abbreviations**

DOC, dissolved oxygen concentration; FITC, fluorescein isothiocyanate; HEPES, hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonicAcid; LB, lysogeny broth; MCB, master cell bank; PI, propidium iodide; PS, phosphatidylserine; rhANXA5, recombinant human annexin V; TB, terrific broth.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

LM carried out most of the experiments and has written the manuscript. DR helped in cloning, amplification and purification. GP made the development of FITC-rhANXAV. JN assisted in the production of rhANXAV in bioreactor. AS conducted the FITC-annexin V binding experiments. CB performed the identification and molecular mass determination of rhANXAV by mass spectrometry and contributed to the manuscript writing. JC and LB assisted in most of the experiments and DS devised the experiments.

### Acknowledgements

Financial support for this work was provided by National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq- FNDCT-CAPES) and Millennium Initiative Program (CNPq), Brazil, to DS and LB. DS (CNPq, 304051/1975-06), LB (CNPq, 5201182/99-5) are research career awardees of the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil.

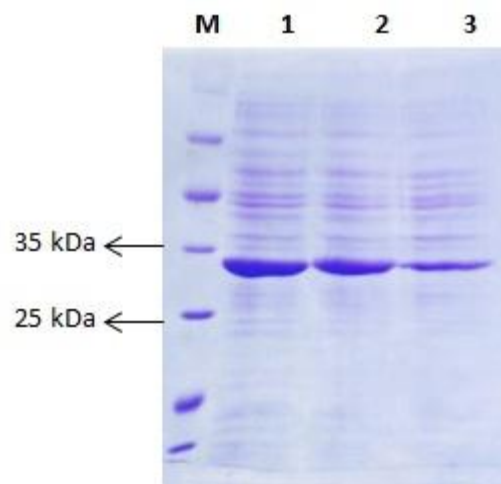
### References

1. Crompton MR, Moss SE, Crumpton MJ: **Diversity in the Lipocortin/Calpactin Family.** *Cell* 1988, **55**:1-3.
2. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: **A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V.** *J Immunol Methods* 1995, **184**:39-51.
3. Wang F, He XW, Yan HL, Huang JJ, Zhang Y, Jiang L, Gao YJ, Sun SH: **Non-fusion expression in Escherichia coli: Single-step purification of recombinant human annexin A5 for detection of apoptosis.** *Protein Expr Purif* 2006, **45**: 80-87.
4. Lahorte CM, Vanderheyden JL, Steinmetz N, Van de Wiele C, Dierckx RA, Slegers G: **Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004, **31**: 887-919.

5. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *Br J Cancer* 1972, **26**: 239-257.
6. Singh A, Bastian TS, Ceena DE, Varghese VI: **Apoptosis – a review.** *OMPJ* 2010, **1**: 1-8.
7. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio- Pulkki LM: **Apoptosis in human acute myocardial infarction.** *Circulation* 1997, **95**:320-323.
8. D'Arceuil H, Rhine W, de Crespigny A, Yenari M, Tait JF, Strauss WH, Engellhorn T, Kastrup A, Moseley M, Blankenberg FG: **99mTC annexin V imaging of neonatal hypoxic brain injury.** *Stroke* 2000, **31**:2692-2700.
9. Kang PM, Izumo S: **Apoptosis and Heart Failure: A Critical Review of the Literature.** *Circ Res* 2000, **86**:1107-1113.
10. Pallet N, Dieude M, Cailhier J, Hebert M: **The molecular legacy of apoptosis in transplantation.** *Am J Transplant* 2012, **12**: 1378-1384.
11. Mattson MP, Culmsee C, Yu ZF: **Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke.** *Cell Tissue Res* 2000, **301**: 173-187.
12. Hickey MA, Chesselet MF: **Apoptosis in Huntington's disease.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003, **27**:255-265.
13. Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N: **Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation.** *Ann Neurol* 2003, **53**(Suppl 3):61-70.
14. Takuma K, Yan SS, Stern DM, Yamada K: **Mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in Alzheimer's disease.** *J Pharmacol Sci* 2005, **97**:312-316.
15. Haanen C, Vermes I: **Apoptosis and Inflammation.** *Mediators Inflamm* 1995, **4**: 5-15.
16. Worth A, Thrasher AJ, Gaspar HB: **Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype.** *Br J Haematol* 2006, **133**:124-140.
17. Philchenkov A, Zavelevich M, Krocak TJ, Los M: **Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities.** *Exp Oncol* 2004, **26**: 82-97.
18. Yang DJ, Azhdarinia A, Wu P, Yu DF, Tansey W, Kalimi SK, Kim EE, Podoloff DA: **In Vivo and In Vitro Measurement of Apoptosis in Breast Cancer Cells Using 99mTc-EC-Annexin V.** *Cancer BiotherRadiopharm* 2001, **16**: 73-83.
19. Brumatti G, Sheridan C, Martin SJ: **Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells.** *Methods* 2008, **44**: 235-240.

