

Clonagem molecular de MKK2 no processo de estrobilização do parasito cestódeo *Mesocostoides corti* (Cyclophyllidea, Mesocestoididae)

Cibele Edom Bandeira¹, Tatiana Basika Cabrera², Henrique Bunselmeyer Ferreira³ (Orient.)

¹ Ciências Biológicas, UFRGS (cibeledba@yahoo.com.br)
^{2,3} Centro de Biotecnologia, UFRGS

Introdução

Mesocostoides corti, um parasito cestódeo, é modelo experimental para o estudo da biologia de espécies da classe Cestoda, em particular do processo de diferenciação de larvas em vermes segmentados (**estrobilização**). A necessidade de investigação científica sobre a biologia do desenvolvimento destes parasitos e sobre aspectos moleculares das interações parasito-hospedeiro caracterizam o presente estudo.

Visando à caracterização de genes e proteínas envolvidos na estrobilização de cestódeos, foi selecionado para estudo o gene codificador da **proteína-quinase-quinase ativada por mitógenos 2 (MKK2)**, previamente identificada como expresso predominantemente em vermes segmentados (Bizarro *et al.*, 2005). As enzimas MKK2 são componentes de rotas de sinalização associadas a processos de proliferação e diferenciação celular, mediando respostas a uma variedade de estímulos extracelulares e atuando em mecanismo de desenvolvimento.

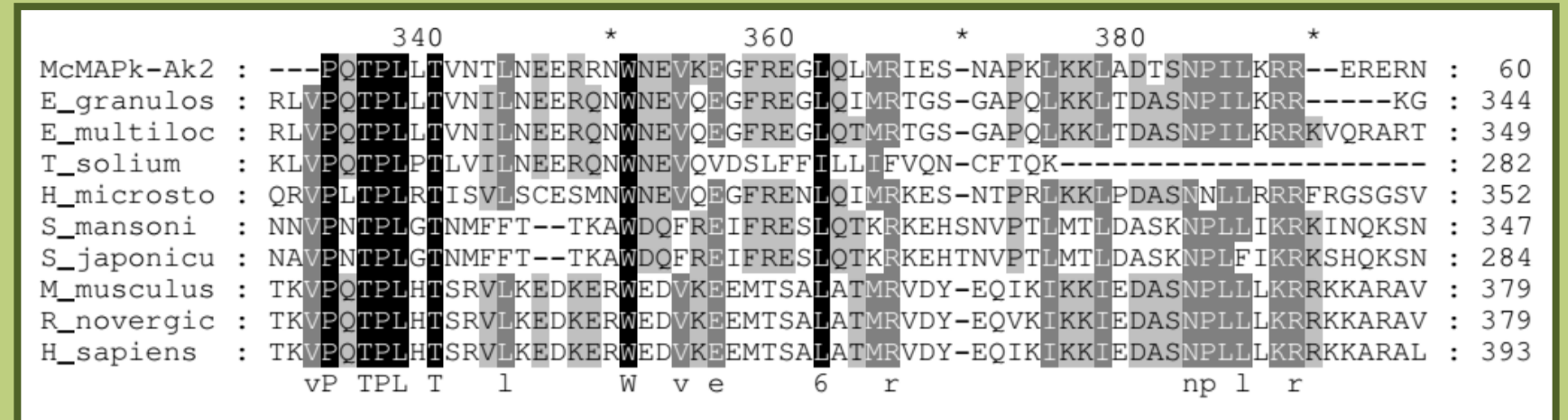


Figura 3. Alinhamento da McMKK2 com MKK2 de outros organismos - Se realizou um tBlastx para a busca de sequências homólogas. Em preto e cinza se mostram os resíduos conservados.

Resultados e discussão

A clonagem da sequência codificadora de parte da McMKK2 foi realizada utilizando os produtos da PCR gerados com iniciadores secundários. As colônias recombinantes foram identificadas através da análise dos produtos de amplificação da PCR de colônia utilizando iniciadores específicos do vetor pGEX-TEV. Foram obtidos 4 clones recombinantes do total de 14 colônias transformantes analisadas.

