

Introdução

O *Echinococcus granulosus* é um helminto parasita pertencente à Classe Cestoda. O desenvolvimento da fase larval (cisto hidático) de *E. granulosus* nas vísceras dos hospedeiros intermediários é responsável pela doença hidatidose cística (Fig. 1).

O cisto consiste em uma estrutura esférica unilocular preenchida por líquido hidático (Cameron & Webster, 1969) (Fig. 2). Dentre os componentes do líquido hidático estão diversas proteínas, muitas delas relacionadas com a interação parasito-hospedeiro.

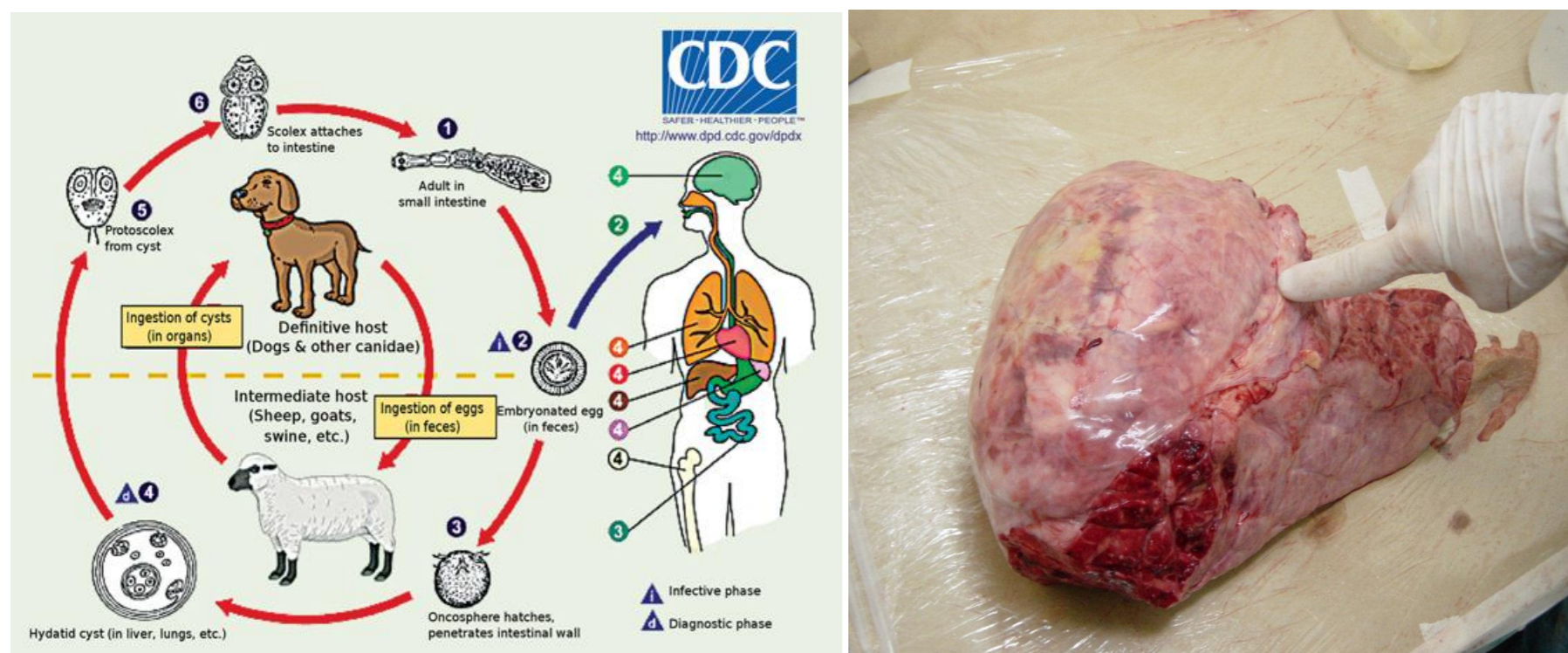


Fig.1: Ciclo de *Echinococcus granulosus* (Modif. de Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern).

Fig.2: Cisto hidático bovino (pulmão).

Proteínas *moonlighting* exibem atividades funcionais, dentro ou fora da célula, não relacionadas à sua função inicialmente descrita (Jeffery, 1999). Dentre as proteínas já descritas como tendo funções *moonlighting* em organismos parasitas, destacam-se enzimas da via glicolítica, como a enolase, a aldolase e a LDH (lactato desidrogenase). As enzimas da via glicolítica de *E. granulosus* foram identificadas em diferentes componentes do cisto hidático (Lorenzatto *et al* 2012). A presença de proteínas como essas, incluindo a lactato desidrogenase (EgLDH), na camada germinativa, principal interface, e no líquido hidático de *E. granulosus* (Monteiro *et al.* 2010) sugere a participação dessas enzimas em outros processos fisiológicos, dentre os quais aqueles de interação com o hospedeiro.

