

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CITOCINAS RECOMBINANTES IL-6 E TNF- α DE HAMSTER SÍRIO DOURADO UTILIZANDO *Escherichia coli* COMO SISTEMA DE EXPRESSÃO HETERÓLOGO

PEDRO HENRIQUE FILGUEIRAS COELHO SOUZA¹; ANA CAROLINA KURZ PEDRA²; MARA ANDRADE COLARES MAIA²; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS²; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA²; THAÍS LARRÉ OLIVEIRA BOHN³

¹Universidade Federal de Pelotas – pedroh577@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carolpedraa@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – maraacmaia@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – denis.santos195@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – oliveira_natasha@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – thais.larreoliveira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) é comumente empregado como um modelo de pesquisa em estudos relacionados a doenças infecciosas, como a leishmaniose e a leptospirose (MIAO et al., 2019). Este modelo é eficaz para a compreensão da patogênese de diversas infecções por ser suscetível a uma ampla gama de patógenos de relevância para a saúde humana e animal (MIAO et al., 2019).

Ratos e camundongos, modelos amplamente utilizados na experimentação animal, dispõem de uma vasta gama de insumos comerciais para avaliação da resposta imune humoral e celular (MIAO et al., 2019). No entanto, no caso do hamster sírio dourado, os estudos relacionados à análise da imunidade são restritos à avaliação da resposta humoral (MIAO et al., 2019). A resposta imune celular desempenha um papel crucial na comunicação e regulação de processos biológicos que são essenciais para a sobrevivência e funcionamento dos organismos, além de ser fundamental no entendimento de diversas patologias (LIU et al., 2021).

Através da análise sérica dos níveis de citocinas, moléculas efetoras responsáveis pela comunicação entre as células imunológicas, é possível avaliar a resposta celular de um organismo (LIU et al., 2021). O monitoramento da transcrição do RNA mensageiro (RNAm) das citocinas pode ser feito através da técnica de RT-qPCR, porém há limitações, já que o proteoma não é completamente representado nesse tipo de análise, devido a modificações pós-transcricionais, instabilidade das moléculas de mRNA e outros mecanismos de controle da expressão gênica (WAHL-JENSEN et al., 2012).

Uma alternativa para avaliação da resposta celular em hamster seria a utilização de insumos já existentes para outras espécies de roedores, como hipotetizado por Zivcec et al. (2011), onde os autores se basearam na alta conservação de genes envolvidos na regulação de respostas imunológicas dentre as espécies de roedores, para supor que anticorpos contra essas moléculas poderiam, através de testes como ELISA, apresentar reatividade cruzada com proteínas de hamsters. Entretanto, o estudo revelou a ineficiência deste tipo de aplicação, ressaltando novamente a necessidade de insumos para análise da imunidade celular em hamsters (ZIVCEC, et al., 2011).

Neste contexto, torna-se necessária a obtenção de insumos que possibilitem o desenvolvimento de testes imunológicos para avaliar a imunidade celular em

hamster sírio dourado. Desta forma, o objetivo principal deste estudo foi realizar a clonagem, expressão e purificação das citocinas Interleucina 6 (IL-6) e Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) do hamster sírio dourado de forma recombinante, empregando a bactéria *Escherichia coli* como sistema de expressão heterólogo.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção das sequências codificadoras das citocinas IL-6 e TNF- α

Para obtenção do transcrito da citocina IL-6, foi extraído o RNA total de fígado de hamster infectado por *Leptospira interrogans* (CEUA 004590/2022-11). Em seguida esse RNA foi sintetizado em cDNA, o qual foi empregado para realização da técnica de PCR usando primers específicos, desenhados com auxílio do software Vector NTI11, nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial à 95 °C, seguido de 40 ciclos de desnaturação (95 °C), um gradiente de anelamento (48 °C, 52 °C, 55 °C e 58 °C) e extensão (72 °C). A sequência do transcrito da citocina TNF- α foi obtida através de síntese química pela empresa GenOne Technologies, e entregue clonada no vetor de expressão em *E. coli* pET28a.