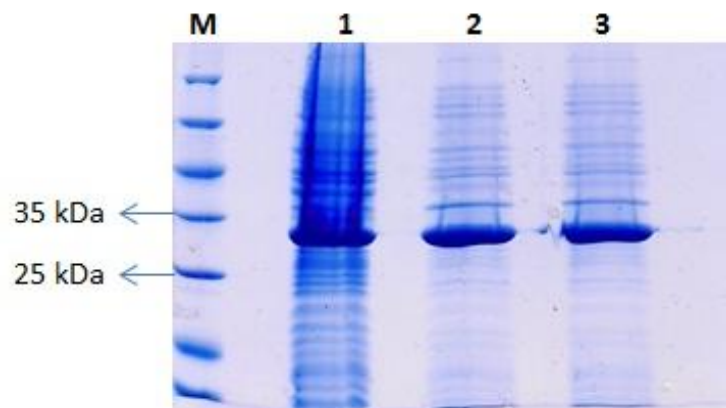
20. Logue SE, Elgendy M, Martin SJ: **Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells.** *Nat Protoc* 2009, **4**: 1383-1395.
21. Coxon KM, Duggan J, Cordeiro MF, Moss SE: **Purification of annexin V and its use in the detection of apoptotic cells.** *Methods Mol Biol* 2011, **731**:293-308.
22. **The National Center for Biotechnology Information (NCBI) - ANXA5 annexin A5 (*Homo sapiens* - human)** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/308>].
23. Lee SY: **High cell-density culture of *Escherichia coli*.** *Trends Biotechnol* 1996, **14**: 98-105.
24. Krause M, Ukkonen K, Haataja T, Ruottinen M, Glumoff T, Neubauer A, Neubauer P, Vasala A: **A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant protein in shaken cultures.** *Microb Cell Fact* 2010, **9**: 1-11.
25. Kim BS, Lee SC, Lee SY, Chang YK, Chang HN: **High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat.** *Bioprocess Biosyst Eng* 2004, **26**: 147-150.
26. Luli GW, Strohl WR: **Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations.** *Appl Environ Microbiol* 1990, **56**: 1004-1011.
27. Yuan H, Yang X, Hua Z-C: **Optimization of expression of an Annexin V-Hirudin chimeric protein in *Escherichia coli*.** *Microbiological Research* 2004, **159**:147-156.
28. Choi JH, Keum KC, Lee SY: **Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*.** *Chemical Engineering Science* 2006, **61**: 876-885.
29. Sambrook J, Russell DW: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** 2001 (3rd edn) CSHL Press.
30. Wood BL, Gibson DF, Tait JF: **Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flowcytometric measurement and clinical associations.** *Blood* 1996, **88**:1873-1880.
31. Zhang Z, Marshall AG: **A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra.** *J Am Chem Soc Mass Spectrom*, 1998, **9**:225–233.

## Figure legends

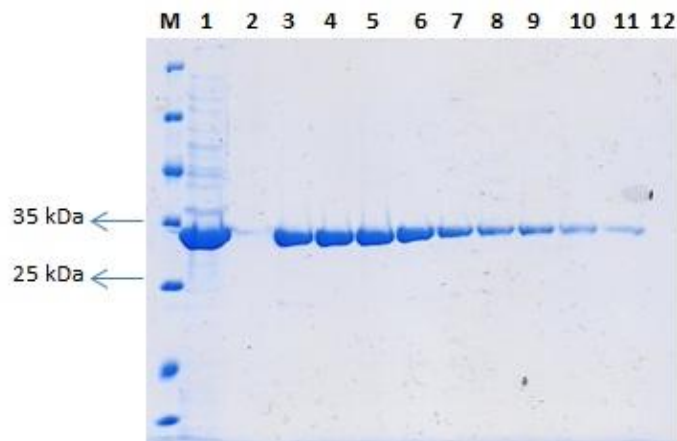


**Figure 1: Expression of rhANXA5 at different induction times.**

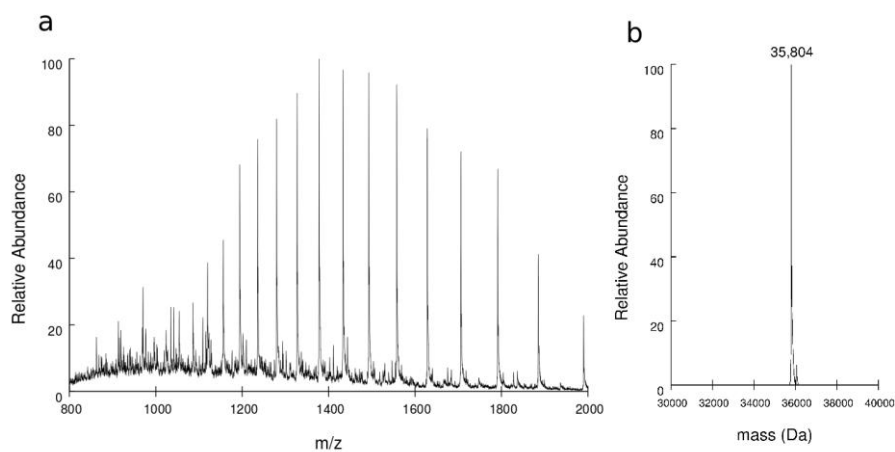
Bacterial culture cells transformed with pET-30a(+):ANXA5 were induced with 1mM IPTG at different times after the start of cultivations. Protein extracts were subjected to SDS-PAGE (12%) analysis. M corresponds to Unstained Protein MW Marker (Fermentas); Lane 1 corresponds to an OD600nm = 2 of a 30 h cultivation induced at 12h of culture. Lane 2 corresponds to an OD600nm = 2 of a 30 h cultivation induced at 18 h of culture; Lane 3 corresponds to an OD600nm = 2 of a 30 h cultivation induced at 24 h of culture.



