

Caracterização de possíveis funções *moonlighting* da GAPDH de *Echinococcus granulosus* na interação com o hospedeiro intermediário



Helier Balbinotti^{1*}, Karina R. Lorenzatto^{1,2}, Karina M. Monteiro^{1,2}, Arnaldo Zaha¹
¹Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre - Brasil
²Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS
 *e-mail:helierbalbinotti@gmail.com



Apoio financeiro:

Introdução

Echinococcus granulosus é um helminto parasita de ungulados domésticos e humanos, causador da hidatidose cística. Como outros helmintos, *E. granulosus* é capaz de sobreviver por longos períodos dentro do corpo do hospedeiro, expressando e secretando proteínas envolvidas em mecanismos de interação com o hospedeiro capazes de evadir a resposta imune do hospedeiro e promover a nutrição, metabolismo e desenvolvimento do parasito. Estudos têm demonstrado que algumas proteínas parasitárias envolvidas em mecanismos de interação com o hospedeiro são conservadas entre diferentes espécies de helmintos, destacando-se, entre elas, proteínas *moonlighting* como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Liu *et al.*, 2009). Proteínas *moonlighting* são aquelas capazes de desempenhar funções adicionais não relacionadas à sua via catalítica clássica. A GAPDH foi detectada na superfície do tegumento e nos produtos de secreção-excreção de diferentes helmintos, podendo desempenhar funções *moonlighting* na interação parasito-hospedeiro (Braschi *et al.*, 2006; Pérez-Sánchez *et al.*, 2008).

Objetivo

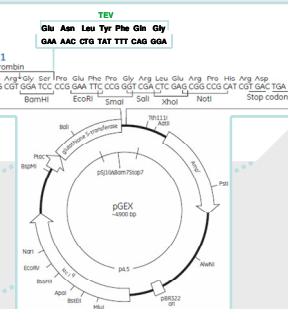
Caracterizar possíveis funções *moonlighting* desempenhadas pela GAPDH de *Echinococcus granulosus*, helminto causador da hidatidose cística, na interação com o hospedeiro intermediário bovino.

Metodologia

- Coleta do material biológico
- Extração de RNA de protoescolices de cisto bovino
- Desenho dos primers específicos para a sequência-alvo (cada primer contém nas extremidades 25 nucleotídeos de homologia com o vetor de clonagem)
- Amplificação da sequência codificadora da GAPDH por RT-PCR

- Imunização de coelho para produção de antisoro
- Clivagem com a protease TEV para liberação da proteína recombinante livre da GST
- Purificação por cromatografia de afinidade em coluna Glutaciona-Sepharose 4B (GE)
- Expressão da proteína recombinante em fusão com a glutaciona-S-transferase (GST)
- Clonagem por recombinação homóloga *in vivo* (Parrish *et al.*, 2004).

Na clonagem foi utilizado o vetor pGEX-TEV, previamente construído em nosso laboratório a partir do vetor pGEX-4T-1 (GE, Healthcare), ao qual foi adicionado um sítio de clivagem para a protease TEV.



Resultados

RT-PCR

O produto de amplificação apresentou tamanho esperado de 1011 pb na 1ª reação e 1061 pb na 2ª PCR:

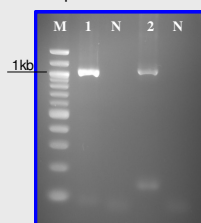


Figura 1: Gel de agarose dos amplicons obtidos na PCR primária e secundária. (M) Marcador de tamanho molecular 100 pb Ladder; (1) 1ª PCR; (2) 2ª PCR; (N) Controles negativos.

Clonagem por recombinação homóloga *in vivo*

A clonagem no vetor pGEX-TEV foi avaliada por PCR de colônia, utilizando-se primers específicos do vetor. A partir da análise de 14 colônias de células transformadas foi identificada uma colônia portadora do plasmídeo recombinante (Fig. 2):

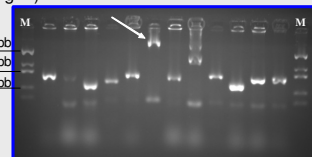


Figura 2: Gel de agarose 1% do PCR de colônia para avaliar a clonagem. O plasmídeo recombinante está assinalado na figura. As demais amostras representam plasmídeos não-recombinantes. (M) Marcador de massa molecular pUC18 clivado com Dde I.

A sequência inserida no vetor de clonagem foi confirmada por sequenciamento.

Expressão da proteína GAPDH recombinante em fusão com a glutaciona-S-transferase (GST)

A expressão da GAPDH recombinante foi avaliada em diferentes cepas de *Escherichia coli*, utilizando-se diferentes condições de indução (concentração de IPTG, temperatura e tempo de indução). As células BL21 *Codon Plus* RP e da BL21 (DE3) *plysE* apresentaram maior expressão da proteína recombinante e as condições de expressão foram otimizadas para a concentração de 0,1 mM de IPTG por 5h a 20°C, como assinalado na figura 3:

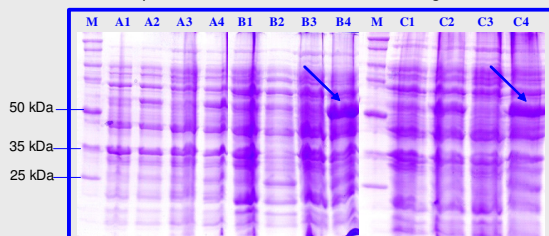


Figura 3: SDS-PAGE 12% corado com *coomassie blue* da padronização da expressão da GAPDH recombinante em diferentes linhagens de *E. coli*. (A) BL21 *Codon Plus* Rii; (B) BL21 *Codon Plus* RP; (C) BL21 (DE3) *plysE*; (1) Culturas não-induzidas, 3h a 37°C; (2) Indução a 0,1 mM IPTG, 3h a 37°C; (3) Culturas não-induzidas, 5h a 20°C; (4) Indução a 0,1 mM IPTG, 5h a 20°C; (M) Marcador de massa molecular.

