

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA INTERLEUCINA 17 EM *Escherichia coli*.

VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES¹; ANA BERTOLDO BANDEIRA¹; YASMINE ALVES MENEGON¹; LÍVIA BUDZIAREK ESLABÃO²; RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINÉ²; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE³

¹Graduando em Biotecnologia – anabbertoldo@gmail.com; vitoriasgon@gmail.com; yasminealves27@gmail.com

²Pós graduando em Biotecnologia – liviaeslabao@gmail.com; renanbiotec@gmail.com

³Docente do Núcleo de Biotecnologia – fabio_leite@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 a 30 kDa. Diferentes tipos de células podem secretar a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em células diferentes. Sendo produzidas no local de lesão ou pelo sistema imunológico, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatória, Th1) ou atenuar (anti-inflamatória, Th2) a resposta inflamatória (OLIVEIRA et al., 2011).

A interleucina 17 (IL-17) é uma citocina pró-inflamatória com diversas funções biológicas. Ela tem sido associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes, rejeição de enxertos, reações de hipersensibilidade imediata e tardia, ao monitoramento de infecções e também desempenha um papel na resposta imune contra parasitos.

Muitos helmintos, principalmente aqueles que apresentam migração tecidual, podem ser considerados como xenoinxertos funcionais. Por essa razão percebe-se que eles são rejeitados pelo sistema imune mediado por células (VELEZ, 2007). Desta forma, surge o interesse pelo conhecimento e caracterização das interleucinas envolvidas no processo de inflamação provocado por helmintos e protozoários.

A IL-17 e os linfócitos Th17 têm um papel importante na patogênese de várias doenças autoimunes e imunomediadas. A IL-17A, é produzida pelos linfócitos Th17 juntamente com outras citocinas efetoras, e também é expressa por células do sistema imune inato, incluindo os mastócitos, neutrófilos e células dendríticas (TORRES et al., 2014).

O objetivo do trabalho foi a clonagem e a expressão, em *Escherichia coli*, da interleucina 17.

2. METODOLOGIA

Foi construído in silico *primers* específicos segundo a sequência depositada no GeneBank (AF412040), com o auxílio do programa Vector NTI v.10 (Invitrogen). A partir de amostras de cDNA de esplenócitos de bovinos, foi realizada o PCR para amplificação do gene da interleucina 17 para posterior inserção no plasmídeo pAE, o qual é responsável pela adição de 6 histidinas a proteína expressa.

O produto proveniente da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e o vetor de expressão foram submetidos a restrição com as enzimas

EcoRI e *XhoI* (BioLabs). Logo após, a ligação foi realizada com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen). O produto da ligação foi utilizado na transformação da cepa *E. coli* TOP10 e a seleção dos clones recombinantes foi efetuada através da técnica de MicroPrep (SAMBROCK e RUSSEL, 2001).

Os clones foram confirmados pela técnica da PCR e, posteriormente, o produto da PCR foi digerido com a enzima *KpnI*. O clone foi selecionado para a transformação da cepa de expressão *E. coli* BL21 StarTM (DE3). A cepa foi cultivada durante 3 horas, a 37 °C e 170 rpm, na presença de 1mM de IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*). O cultivo após a indução foi centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células formado foi eluído em tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*). A lise celular foi realizada por ultrassom (sonicação) seguida da adição de Lisozima (100 mg/mL), com incubação de 30 minutos a 4 °C. Depois da incubação a amostra foi centrifugada e seu sobrenadante foi coletado. O sobrenadante contendo a proteína recombinante foi analisado pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na concentração de 20% (Figura 1).