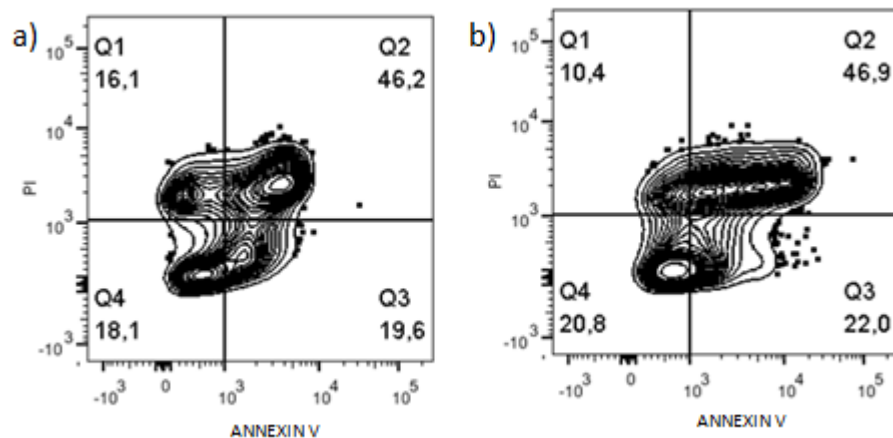
**Figure 2. SDS-PAGE analysis of rhANXA5 purification protocol steps.** SDS-PAGE (12%) analysis of fractions from different steps of rhANXA5 purification. **M** corresponds to Unstained Protein MW Marker (Fermentas); Lane **1**: cells treated with buffer A; Lane 2 cells treated with buffer A and buffer B (followed by sonication and centrifugation; Lane **3** dialyzed rhANXA5 against 20 mM HEPES, 100 Mm NaCl, pH 7.2.



**Figure 3. SDS-PAGE analysis of eluted fractions from rhANXA5 purification.** Eluted fractions from MonoQ HR16/10 were analysed by SDS-PAGE (12%). **M** corresponds to Unstained Protein MW Marker (Fermentas); Lane **1** corresponds to crude extract; Lanes **2-12** corresponds to MonoQ HR16/10 elution fractions.



**Figure 4. Determination of rhANXA5 molecular mass by mass spectrometry.** a) ESI-FTMS spectra of rhANXA5 showing charge state distribution spanning from 18+ to 39+. b) Experimentally determined value of 35,804 Da for rhANXA5 average molecular mass after spectra deconvolution.



**Figure 5. Analysis of apoptosis in B16F10 cells.** Flow cytometric analysis of apoptotic cells stained with annexin V FITC and PI using BD Biosciences kit or a home-made kit. Dot plots graphs show in the xaxis the annexin V-positive population and in the y-axis the PI population.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A anexina V recombinante está sendo amplamente utilizada para a detecção de apoptose tanto *in vitro* quanto *in vivo*, pois se liga fortemente aos resíduos de fosfatidilserina expostos pela membrana plasmática celular durante o processo de apoptose. Porém, os kits de Anexina V para detecção *in vitro* de apoptose comercializados no Brasil são importados, resultando em um alto custo do produto e um maior tempo de espera para a chegada da encomenda.

Assim, visando o desenvolvimento de um protocolo para a produção dessa proteína foi realizada a construção do gene que codifica a proteína ANXA5, através de um método baseado na patente desenvolvida pela empresa QuatroG Pesquisa & Desenvolvimento LTDA em parceria com a PUCRS [42]. Como produto final das reações de PCR obteve-se um fragmento de DNA de 962 pb. Este fragmento de DNA foi clonado no vetor pCR-Blunt® e subclonado em vetor de expressão pET-30a(+). A identidade, a integridade do gene e a ausência de mutações foram confirmadas por sequenciamento automático de DNA da sequência do plasmídeo recombinante em cepas de *E. coli*.

A ANXA5 foi expressa em células de *E. coli* BL21(DE3) na fração solúvel com aparente massa molecular de 35.8 kDa a 37°C em um meio semi-definido em nosso laboratório (NaCl, 0,5 g/L; NH<sub>4</sub>Cl, 1 g/L; extrato de levedura, 20 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g/L; glucose, 500g/L; MgSO<sub>4</sub>, 0,1 g/L; tiamina, 1 g/L; 1 mL de solução traço (FeSO<sub>4</sub>, 2,8 g/L; MnCl<sub>2</sub>, 2 g/L; CaCl<sub>2</sub>, 2 g/L; CuCl<sub>2</sub>, 0,26 g/L; ZnSO<sub>4</sub>, 0,3 g/L)), com indução de IPTG e coletadas após 6 h de indução.