A proteína de fusão se apresentou predominantemente na fração insolúvel (*pellet*) após a lise das células. Uma maior quantidade de proteína recombinante foi observada na fração solúvel quando a expressão foi realizada na cepa de *E. coli* *plysE*, com indução a 20°C por 5h (Fig. 4), sendo, portanto, essa condição escolhida para produção da proteína em larga escala.

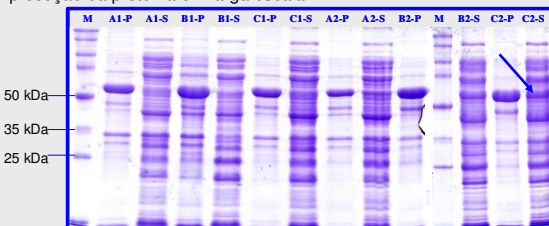


Figura 4: SDS-PAGE 12% corado com *coomassie blue* da avaliação da solubilidade proteica da GAPDH recombinante nas diferentes células de *E. coli* usadas para a expressão. (A) Rii; (B) RP; (C) *plysE*; (1) Indução a 0,1 mM IPTG, 3h a 37°C; (2) Indução a 0,1 mM IPTG, 5h a 20°C; (P) Fração insolúvel, *Pellet*; (S) Fração solúvel, sobrenadante; (M) Marcador de massa molecular.

Clivagem e proteína recombinante purificada

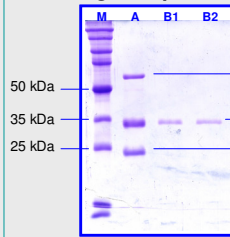


Figura 5: SDS-PAGE 12% corado com *coomassie blue* da etapa de clivagem (A) e da proteína recombinante purificada (B1-2). (M) Marcador de massa molecular.

Considerações sobre a sequência codificadora da GAPDH de *E. granulosus*:

- A ORF de 1008 pb codifica 336 aminoácidos;
- A análise comparativa da sequência do cDNA com a sequência genômica da GAPDH de *E. granulosus* revelou a presença de dois introns, um de 37 pb e outro de 75 pb (Fig. 6).

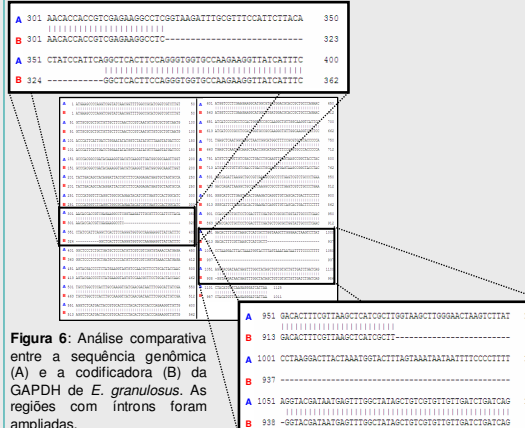


Figura 6: Análise comparativa entre a sequência genômica (A) e a codificadora (B) da GAPDH de *E. granulosus*. As regiões com introns foram ampliadas.

A composição de aminoácidos acima referida apresenta grande homologia (97,9%) com *Echinococcus multilocularis* (Fig.7), mostrando que a sequência da GAPDH é bem conservada entre as duas espécies:



Figura 7: Análise comparativa da composição de aminoácidos da proteína GAPDH entre duas espécies de *Echinococcus*. (Eg) *E. granulosus*; (Em) *E. multilocularis*.

Perspectivas

- A proteína GAPDH recombinante será utilizada em experimentos de *far western* para avaliação da ligação ao plasminogênio e diferentes proteínas da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina;
- O anti-soro obtido na imunização de coelho será utilizado na detecção da GAPDH em diferentes componentes do cisto hidático por imunoblot e imunolocalização.

Referências

Liu, F., Cui, S. J., Hu, W., Feng, Z., Wang, Z. Q., Han, Z. G. Excretory/Secretory Proteome of the Adult Developmental Stage of Human Blood Fluke, *Schistosoma japonicum*. Mol Cell Proteomics. 2009 Jun;8(6):1236-51. Epub 2009 Mar 18.

Parrish, J. R., Limjindaporn, T., Hines, J. A., Liu, J., Liu, G. & Finley, R. L. (2004) High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by *in vivo* recombination in *Escherichia coli*. J. Proteome Res. 3, 882-886.

Pérez-Sánchez, R., Valero, M. L., Ramajo-Herrández, A., Siles-Lucas, M., Ramajo-Martín, V., Oleaga, A. (2008). A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male and female *Schistosoma bovis* worms. Mol. Biochem. Parasitol. 161, 112-123.