A otimização da expressão das proteínas recombinantes foi realizada em células de *E. coli* BL21 Codon Plus RP, as quais foram capazes de expressar a proteína em estudo em maior quantidade. A melhor condição de expressão foi a indução com 0,1 mM de IPTG por 16 h a 21°C, onde a proteína recombinante foi observada na fração solúvel (Figura 4).

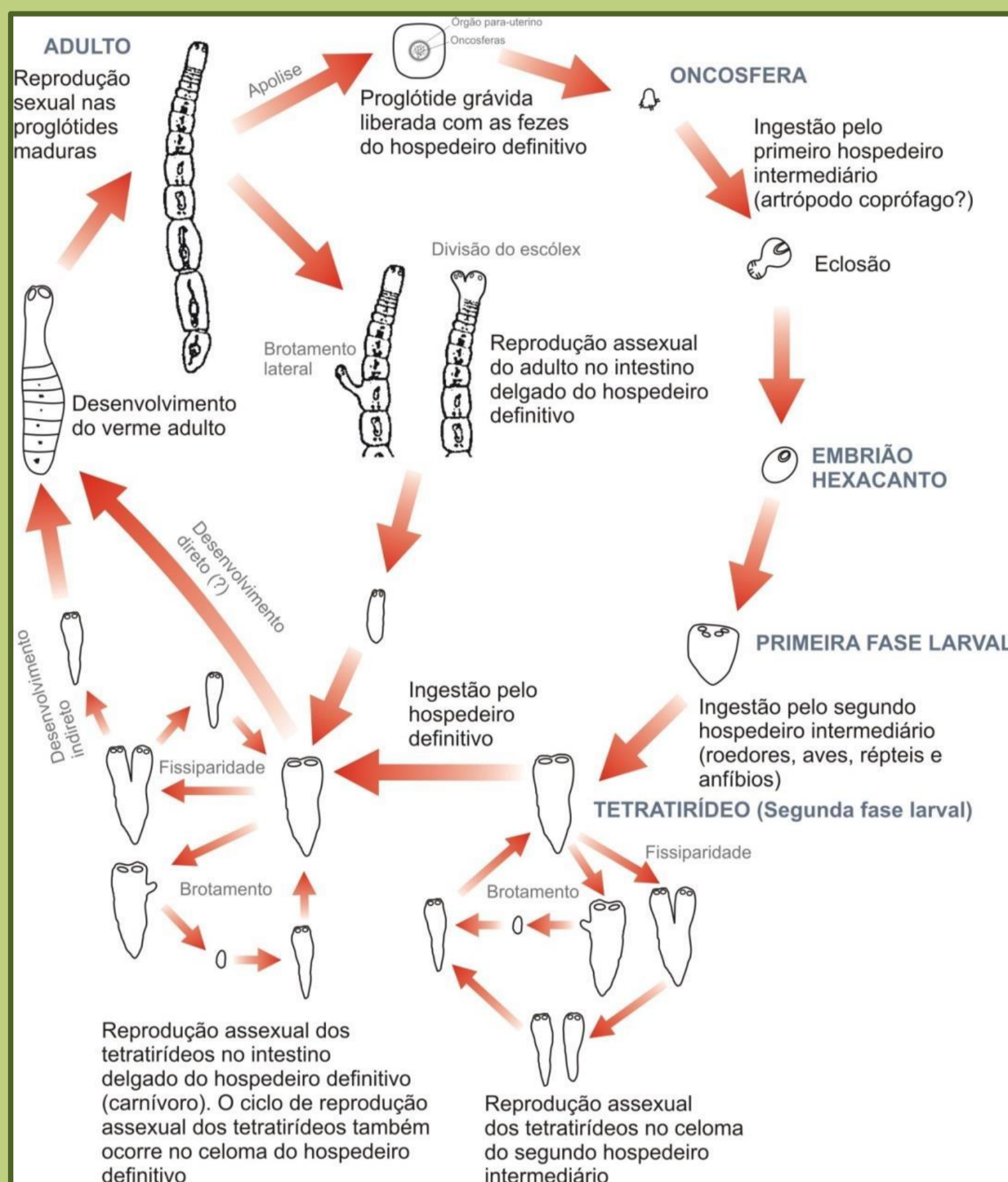


Figura 1. Representação do ciclo vital provável de *M. corti*.
Figura cedida por Henrique B. Ferreira.