Após a expressão da proteína em *shaker*, protocolos de purificação foram testados a fim de determinar um protocolo eficiente de purificação através da técnica de FPLC (*FastProteinLiquidChromatography*) ÄKTA Purifier System (GE HealthCare©). A proteína homogênea foi obtida através de um simples protocolo, descrito por [43], baseado em um tratamento da amostra com CaCl<sub>2</sub> e EDTA e posterior aplicação da amostra em um coluna cromatográfica de troca aniônica (MonoQ HR 16/10). A proteína eluiu em aproximadamente 0,250 M de NaCl.

Para os cultivos em biorreator, testamos diferentes estratégias de cultivo, como por exemplo, pHstat, método pelo qual o pH do cultivo varia quando a principal fonte de carbono presente no meio é depletada; DO stat, no qual o oxigênio dissolvido no meio aumenta consideravelmente quando o substrato é depletado do meio; e estratégia de alimentação linear, método pelo qual a vazão de alimentação independe do andamento do cultivo, sendo baseado em uma taxa de crescimento linear pré-estabelecido. Outro parâmetro testado foi o melhor horário para adição de IPTG no cultivo, 12 h, 18 h ou 24 h. O cultivo com alimentação linear e induzido após 18 h de cultivo mostrou uma biomassa máxima de 30.18 g/L após 30 h de cultivo. Quando comparada a diferença de crescimento celular em *shaker* e em biorreator, obtivemos um aumento de 48,75 vezes na OD<sub>600nm</sub> obtida em cultivos em biorreator.

Depois de estabelecidos os parâmetros de cultivo celular em biorreator, o mesmo protocolo de purificação estabelecido para células cultivadas através de *shaker* foi comparado, obtendo-se um rendimento de 20 mg de proteína homogênea tanto a partir das células cultivadas em *shaker* quanto a partir das células cultivadas em biorreator.

Para avaliarmos se a nossa proteína produzida realmente liga nos resíduos de fosfatidilserina e tem a capacidade de marcar células em processo de apoptose, conjugamos a proteína com um composto fluorescente FluoroTag™ FITC Conjugation Kit (Sigma-Aldrich® Co.). Células B16F10 de melanoma cultivadas em DMEM com 10% FBS, Gentamicina 80mg/L (Novafarma, Anápolis, Brasil) e Fungisona, 5mg/L (Bristol Myers Squibb, New York, NY, USA) foram rompidas pelo método de congelamento e descongelamento marcadas com o kit BD Bioscience FITC AnnexinApoptosisDetection kit II (Cat 556570) e com o kit Apoptosis/NecrosisDetection Kit from QuatroG P&D LTDA., produzido e comercializado em nosso laboratório. Todos os dados foram coletados em um Citômetro de Fluxo FACS Canto II (BD Bioscience) e analisados através do software FlowJo (TreeStat, San Carlos, CA). Os resultados obtidos utilizando-se os dois kits foram os mesmos, tendo apenas alguma pequena variação devido a metodologia utilizada para morte celular.

Esta é a primeira vez na literatura, até onde sabemos, que a proteína rhANXA5 é produzida em grandes quantidades em batelada alimentada através de cultivos de *E. coli* por biorreator, sendo possível obtermos o mesmo rendimento de proteína homogênea.

A Anexina V está sendo utilizada atualmente na detecção de apoptose em pacientes com câncer, sendo possível avaliar mais precocemente, através de exames de cintilografia em Medicina Nuclear, a eficácia de determinados tratamentos quimioterápicos, uma vez que estes medicamentos tem como princípio a morte das células cancerosas por apoptose.

O avanço científico tem permitido o emprego industrial de microrganismos ou células modificadas geneticamente objetivando a produção de proteínas de interesse em diversas áreas e, em especial, na saúde humana. A realização de experimentos para aperfeiçoar a produção em larga escala da proteína rhANXA5 visa futuramente suprir a demanda do mercado nacional. Sendo assim, a realização deste projeto tem como objetivo a produção nacional com tecnologia de ponta desta proteína. Com isso, este trabalho pretende contribuir para a sensível redução de custos com importação e o fornecimento do produto a um número maior consumidores brasileiros.

## 8 REFERÊNCIAS

1. PENNSTATE UNIVERSITY. Membrane Structure and Function. Pennsylvania [2009] Disponível em: <https://wikispaces.psu.edu/display/Biol230WFall09/Membrane+Structure+and+Function> Acesso em: 27 fev 2013.
2. UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS (UCPEL). Pelotas, RS. Disponível em: <http://paginas.ucpel.tche.br/~mflessa/bi6.html> Acesso em: 27 fev 2013.
3. CHANDAR N, VISELLI, S. Cell and Molecular Biology. Philadelphia: **Wollters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health**; 2010.
4. SINGER S J AND NICOLSON G L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science** 175:720-31, 1972.
5. ALBERTS *et al.* Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: **Garland Science Publishing**; 2002
6. COELHO TH. Fisiologia das Membranas Celulares. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; 2001.
7. DALEKE DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. **J Lipid Res.** Feb;44(2):233-42; 2003.
8. ALBERTS B *et al.* Fundamentos da Biologia Celular. 2ª ed. Porto Alegre: **Editora Artmed**; 2006.
9. KERR JFR, WYLLIE AH and CURRRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer** (1972) 26, 239-257.
10. ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **ToxicolPathol.** 2007 Jun; 35(4):495-516.
11. DASH P. Apoptosis: Disponível em: <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/apoptosis.pdf>. Acesso em: 12 nov 2011.
12. DEGTAREV A and YUAN J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nat Rev Mol Cell Biol.** (2008) 9(5): 378-90.
13. D'ARCEUIL H, RHINE W, CRESPIGNY A, YENARI M, TAIT JF, et al. (2000) 99mTc Annexin V imaging of neonatal hypoxic brain injury. **Stroke** 31: 2692-2700.