Objetivo

Padronização da expressão de lactato desidrogenase de *Echinococcus granulosus* (EgLDH) em *Escherichia coli*, para a utilização em posteriores estudos funcionais.

Material e métodos

A sequência codificadora clonada em pGEX-TEV já se encontrava disponível no laboratório. A expressão de LDH em fusão com a glutatona-S-transferase (GST – 26 kDa) foi feita em *Escherichia coli* BL21 codonplus RIL a 20°C, sendo CircleGrow o meio de cultura utilizado. A massa molecular estimada para a proteína de fusão GST-rEgLDH é de 62 kDa.

A indução da expressão foi feita com IPTG nas concentrações de 0,05 mM e 0,1 mM. Foram testados dois tempos de indução, por 3h e *overnight* (O/N) a 20°C. Após a indução, as células foram coletadas por centrifugação e então lisadas por ultra-sonicação para liberar o conteúdo proteico. As amostras foram novamente centrifugadas para separação das frações solúvel e insolúvel.

A uma parte das amostras, foi adicionado Triton X-100 1% para auxiliar na solubilização da proteína de fusão.

A expressão e a solubilidade da proteína recombinante foram avaliadas por SDS-PAGE 15%.

As amostras de fração solúvel analisadas foram resolvidas em SDS-PAGE 15% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham). Como anticorpo primário foi utilizado soro anti-GST (diluição 1:5000), e como anticorpo secundário foi utilizado soro anti-MouseIgG (diluição 1:5000) (Sigma). Os blots foram revelados com reagente de detecção DAB (tetracloridato de 3,3'-diaminobenzidina) (Sigma).

Resultados e discussão

Foi observado que na concentração de 0,1 mM se obteve maior quantidade de proteína expressa. Já em relação ao tempo, a indução O/N mostrou um rendimento maior em relação à 3h (Fig. 3).

A GST-rEgLDH foi avaliada quanto a sua solubilidade e, após a lise celular por sonicação, verificou-se a predominância da proteína nas frações insolúveis.