2.2 Clonagem de *il-6* no vetor pAE e seleção dos clones recombinantes

Tanto o vetor de expressão pAE quanto o produto de PCR (IL-6) foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*l, por 2 h 30 min à 37 °C e, posteriormente, submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. O produto da digestão do vetor pAE foi submetido à reação com fosfatase alcalina (CIP, New England BioLabs), à 37 °C por 30 min. Em seguida, o vetor pAE e o inserto foram purificados com o kit GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). A ligação do inserto ao vetor pAE foi realizada com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), à 4 °C, *overnight*. O produto desta ligação, pAE/*il-6*, foi utilizado para transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10 por eletroporação. Foram selecionadas colônias bacterianas que cresceram em LB ágar suplementado com ampicilina (100 μ g.mL⁻¹), as quais foram posteriormente submetidas a triagem através de extração de DNA total com fenol-clorofórmio, seguido de eletroforese em gel de agarose 1%. Em seguida, os possíveis clones recombinantes foram cultivados em meio LB suplementado com 100 μ g.mL⁻¹ de ampicilina e submetidos à extração de DNA plasmidial com o kit comercial GFX Micro Plasmid Prep (GE Healthcare). Os plasmídeos extraídos foram submetidos à digestão e posteriormente à técnica de PCR, utilizando os parâmetros já descritos acima, para a confirmação da presença do inserto.

2.3 Produção e caracterização das citocinas rIL-6 e rTNF- α

Os vetores recombinantes pAE/*il-6* e pET28a/*tnf- α* foram utilizados para transformar as cepas bacterianas *E. coli* BL21 Star (DE3) e *E. coli* C41 (DE3), respectivamente, por choque térmico. Os cultivos foram mantidos à 37 °C sob agitação até atingir a fase logarítmica, quando se faz a adição de isopropil β -D-1-tiogalatopiranosídeo (IPTG) para a indução da expressão de tais proteínas. Foram coletadas alíquotas do cultivo antes e depois da indução para avaliação da expressão das proteínas. As células então foram centrifugadas, lisadas por sonicação e solubilizadas em tampão contendo 8 M de ureia. As proteínas foram

purificadas através de cromatografia de afinidade utilizando colunas de sefarose carregadas com níquel em sistema ÄKTA start (GE Healthcare). As alíquotas purificadas foram separadas através de eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) 15% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. A técnica de *Western blot* foi realizada para caracterizar as proteínas utilizando anticorpo monoclonal (mAb) anti-6xHis conjugado com a enzima peroxidase (Sigma-Aldrich). As reações foram reveladas usando 3,3- diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As frações mais puras foram dialisadas contra tampão fosfato-salino (PBS) contendo concentrações decrescentes de ureia e posteriormente aliqotadas e armazenadas a -20 °C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sequência codificadora da citocina IL-6 foi amplificada exitosamente através da técnica de PCR convencional. O produto de PCR foi amplificado no tamanho esperado de 585 pb quando a temperatura de anelamento de 52 °C foi utilizada, conforme podemos observar na figura 1A. Nenhuma amplificação foi observada no controle negativo. Dois possíveis clones recombinantes pAE/*il-6* foram selecionados. A presença do inserto foi confirmada após digestão do DNA plasmidial com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*l, o qual resultou na liberação do inserto no tamanho esperado (Fig.2B).

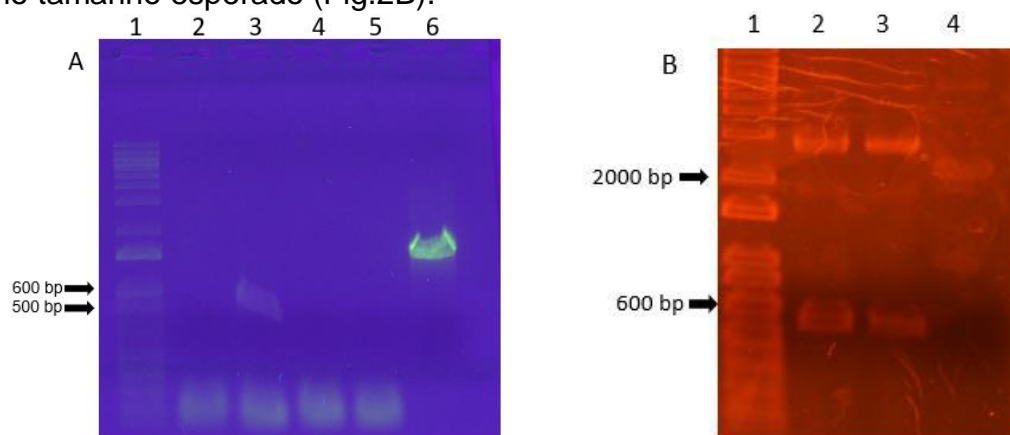


Figura 1. Clonagem da sequência codificadora de *il-6* no vetor pAE. A: Amplificação de *il-6* por PCR. (1) Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); (2) amplificação com temperatura de anelamento a 48 °C; (3) amplificação com temperatura de anelamento a 52 °C; (4) amplificação com temperatura de anelamento a 55° C; (5) amplificação com temperatura de anelamento a 58° C; (6) controle positivo da PCR. B: digestão enzimática com *Bam*HI e *Kpn*l das colônias 1 e 2. (1) Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); (2) DNA plasmidial da colônia 1 digerido com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*l; (3) DNA plasmidial da colônia 2 digerido com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*l; (4) vetor pAE não digerido usado como controle negativo.