14. ELMORE, S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **ToxicolPathol** 35: 495-516.
15. BOERSMA HH, KIETSELAER BL, STOLK LM, BENNAGHMOUCH A, HOSFRA L, Narula J, *et al.* Past, Present, and Future of Annexin A5: From Protein Discovery to Clinical Applications. **J Nucl Med**. 2005 Dec;46(12):2035-50.
16. LAHORTE CM, VANDERHEYDEN JL, STEINMETZ N, VAN de WIELE C, DIERCKZ RA, SLEGGERS, G. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**. 2004 Jun;31(6):887-911.
17. MARTINEZ MM, REIF RD, PAPPAS D. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. **Anal Methods** 2010;2:996-1004.
18. GRIVICICH I, REGNER A, Rocha, AB. Morte Celular por Apoptose. **RevBrasCancerol**. 2007;53(3):335-43
19. RASTOGI RP, RICHA and SINHA RP. Apoptosis: Molecular Mechanisms and Pathogenicity. **EXCLI Journal**2009;8:155-181.
20. NIU G, CHEN X. Apoptosis Imaging: Beyond Annexin V. **J Nucl Med**. 2010 Nov;51(11):1659-62.
21. GROSSE J, GRIMM D, WESTPHAL K, ULBRICH C, POHL F, KOEBL O, *et al.* Radiolabeled annexin V for imaging apoptosis in irradiated human follicular thyroid carcinomas – is an individualized protocol necessary? **Nucl Med Biol**. 2009 Jan;36 (1):89-98.
22. TAIT JF. Imaging of apoptosis. **J Nucl Med**. 2008 Oct;49(10):1573-76.
23. FADOK VA, BRATTON S, FRASCH C, WARNER ML, HENSON PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. **CellDeathDiffer**. 1998 Jul;5(7):551-62.
24. TAKEI T, KUGE Y, ZHAO S, SATO M, STRAUSS W, BLANKENBERG FG *et al.* Time Course of Apoptotic Tumor Response After a Single Dose of Chemotherapy: Comparison with 99mTc- Annexin V Uptake and Histologic Findings in an Experimental Model. **J Nucl Med**. 2004 Dec;45(12):2083-87.
25. SCHLEGEL RA, WILLIAMSON P. Phosphatidylserine, a death knell. **Cell Death Differ**. 2001 (8):551-563.
26. REUTELINGSPERGER CP, HORNSTRA G, HEMKERHCL. Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of umbilical cord. **Eur J Biochem**. 1985 Sep 16;151(3):625-629.

27. TAIT JF, GIBSON D. Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content. **Arch BiochemBiophys.** 1992 Oct;298(1):187-91.
28. THIAGARAJAN P, TAIT JF. Collagen induced exposure of anionic phospholipid in platelets and platelet-derived microparticles. **J BiolChem.**1991 Dec25;266(36):24302-07.
29. PFÄFFLE M, RUGGIERO F, HOFMANN H, FERNANDEZ MP, SELMIN O, YAMADA Y, *et al.* Biosynthesis, secretion and extracellular localization of anchorin CII, a collagen-binding protein of the calpactin family. **EMBO J.** 1988 Aug;7(8):2335-42.
30. ROJAS E, POLLARD HB, HAIGLER HT, PARRA C, BURNS AL. Calcium-activated endonexin II forms calcium channels across acidic phospholipid bilayer membranes. **J Biol Chem.** 1990 Dec 5;265(34):21207-15.
31. PEPINSKY RB, TIZARD R, MATTALIANO RJ, SINCLAIR LK, MILLER GT, BROWNING JL, *et al.* Five distinct calcium and phospholipid binding proteins share homology with lipocortin I. **J Biol Chem.** 1988 Aug 5;263(22):10799-811.
32. SCHLAEPFER DD, JONES J, HAIGLER HT. Inhibition of protein kinase C by annexin V. **Biochemistry.** 1992 Feb 18;31(6):1886-91.
33. COOKSON BT, ENGELHARDT S, SMITH C, BARNFORD HA, PROCHAZKA, TAIT JF. Organization of the Human Annexin V (ANX5) Gene. **Genomics,** 1994 Apr;20(3):463-467.
34. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, U.S. National Library of Medicine. Gene ID: 308. Acesso em 27 fev 2013.
35. BLANKENBERG FG, STRAUSS HW. Will imaging of apoptosis play a role in clinical care? A tale of mice and men. **Apoptosis.** 2001 (6) 117-123.
36. NEUMANN JM, SANSON A, LEWIT-BENTLEY, A. Calcium-induced changes in annexin V behavior in solution as seen by proton NMR spectroscopy. **Eur. J. Biochem.** 1994 (225) 819-825.
37. MAGRANE M. The UniProt consortium. UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. [Database, 2011.](#) <Anxa5\_Human>. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/P08758>>. Acesso em: 5 janeiro 2012.
38. LEE SY (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol** 14: 98-105.
39. VASALA, A., PANULA, J., BOLLOK, M., ILLMANN, L., HALSIG, C., NEUBAUER, P., 2006. A new wireless system for decentralised measurement of physiological parameters from shake flasks. **Microbial Cell Factors,** 5:8.