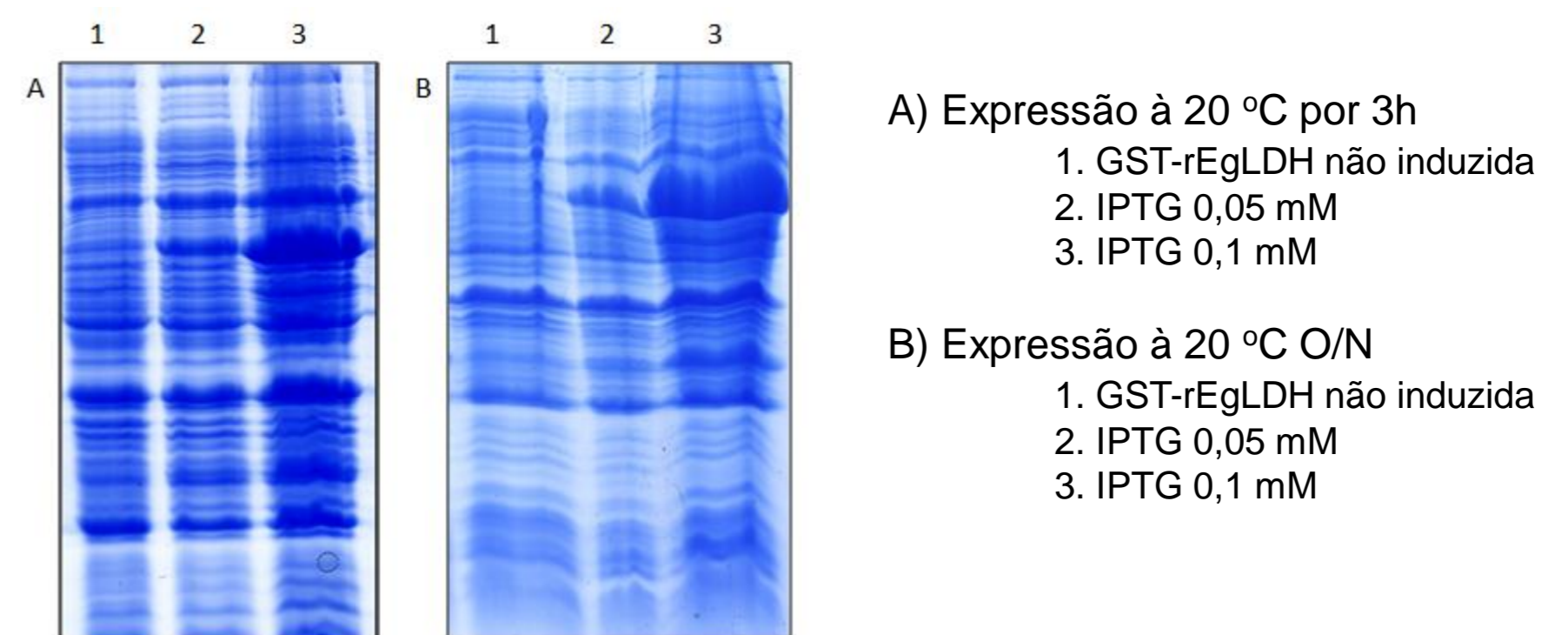


Fig.3: Teste de expressão da GST-rEgLDH (62 kDa).

A uma parte das amostras, foi adicionado Triton X-100 1% para auxiliar na solubilização da proteína de fusão. Ainda que a concentração de IPTG tenha influenciado na quantidade de proteína produzida, havendo maior rendimento nas induções com 0,1 mM, para ambos os tempos de indução, tal diferença de concentração não interferiu na solubilidade da proteína após o tratamento com Triton.

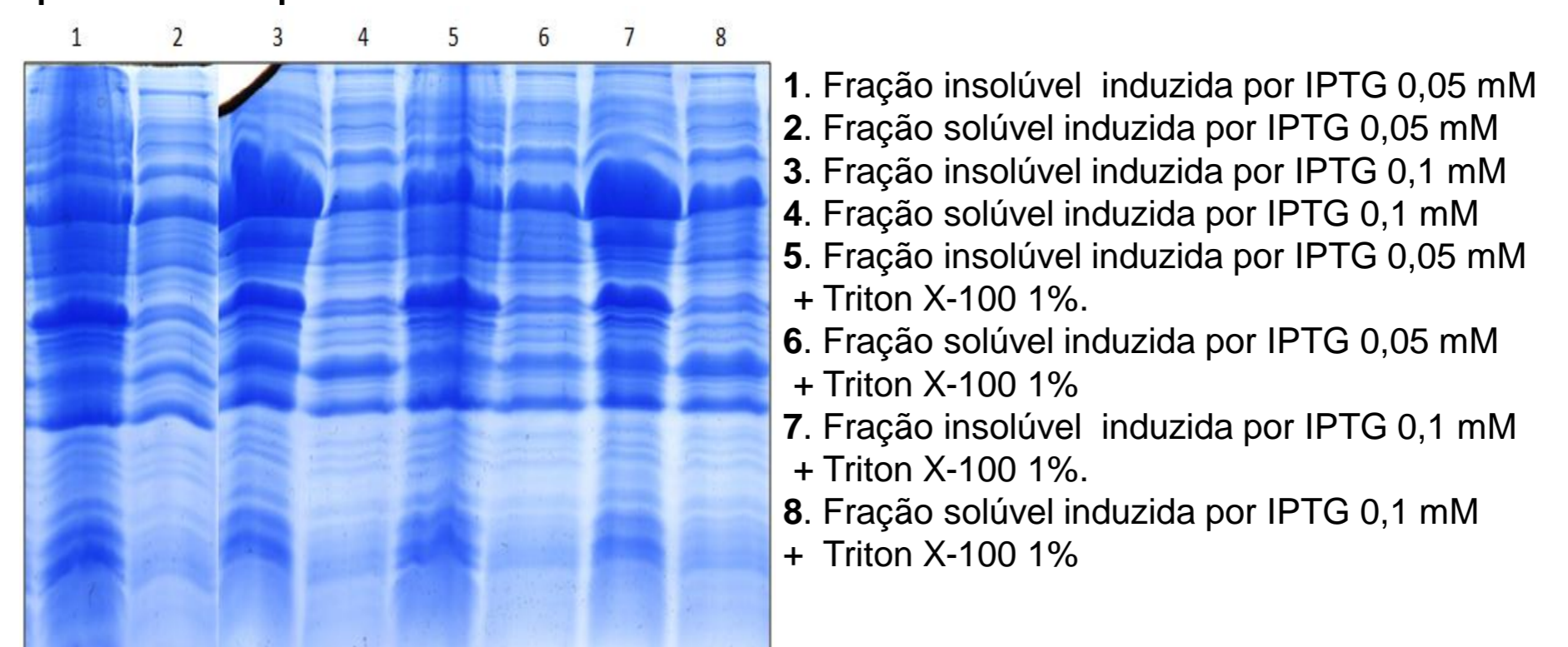


Fig.4: Teste de solubilidade da proteína GST-rEgLDH (SDS-PAGE 15%) expressa após indução O/N

Em relação ao tempo de indução, foi observada influência na solubilidade, sendo que nas induções O/N encontra-se maior quantidade de GST-rEgLDH na fração solúvel, em relação à indução por 3h. Após as análises, observou-se que a melhor condição para se obter maior rendimento de proteína solúvel é a indução O/N e tratamento com Triton X-100 1% (Fig. 4 e Fig. 5), independente da concentração de IPTG utilizada.