As proteínas recombinantes rIL-6 e rTNF- α foram expressas e, após isso, caracterizadas através de *Western Blot* com (Mab) anti-6xHis. O reconhecimento pelo anticorpo anti-histidina confirmou a identidade de ambas as proteínas, rIL-6 e rTNF- α , tendo sido obtidas nos tamanhos esperados de aproximadamente 22,9 kDa (Fig.2A) e 22,3 kDa (Fig.2B), respectivamente. A proteína LigBrep utilizada em ambas as análises como controle positivo foi reconhecida de acordo com o previsto,

enquanto o extrato de *E. coli* BL21 Star (DE3) utilizado como controle negativo, não reagiu, conforme o esperado.

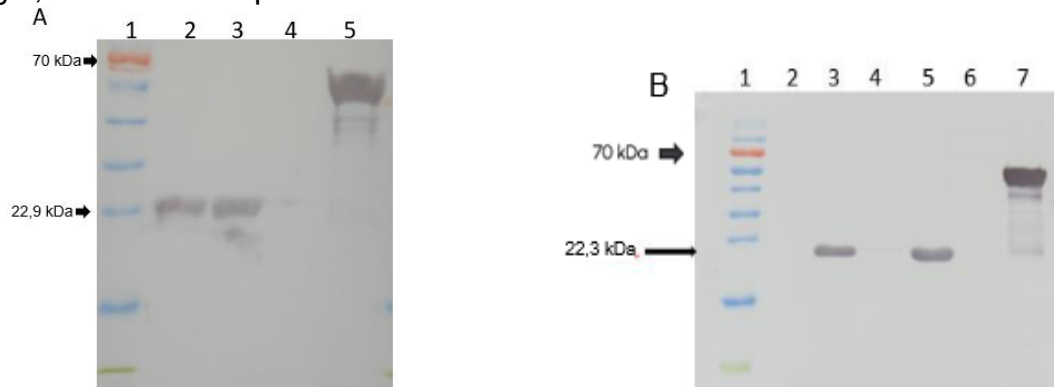


Figura 2. Caracterização por *Western blot* das proteínas rIL-6 e rTNF- α . A: *Western blot* da proteína rIL-6. (1) Marcador de peso molecular; (2) *E. coli* BL21 Star (DE3) transformada com pAE/*il-6* não induzida; (3) *E. coli* BL21 Star (DE3) transformada com pAE/*il-6* induzida; (4) *E. coli* BL21 Star (DE3) não transformada utilizada como controle negativo; (5) LigBrep usada como controle positivo. B: *Western blot* da proteína rTNF- α . (1) Marcador de peso molecular; (2) *E. coli* transformada com o vetor pET28a/*tnf- α* não induzida; (3) *E. coli* transformada com o vetor pET28a/*tnf- α* induzida; (4) fração solúvel do lisado celular; (5) fração insolúvel do lisado celular após solubilização; (6) *E. coli* BL21 Star (DE3) usada como controle negativo; (7) LigBrep empregado como controle positivo.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, as citocinas IL-6 e TNF- α de hamster sírio foram produzidas na forma recombinante, baseando-se em sistema de expressão heterólogo de *E. coli*. A produção destas proteínas recombinantes nos permitirá a obtenção de anticorpos específicos contra estas citocinas, vislumbrando sua utilização futura no desenvolvimento de ensaios para avaliação de resposta celular nesse modelo animal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- JOZEFCZUK, J.; ADJAYE, J. Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. **Methods Enzymol**, v. 500, p. 99-109, 2011.
- MIAO, J. et al. Syrian Hamster as an Animal Model for the Study on Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. October, p. 1–12, 2019.
- LIU, C. et al. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. **Adv Sci (Weinh)**, v. 8, n. 15, p. e2004433, 2021.
- WAHL-JENSEN, V. et al. Use of the syrian hamster as a new model of ebola virus disease and other viral hemorrhagic fevers. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3754–3784, 2012.
- ZIVCEC, M. et al. Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **J Immunol Methods**, v. 368, n. 1-2, p. 24-35, 2011.