40. KOSINSKI, M.J., BAILEY, J.E., 1991. Temperature and induction effects on the degradation rate of an abnormal/3-galactosidase in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. 18, 55-68.
41. SORENSEN, H.P., MORTENSEN, K.K., 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. 115, 113–128.
42. SANTOS DS, CHIES JM, BASSO LA, RENARD G, FONSECA IO (2006) Method for the obtainment of chimeric nucleotide sequences and chimeric nucleotide sequences. Patent application WO2007/068068 A2.
43. WOOD BL, GIBSON DF, TAIT JF (1996) Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. *Blood* 88:1873-1880.

## 9 ANEXO

### 9.1 ANEXO I

# Homo sapiens annexin A5 (ANXA5), mRNA

NCBI ReferenceSequence: NM\_001154.3

CDS:

[FASTAGraphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS NM\_001154 963 bp mRNA linear PRI 24-JUL-2011  
DEFINITION Homo sapiens annexin A5 (ANXA5), mRNA.  
ACCESSION [NM\\_001154](#) REGION: 166..1128  
VERSION NM\_001154.3 GI:186680508  
KEYWORDS .  
SOURCE Homo sapiens (human)  
ORGANISM [Homo sapiens](#)  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;  
Catarrhini; Hominidae; Homo.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 963)  
AUTHORS Siedlinski, M., Cho, M.H., Bakke, P., Gulsvik, A., Lomas, D.A.,  
Anderson, W., Kong, X., Rennard, S.I., Beaty, T.H., Hokanson, J.E.,  
Crapo, J.D. and Silverman, E.K.  
CONSTRM the COPD Gene Investigators and ECLIPSE Investigators  
TITLE Genome-wide association study of smoking behaviours in patients  
with COPD  
JOURNAL Thorax (2011) In press  
PUBMED [21685187](#)  
REMARK Publication Status: Available-Online prior to print  
REFERENCE 2 (bases 1 to 963)  
AUTHORS Irman, S., Skarabot, M., Musevic, I., Rozman, B. and Bozic, B.  
TITLE The use of atomic force microscopy to study the pathologic effects  
of anti-annexin autoantibodies  
JOURNAL J. Autoimmun. 36 (2), 98-105 (2011)  
PUBMED [21185149](#)  
REMARK GeneRIF: Data show that annexin A5 autoantibodies from patients  
produced a significant disruption of incomplete annexin A5  
crystalline shield on phospholipid bilayer.  
REFERENCE 3 (bases 1 to 963)  
AUTHORS Ungethum, L., Kenis, H., Nicolaes, G.A., Autin, L., Stoilova-McPhie, S.  
and Reutelingsperger, C.P.  
TITLE Engineered annexin A5 variants have impaired cell entry for  
molecular imaging of apoptosis using pretargeting strategies  
JOURNAL J. Biol. Chem. 286 (3), 1903-1910 (2011)  
PUBMED [21078669](#)  
REMARK GeneRIF: The anxA5 variants with impaired internalization are  
superior molecular imaging agents in pretargeting strategies as  
compared with wild-type anxA5.  
REFERENCE 4 (bases 1 to 963)  
AUTHORS Faria, D., Dahimene, S., Alessio, L., Scott-Ward, T., Schreiber, R.,  
Kunzelmann, K. and Amaral, M.D.  
TITLE Effect of Annexin A5 on CFTR: regulated traffic or scaffolding?  
JOURNAL Mol. Membr. Biol. 28 (1), 14-29 (2011)  
PUBMED [21067452](#)  
REMARK GeneRIF: annexin A5 has multiple effects on CFTR, so that the net



effect observed is cell system-dependent

REFERENCE 5 (bases 1 to 963)

AUTHORS Markoff,A., Gerdes,S., Feldner,S., Bogdanova,N., Gerke,V. and Grandone,E.

TITLE Reduced allele specific annexin A5 mRNA levels in placentas carrying the M2/ANXA5 allele

JOURNAL Placenta 31 (10), 937-940 (2010)

PUBMED [20805002](#)

REMARK GeneRIF: The M2 allele of ANXA5 can be linked to reduced mRNA levels in heterozygous placentas and could result in more confined protein levels (lowered expression dynamics) of annexin A5.

REFERENCE 6 (bases 1 to 963)

AUTHORS Kirsch,T. and Pfaffle,M.

TITLE Selective binding of anchorin CII (annexin V) to type II and X collagen and to chondrocalcin (C-propeptide of type II collagen).