Objetivos

São objetivos desse estudo a caracterização funcional da proteína MKK2 de *M. corti* (McMKK2) e a elucidação de seu papel no desenvolvimento estrobilar.

Material e métodos

Foi isolado RNA de vermes segmentados, e, após a síntese de cDNA, foi amplificada a sequência codificadora **parcial** da McMKK2 (**McMKK2₂₈₈₋₃₆₉**) com iniciadores específicos. A sequência parcial clonada contém 81 aminoácidos (do aminoácido número 288 ao 369), enquanto a proteína McMKK2 completa é composta por 377 aminoácidos.

A sequência foi clonada no vetor pGEX-TEV e expressa em *Escherichia coli*. A expressão da proteína recombinante foi otimizada e obteve-se a proteína parcial purificada.



Figura 2. *M. corti* 2 dias após a indução da estrobilização (à esquerda) e 6 dias após indução (à direita), com proglótides (seta) bem delimitadas. Visualização em microscópio invertido, com aumento de 40X.

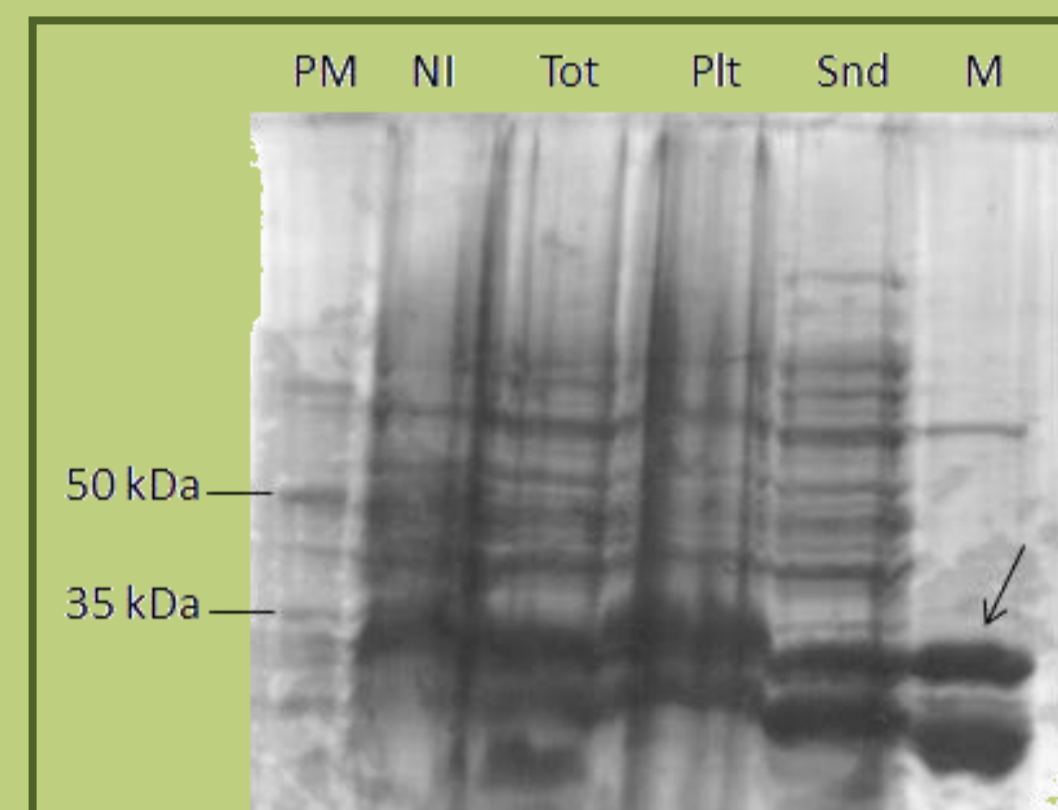
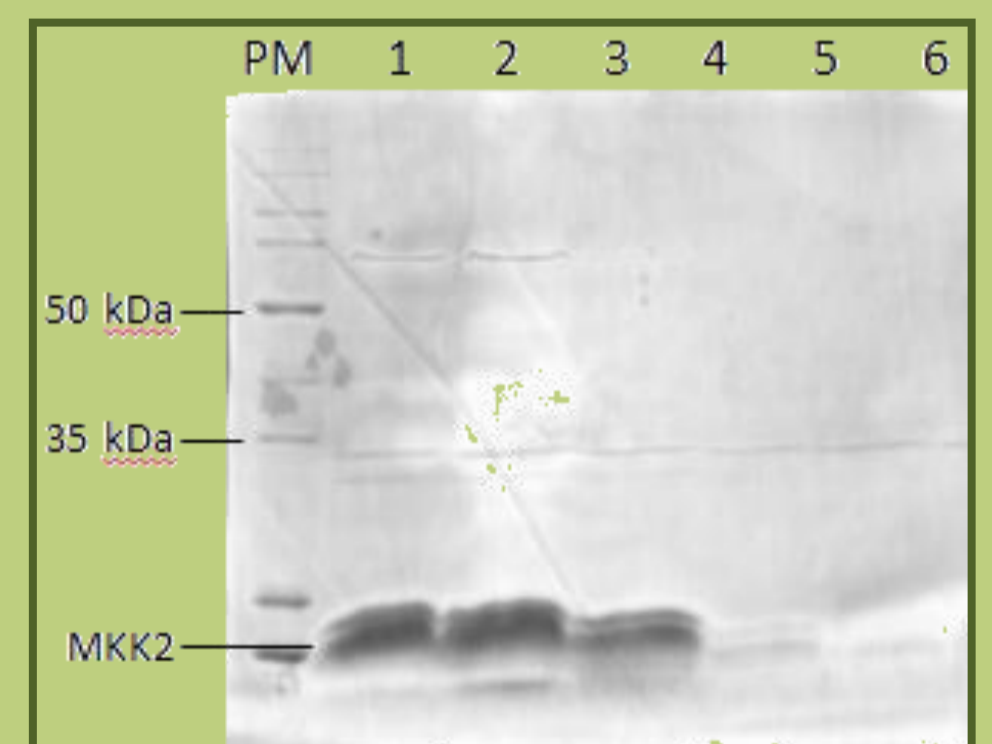