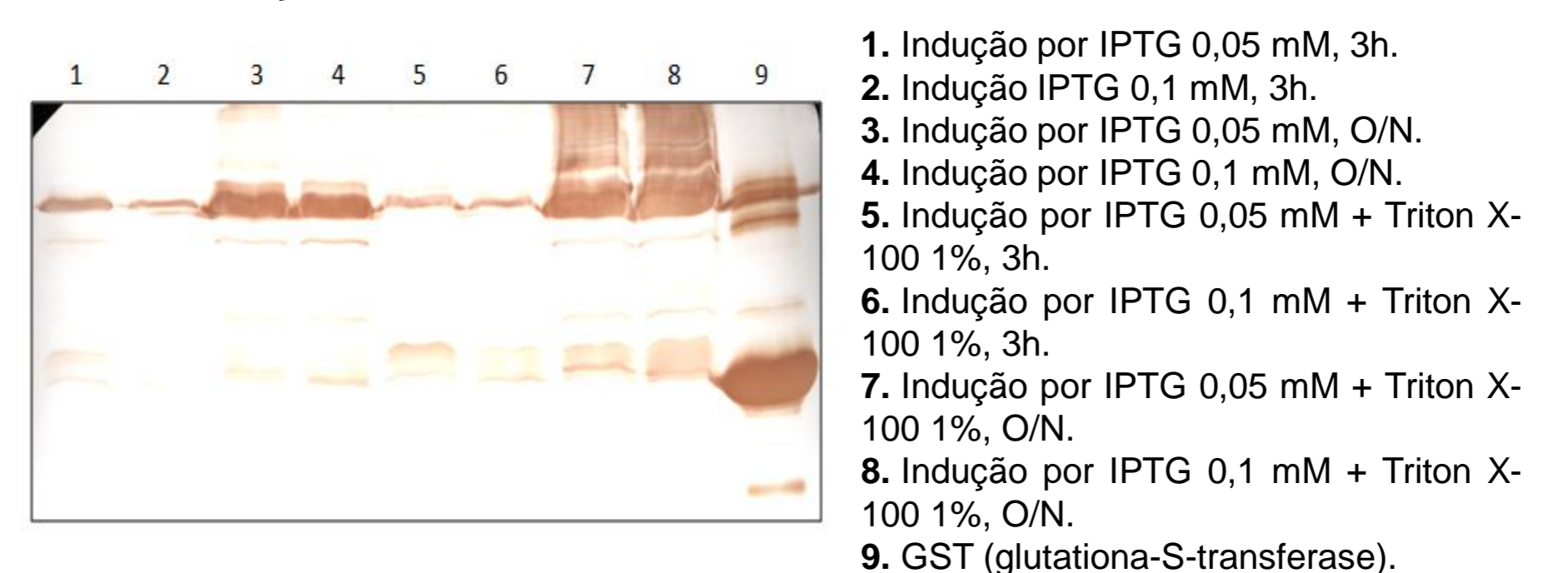


Fig.5: Western Blot para as frações solúveis das condições testadas.

Perspectivas

Este trabalho tem como perspectivas a purificação da proteína expressa em fusão com a GST (GST-rEgLDH) por cromatografia de afinidade em resina *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare) e recuperação da proteína recombinante livre de GST, possibilitando sua utilização em outros estudos.

Referências

- Cameron, T; Webster, G. The histogenesis of the hydatid cyst (*Echinococcus* spp.). I. Liver cysts in large mammals (1969). *Canadian Journal of Zoology*, v. 47, n. 6, p. 1405-1410.
- Jeffery, C. J. (1999). Moonlighting proteins. *TIBS* 24, 8-11.
- Lorenzatto KR, Monteiro KM, Paredes R, Paludo GP, da Fonsêca MM, Galanti N, Zaha A, Ferreira HB. Fructose-bisphosphate aldolase and enolase from *Echinococcus granulosus*: genes, expression patterns and protein interactions of two potential moonlighting proteins. *Gene (Amsterdam)*, v. 506, p. 76-84, 2012.
- Monteiro, K. M., Carvalho, M. O. de, Zaha, A. and Ferreira, H. B. (2010). Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus metacestode* during infection of this intermediate host. *Proteomics* 10, 1985-1999.