Implications for anchoring function between matrix vesicles and matrix proteins

JOURNAL FEBS Lett. 310 (2), 143-147 (1992)

PUBMED [1397263](#)

REFERENCE 7 (bases 1 to 963)

AUTHORS Dawson,S.J. and White,L.A.

TITLE Treatment of Haemophilusaphrophilus endocarditis with ciprofloxacin

JOURNAL J. Infect. 24 (3), 317-320 (1992)

PUBMED [1602151](#)

REFERENCE 8 (bases 1 to 963)

AUTHORS Schlaepfer,D.D., Jones,J. and Haigler,H.T.

TITLE Inhibition of protein kinase C by annexin V

JOURNAL Biochemistry 31 (6), 1886-1891 (1992)

PUBMED [1310621](#)

REFERENCE 9 (bases 1 to 963)

AUTHORS Huber,R., Berendes,R., Burger,A., Schneider,M., Karshikov,A., Luecke,H., Romisch,J. and Paques,E.

TITLE Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins

JOURNAL J. Mol. Biol. 223 (3), 683-704 (1992)

PUBMED [1311770](#)

REFERENCE 10 (bases 1 to 963)

AUTHORS Tait,J.F., Frankenberry,D.A., Shiang,R., Murray,J.C., Adler,D.A. andDisteche,C.M.

TITLE Chromosomal localization of the human gene for annexin V (placental anticoagulant protein I) to 4q26---q28

JOURNAL Cytogenet.Cell Genet. 57 (4), 187-192 (1991)

PUBMED [1683830](#)

COMMENT REVIEWED [REFSEQ](#): This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from [AK312644.1](#), [J03745.1](#) and [BC001429.2](#).

On Apr 25, 2008 this sequence version replaced gi:[4809273](#).

Summary: The protein encoded by this gene belongs to the annexin family of calcium-dependent phospholipid binding proteins some of which have been implicated in membrane-related events along exocytotic and endocytotic pathways. Annexin 5 is a phospholipase

A2 and protein kinase C inhibitory protein with calcium channel activity and a potential role in cellular signal transduction, inflammation, growth and differentiation. Annexin 5 has also been described as placental anticoagulant protein I, vascular anticoagulant-alpha, endonexin II, lipocortin V, placental protein 4 and anchorin CII. The gene spans 29 kb containing 13 exons, and encodes a single transcript of approximately 1.6 kb and a protein product with a molecular weight of about 35 kDa. [provided by RefSeq].

Publication Note: This RefSeq record includes a subset of the publications that are available for this gene. Please see the Gene record to access additional publications.

COMPLETENESS: full length.

PRIMARY	REFSEQ_SPAN	PRIMARY_IDENTIFIER	PRIMARY_SPAN	COMP
	1-101	AK312644.1	1-101	
	102-1275	J03745.1	96-1269	
	1276-1624	BC001429.2	1181-1529	
FEATURES	Location/Qualifiers			
source	1..963	/organism="Homo sapiens" /mol_type="mRNA" /db_xref="taxon: <a href="#">9606</a> " /chromosome="4" /map="4q27"		
gene<1..>963		/gene="ANXA5" /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4" /note="annexin A5" /db_xref="GeneID: <a href="#">308</a> " /db_xref="HGNC: <a href="#">543</a> " /db_xref="HPRD: <a href="#">00568</a> "		
		/db_xref="MIM: <a href="#">131230</a> "		
exon<1..>9		/gene="ANXA5" /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4" /inference="alignment:Splign" /number=2		
CDS	1..963	/gene="ANXA5" /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4" /note="endonexin II; anchorin CII; lipocortin V; placental anticoagulant protein I; CBP-I; PAP-I; VAC-alpha; annexin V; annexin-5; calphobindin I; thromboplastin inhibitor; vascular anticoagulant-alpha; placental anticoagulant protein 4"		
		/codon_start=1 /product="annexin A5" /protein_id=" <a href="#">NP_001145.1</a> " /db_xref="GI:4502107" /db_xref="CCDS: <a href="#">CCDS3720.1</a> " /db_xref="GeneID: <a href="#">308</a> " /db_xref="HGNC: <a href="#">543</a> " /db_xref="HPRD: <a href="#">00568</a> " /db_xref="MIM: <a href="#">131230</a> " /translation="MAQVLRGTVTDFPGFDERADAETLRKAMKGLGTDEESILTLTSSRSNAQRQEISAAFKTLFGRDLLDDLKSELTKGFEKLIIVALMKPSRLYDAYELKHALKAGTNEKVLTEIIASRTPPEELRAIKQVYEEYEGSSLEDDVVGDTSGYYQRMVLVLLQANRDPDAGIDEAQVEQDAQALFQAGELKWTDEEKFITIFGTRSVSHLRKVFDDKYMTISGFQIEETIDRETSGNLEQLLLAVVKSIRSIPAYLAETLYYAMKGAGTDDHTLIRVMVSRSEIDLFNIRKEFRKNFATSLYSMIKGDTS GDYKKALLLLCGEDD"		
misc_feature	4..6	/gene="ANXA5" /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4" /experiment="experimental evidence, no additional details"		
recorded"		/note="N-acetylalanine; propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P08758.2); acetylation site"		
misc_feature	70..252	/gene="ANXA5" /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4" /experiment="experimental evidence, no additional details"		
recorded"		/note="propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P08758.2); Region: Annexin 1"		
misc_feature	208..210	/gene="ANXA5" /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4" /experiment="experimental evidence, no additional details"		
recorded"		/note="N6-acetyllysine; propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P08758.2); acetylation site"		

```

misc_feature      226..228
                  /gene="ANXA5"
                  /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
                  /experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
                  /note="N6-acetyllysine; propagated from
UniProtKB/Swiss-Prot (P08758.2); acetylation site"
misc_feature      235..237
                  /gene="ANXA5"
                  /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
                  /experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
                  /note="N6-acetyllysine; propagated from
UniProtKB/Swiss-Prot (P08758.2); acetylation site"
misc_feature      280..282
                  /gene="ANXA5"
                  /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
                  /experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
                  /note="Phosphotyrosine; propagated from
UniProtKB/Swiss-Prot (P08758.2); phosphorylation site"
misc_feature      286..468
                  /gene="ANXA5"
                  /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
                  /experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
                  /note="propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P08758.2);
Region: Annexin 2"
misc_feature      289..291
                  /gene="ANXA5"
                  /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
                  /experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
                  /note="N6-acetyllysine; propagated from
UniProtKB/Swiss-Prot (P08758.2); acetylation site"
misc_feature      301..303
                  /gene="ANXA5"
                  /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
                  /experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
                  /note="N6-acetyllysine; propagated from
UniProtKB/Swiss-Prot (P08758.2); acetylation site"
misc_feature      538..720
                  /gene="ANXA5"
                  /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
                  /experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
                  /note="propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P08758.2);
Region: Annexin 3"
misc_feature      763..945
                  /gene="ANXA5"
                  /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
                  /experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
                  /note="propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P08758.2);
Region: Annexin 4"
exon              10..94
                  /gene="ANXA5"
                  /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
                  /inference="alignment:Splign"
                  /number=3
exon              95..189
                  /gene="ANXA5"
                  /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
                  /inference="alignment:Splign"
                  /number=4
exon              190..303
                  /gene="ANXA5"

