

CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DA INTERLEUCINA 17 A DE *Bos Taurus* EM *Escherichia coli*

VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES¹; RODRIGO CASQUERO CUNHA²; ALCEU GONÇALVES DOS SANTOS JUNIOR³; RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINÉ⁴; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS⁵; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas – vitoriasgon@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha_vet@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – alceugsjr@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – renanbiotec@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – denis.santos195@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br

1. INTRODUÇÃO

As citocinas são os principais mediadores celulares, responsáveis pela comunicação celular, podendo ser polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares. São hidrossolúveis e podem variar de 8 a 30kDa. Elas atuam principalmente de forma parácrina e autócrina (LIN et al., 2000). Dependendo de sua ação sobre as células, elas podem ser consideradas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, regulando dessa forma a atividade, diferenciação, proliferação e a sobrevivência da célula, além do controle da produção e da atividade de outras citocinas (CURFS et al., 1997). As citocinas serão agrupadas em interleucinas, fatores de necrose tumoral, quimiocinas, interferons e fatores de crescimento mesenquimal (RAEBURNS et al., 2002).

A subpopulação de linfócitos Th17 é destacada por atuarem como importantes células na proteção contra infecções por microrganismos extracelulares (WAITE et al., 2012). Os linfócitos Th17 secretam, principalmente a Interleucina 17, mas também são responsáveis pela secreção de IL-22 e IL-26 (CHEN et al., 2007).

A IL-17A é uma citocina altamente pró-inflamatória, produto do gene que possui 150 aminoácidos, pertencente a uma família com mais 5 interleucinas 17 (MOSELEY, et al., 2003). Quando encontra seu receptor a IL-17 ativa as vias de MAP quinases, e os fatores de transcrição, que vão regular a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias (SHALOM-BARAK et al., 1998), favorecendo dessa forma o recrutamento de neutrófilos no sítio de infecção aguda (STARK, et al., 2005). Além de estar sendo relatada como uma citocina ativa no desenvolvimento de doenças autoimunes, inflamações, sabe-se que seu principal papel biológico é a ativação de neutrófilos durante o processo inflamatório (STARK et al., 2005) e a ação contra patógenos (AUJLA et al., 2008). Portanto o interesse pela expressão de forma recombinante da IL-17 surge com a possibilidade de produção de insumos para a utilização em pesquisas, e diferentes aplicações como produção de anticorpos monoclonais.

O objetivo do trabalho foi a clonagem, expressão e caracterização, 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 à 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 RosettaTM. 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 eluído em tampão Akta Wash sem uréia, sonificado e incubado com Lisozima. O sobrenadante foi armazenado a 4 °C e o *pellet* eluído em Akta Wash com ureia e incubado a 4 °C por 3h sob agitação. Houve uma nova centrifugação e posteriormente purificado.

As amostras nos tampões de solubilização, resultante das centrifugações, foram filtradas para a retirada de restos celulares antes da purificação. Após a filtração, as amostras foram submetidas à cromatografia de afinidade com o uso da coluna de níquel HisTrap TALON[®].

Para a caracterização da proteína recombinante, foi utilizada a técnica de *Western blot*. As amostras da proteína foram eletrotransferidas de um gel de SDS, após a corrida para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com leite em pó 5%, diluído em PBS-T (*phosphate buffered saline* + 0,05% de *Tween* 20). Para detecção da *tag* de histidina presentes na proteína recombinante, foi utilizado anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHis, por 1h, na diluição 1:5000 em PBS-T. A membrana foi incubada com anticorpo secundário (anti-mouse) conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), na mesma diluição. Para revelação da reação foi utilizado 0,006 mg de DAB (3,3'-Diaminobenzidina) em solução contendo Tris HCl 50mM, Sulfato de Níquel 0,3% e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela técnica de eletroforese após a purificação dos sobrenadantes sugerem a expressão da Interleucina 17 em sua forma recombinante quando na presença do agente desnaturante ureia, com peso molecular aproximado de 14 kDa (Figura 1). No entanto, são necessários testes em modelos biológico para verificar se sua atividade biológica.

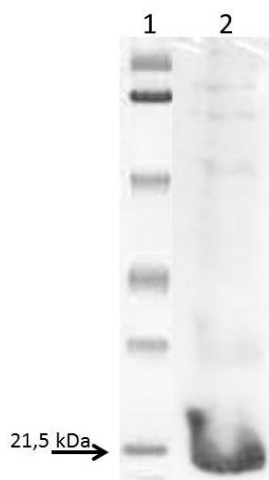


Figura 1: SDS-PAGE 15% - 1) Marcador de peso molecular – *Prestained SDS-PAGE Standards, low range*; 2) rIL-17A purificada apresentando aproximadamente 19 kDa.

A técnica de Western-Blot confirmou a presença da proteína (Figura 2) frente a incubação com anticorpos que reconhecem a cauda de histidina que está presente na proteína recombinante. Dessa forma sabe-se que o processo de clonagem e de purificação foram realizados com êxito.



Figura 2: *Western Blot* - Membrana de nitrocelulose – 1) Marcador de peso molecular- *Prestained SDS-PAGE Standards, low range* 2) rIL-17A com aproximadamente 19 kDa.

4. CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho pode-se concluir que através da metodologia utilizada foi possível clonar, expressar e caracterizar a interleucina 17 em *E. coli* Rosetta™. Como perspectivas futuras, serão realizados testes para estudo da atividade biológica da IL-17A recombinante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUJLA, S.; CHAN, Y.; ZHENG, M. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. **Nature medicine**. v.14, n.3, p.275-281, 2008.
- CHEN, Z.; TATO, C.; MUUL, L. Distinct regulation of interleukine-17 in human T helper lymphocytes. **Arthritis and rheumatism**. v.56, n.9, p.2936-2946, 2007.
- CURFS, J.; MEIS, J.; HOOBKAMPS, J. A primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**. v.10, n.4, p. 742-780, 1997.
- LIN, E.; CALVANO, S.; LOWRY, S. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**. v.127, n.2, p.117-126, 2000.
- MOSELEY, T.; HAUDENSCHILD, D.; ROSE, L. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. **Cytokine and Growth Factor Reviews**. v.14, n.2, p.155-174, 2003.
- RAEBURN, C.; SHEPPARD, F.; BARSNESS, K. Cytokines for surgeons. **American Journal of Surgery**. v.183, n.3, p.268-273, 2002.
- SHALOM-BARAK, T.; QUACH, J.; LOTZ, M. Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF- κ B. **Journal Biological Chemistry**. v.273, n.42, p.27467-27473, 1998.
- STARK, M.; HUO, Y.; BURCIN, T. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. **Immunity**. v.22, n.3, p.285-294, 2005.
- WAITE, J.; SKOKOS, D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. **International Journal of Inflammation**. v.2012 p.10, 2012.