Figura 4. Extratos proteicos de células de *E. coli* BL21 Codon Plus RP expressando a proteína McMKK2₂₈₈₋₃₆₉ após purificação por cromatografia de afinidade. PM: marcador de peso molecular; NI: células de *E. coli* sem indução com IPTG; Tot: células após a indução da expressão; Plt: fração insolúvel; Snd: fração solúvel; M: matriz (resina Glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare) após passagem do extrato solúvel, sendo visível a McMKK2₂₈₈₋₃₆₉ (seta).

Figura 5. Análise eletroforética de extratos proteicos após purificação por cromatografia de afinidade com Glutathione Sepharose 4B, clivagem com protease TEV e tratamento com ATP. Nas extratos após eluição (1 a 6) é possível visualizar banda da McMKK2₂₈₈₋₃₆₉ purificada (nos extratos 1, 2 e 3). PM: marcador molecular. Os extratos proteicos foram submetidos à SDS-Page 15% e visualizados por coloração com *comassie blue*.



Perspectivas

O estudo tem como perspectivas utilizar a McMKK2 parcial na imunização de camundongos para produção de anticorpo policlonal específico. Uma estratégia de RNA de interferência (RNAi) será utilizada para avaliação de fenótipos de perda-de-função da McMKK2. O efeito do RNAi na expressão da McMKK2 será avaliado por qPCR e por imunoblot. Também será realizado a clonagem e a expressão da **McMKK2 completa** para a caracterização funcional da enzima.

Referências

Bizarro, C., Bengtson, M., Ricachenevsky, F., Zaha, A., Sogayar, M., Ferreira, H.B. (2005). Differentially expressed sequences from a cestode parasite reveals conserved developmental genes in platyhelminthes. *Mol Biochem Parasitol* 144, 114-118.