```

```

        /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
        /inference="alignment:Splign"
        /number=5
exon      304..394
        /gene="ANXA5"
        /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
        /inference="alignment:Splign"
        /number=6
exon      395..474
        /gene="ANXA5"
        /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
        /inference="alignment:Splign"
        /number=7
exon      475..531
        /gene="ANXA5"
        /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
        /inference="alignment:Splign"
        /number=8
exon      532..625
        /gene="ANXA5"
        /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
        /inference="alignment:Splign"
        /number=9
exon      626..721
        /gene="ANXA5"
        /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
        /inference="alignment:Splign"
        /number=10
exon      722..780
        /gene="ANXA5"
        /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
        /inference="alignment:Splign"
        /number=11
exon      781..903
        /gene="ANXA5"
        /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
        /inference="alignment:Splign"
        /number=12
exon      904..>963
        /gene="ANXA5"
        /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
/inference="alignment:Splign"
        /number=13
    STS      938..>963
        /gene="ANXA5"
        /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
        /standard_name="SHGC-67991"
        /db_xref="UniSTS:72449"
    STS      961..>963
        /gene="ANXA5"
        /gene_synonym="ANX5; ENX2; PP4"
        /standard_name="WI-18730"
        /db_xref="UniSTS:60538"

```

ORIGIN

```

1 atggcacaggttctcagaggcactgtgactgacttccctggatttgatgagcgggctgat
   61 gcagaaactcttcggaaggctatgaaaggcttgggcacagatgaggagagcatcctgact
  121 ctggtgacatcccgaagtaatgctcagcgcaggaaatctctgcagcttttaagactctg
  181 tttggcaggatcttctggatgacctgaaatcagaactaactggaaaatttgaaaaatta
  241 attgtggctctgatgaaaccctctcggctttatgatgcttatgaaactgaaacatgccttg
  301 aagggagctggaacaaatgaaaaagtactgacagaaattattgcttcaaggacacctgaa
  361 gaactgagagccatcaacaagtttatgaagaagaatattggctcaagcctggaagatgac
  421 gtggtgggggacacttcagggtactaccagcggatggttggtggttctccttcaggctaac
  481 agagaccctgatgctggaattgatgaagctcaagttgaaacaagatgctcaggctttattt
  541 caggctggagaacttaaatgggggacagatgaagaaaagtttatcaccatctttggaaca
  601 cgaagtgtgtctcatttgagaagggtttgacaagtacatgactatatacaggatttcaa
  661 attgaggaaccattgaccgcgagacttctggcaatttagagcaactactccttgctggtt
  721 gtgaaatctattcgaagtatacctgcctaccttgacagaccctctattatgctatgaag
  781 ggagctgggacagatgatcataccctcatcagagtcaggttccaggagtgaagattgat

```

841 ctgtttaacatcaggaaggagtttaggaagaatTTTgCCacCtCtCtttattccatgatt  
901 aaggagatacatctggggactataagaaagctcttctgctgctctgtggagaagatgac  
961 taa