A produção da proteína recombinante foi confirmada através da técnica de *Dot-Blot* em membrana de nitrocelulose (BioRad). A membrana foi dividida em três colunas, na coluna 1 foi aplicada 7ul da amostra do sobrenadante após a lise por sonicação e lisozima. Na coluna 2 foi adicionada uma proteína contendo cauda de histidina como controle positivo, e na coluna 3 foi aplicada uma amostra de extrato da cepa *E. coli* BL21 StarTM (DE3) não transformada, utilizada como controle negativo. Após a aplicação das amostras, foi realizado o bloqueio com leite em pó 5% diluído em PBS-T (*Phosphate Buffered Saline* + *Tween 20*) por 40 minutos a 37 °C. A membrana foi submetida à incubação com anticorpo monoclonal anti-6xHis (reconhece a cauda composta por 6 histidinas) diluído 1:5000 (Sigma). A reação foi incubada por 1 hora a 37 °C em agitador orbital, em seguida a membrana foi lavada com PBS-T e foi realizada uma nova incubação nas mesmas condições com conjugado anti-mouse (Sigma). A reação foi revelada com diaminobenzidina (Figura 2).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sugerem a expressão da proteína recombinante, apresentando peso molecular de aproximadamente 14 kDa (Figura 1). Além disso, foi possível observar que a expressão da proteína recombinante ocorreu antes mesmo da indução com IPTG. Já a técnica de *Dot-Blot* confirmou a presença da mesma proteína (Figura 2) frente à incubação com anticorpos que reconhecem a cauda de histidina presente na proteína recombinante, que foi adicionada na clonagem com o vetor pAE.

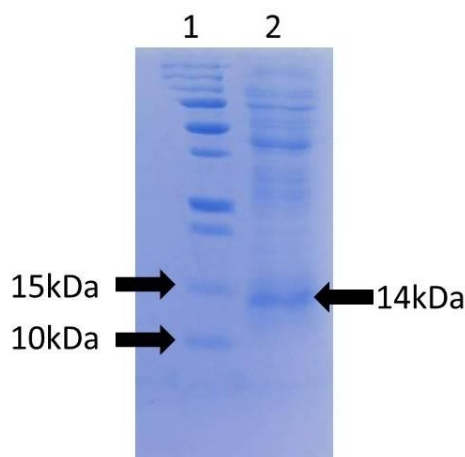


Figura 1 – SDS-PAGE 20% da extração da proteína. 1) Marcador Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad), 2) Amostra do sobrenadante após a lise por sonicação e lisozima.

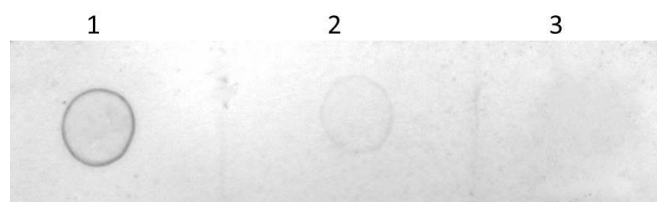


Figura 2 – *Dot-blot* revelado com anti-his. 1) Amostra do sobrenadante após a lise por sonicação e lisozima, 2) Proteína com cauda de 6x histina, 3) Extrato da cepa *E. coli* BL21 StarTM (DE3) não transformada.

4. CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho, conclui-se que através das metodologias utilizadas foi possível clonar e expressar a interleucina 17 em *E. coli* BL21 StarTM (DE3). A proteína foi solubilizada sem a utilização de nenhum agente desnaturante. No entanto, são necessários testes em modelos biológicos para verificar se sua atividade de sinalização não foi prejudicada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OLIVEIRA, C. M. B. de et al. Citocinas e dor. **Rev. Bras. Anesthesiol.** [online]. 2011, vol.61, n.2, pp. 260-265. ISSN 0034-7094. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-70942011000200014>.

VELEZ MARIN, VIVIANA MARÍA; PARIS ANGEL, SARA CLAUDIA and GARCIA MORENO, LUIS FERNANDO. Interleucina-17: características, vías de diferenciación, señalización y funciones biológicas. *Iatreia* [online]. 2007, vol.20, n.2, pp. 186-195. ISSN 0121-0793.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

TORRES, T., FILIPE, P.. Interleucina-17 como Alvo Terapêutico na Psoríase. **Acta Médica Portuguesa**, América do Norte, 27, abr. 2014. Disponível em:

<<http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/4777>>.

Acesso em: 25 Jul. 2014.