

Expresión y purificación de Interleucina 18 humana recombinante y su potencial aplicación en la terapia contra el cáncer

Jorge Solís Estrada¹, Eder Arredondo Espinoza¹, Xristo Zárate², Isaías Balderas¹.

¹Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

²Laboratorio de Biotecnología 2, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Introducción

La Interleucina 18 (IL-18) es una citocina pro-inflamatoria que juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune innata y adquirida, exhibe una significativa actividad anti-tumoral aumentando la citotoxicidad de las células NK, incrementa la proliferación de células T así como promueve la secreción de IFN- γ por células presentadoras de antígenos. También conocida como factor inductor de Interferón gamma (IFN- γ) es una citocina producida principalmente por macrófagos con un peso de 22kDa. Se ha demostrado que IL-18 tiene efectos anti-tumorales en múltiples modelos de tumores murinos y en líneas celulares tumorales humanas *in vitro*. Por estas razones, resulta atractivo producir IL-18 como proteína recombinante para su posible aplicación como bio-fármaco. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue clonar, expresar y purificar una IL-18 humana optimizada, para consecuentemente, en un futuro evaluar su actividad inmunomoduladora en monocitos de sangre periférica.

Material y Métodos

El gen IL-18 humano fue optimizado para un sistema de expresión procariótico y digerido con las enzimas de restricción KpnI y Sall. Posteriormente se digirió también el plásmido pThioHisB con las mismas enzimas y con ambos fragmentos se realizó la construcción del vector recombinante. La reacción de ligación se mantuvo a una relación molar 3:1 y estuvo catalizada por la T4 DNA Ligasa. Se utilizó la cepa BL21 de *Escherichia coli* como sistema de expresión por lo que se utilizaron 3 ng del plásmido recombinante para transformar mediante competencia celular un cultivo de dicha cepa. Después de confirmar la transgenicidad, se realizaron estudios pilotos para obtener las mejores condiciones de expresión de la proteína realizando variaciones de la temperatura y tiempo del cultivo, concentración del inductor IPTG y magnitud de la agitación.

Resultados y Discusión

El gen amplificado por PCR mostró un tamaño de 582 pares de bases al observarse mediante

electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una vez hecha y confirmada la construcción genética se transformaron las bacterias a una eficiencia de transformación de: 6×10^3 cfu/ μ gDNA. La cepa de *E.coli* BL21 transformada mostró una expresión de la proteína IL-18 en un gel de poliacrilamida al 12%, al verse una banda sobre expresada al nivel de los 30 kDa, que es el peso molecular de la proteína unida a la proteína de fusión Tiorredoxina, tal como se muestra en la figura 1. Las condiciones en las que se obtuvieron los mejores resultados de expresión fueron las siguientes: Una concentración de 2mM del inductor IPTG, 30°C de incubación y 210 rpm de agitación. Posteriormente se llevaron a cabo estudios de purificación por IMAC (cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados). Se obtuvieron fracciones de 0.5 mL con un 60% de pureza. Esto sugiere que el diseño y sistema de expresión de la proteína IL-18 es apto para el desarrollo de biomoléculas con fines terapéuticos.

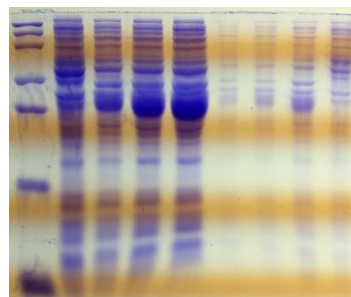


Figura 1: Gel de poliacrilamida al 12%, Expresión de IL-18

Conclusiones

Se logró clonar, expresar y purificar una IL-18 humana recombinante, optimizada para su expresión en bacterias y bajo condiciones de 2 mM de IPTG, 6 horas de cultivo a 30°C y 210 rpm de agitación.

Referencias:

1. Francesca Bellora, Roberta Castriconi, *European Journal of Immunology* 2012, 42: 1618-1626
2. Chien-Chiao Huang, PLOS ONE 2015, 10: 1-13.
3. Jin Yang, Linlin Chen, *International Journal of medical Sciences* 2014, 11(2):172-179.
4. Y. Yan, Q. Wan. *Genetics and Molecular Research* 2014. 13 (4): 9687-9700.