

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Biociências
Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

Bruna Valandro Meneghetti

Histonas H2A e enzima SET metiltransferase de *Echinococcus granulosus*: Clonagem e Expressão em *Escherichia coli*

PORTO ALEGRE

2014

Bruna Valandro Meneghetti

Histonas H2A e enzima SET metiltransferase de *Echinococcus granulosus*: Clonagem e Expressão em *Escherichia coli*

Trabalho de Conclusão de Curso da graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Zaha

PORTO ALEGRE

2014

Bruna Valandro Meneghetti

Histonas H2A e enzima SET metiltransferase de *Echinococcus granulosus*: Clonagem e Expressão em *Escherichia coli*

Trabalho de Conclusão de Curso da graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Zaha

Aprovada em: _____ de _____ de 2014.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Diego Bonatto (UFRGS)

Prof. Dra. Karina Mariante Monteiro (UFRGS)

Prof. Dra. Carla Ozório (UFRGS) – Coordenadora do Trabalho de Conclusão do Bacharelado em Ciências Biológicas

Dedico

Ao meu Deus,
À minha mãe Elice

Agradecimentos

A Deus por tudo de maravilhoso que tem feito na minha vida.

À minha querida mãe Elice pelo apoio e amizade, por sempre ter acreditado em mim e me encorajar a correr atrás dos meus sonhos.

Ao meu orientador Dr. Arnaldo Zaha pelo apoio, auxílio, orientação e oportunidade de começar a iniciação científica desde o meu primeiro semestre, por acreditar na minha ideia para o projeto (e claro, também pelas extrações de RNA!).

À Aline Teichmann (minha mãe científica!), por sua amizade, apoio, incentivo e orientação.

À Dra. Karina Monteiro, pelo apoio, auxílio e correções que vão contribuir muito para o progresso deste trabalho.

Ao Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pelo apoio, auxílio e correções (jamais me esquecerei dos grupos controle!).

A toda a minha família científica... os colegas dos laboratórios 204, 206 e 210, Gabi, Karina Lorenzatto, Edi, Tatiana, Veri, Jéssica, Martín, Guilherme Santos, Guilherme Barros, Cibele, João, Fernanda Fermino, Sérgio, Filipe, Jéferson, Nina, Helier, Fernanda Leal, William, Alemão e Maria Eduarda, pela amizade, apoio e sugestões.

A toda minha família, principalmente aos Meneghetti pelo apoio no cursinho e torcida para eu passar na UFRGS.

Resumo

A hidatidose cística é uma das 17 doenças tropicais negligenciadas, segundo a Organização Mundial da Saúde, e apresenta um caráter hiperendêmico em países da América do Sul. A zoonose é causada pelo cestódeo *Echinococcus granulosus*, que secreta e expõe muitas moléculas responsáveis pela modulação do sistema imunológico do hospedeiro e pelo estabelecimento/manutenção da infecção crônica. As histonas H2A de *E. granulosus* foram identificadas no líquido hidático e em produtos de secreção/excreção de protoescólices em cultura *in vitro* por análises proteômicas. Histonas ainda foram descritas em mitocôndrias e sendo capazes de fazer translocação direta através da membrana plasmática em células de mamíferos. Histonas já mostraram possuir ação antimicrobiana com envolvimento na resposta imune inata, e são potenciais candidatas para vacina em infecções por *Leishmania*. Proteínas secretadas tipicamente possuem uma extensão amino-terminal, denominada de peptídeo sinal, a qual é crucial para a eficiência no transporte da proteína através da membrana. Neste trabalho, primeiramente, foram realizadas buscas de sequências de peptídeo sinal e que indicassem a possível secreção de histonas e de proteínas relacionadas à modificação de histonas anotadas no genoma de *E. granulosus* (GeneDB, <http://www.genedb.org>). Foram analisadas as sequências de 71 proteínas utilizando 13 programas de predição, possibilitando a escolha de 3 proteínas-alvo para estudos experimentais: histona H2A His20607, histona H2A His9277 e SET metiltransferase. A clonagem das sequências codificadoras das proteínas His20607, His9277 e SET metiltransferase foi realizada no vetor plasmidial pGEX-TEV por recombinação homóloga *in vivo*, utilizando-se a cepa de *Escherichia coli* KC8. Foram testadas diferentes condições para a expressão das proteínas His20607, His9277 e SET metiltransferase em *E. coli*. A expressão das proteínas recombinantes em fusão com a proteína GST permitiu a sua purificação por cromatografia de afinidade com a resina de *Glutathione-Sepharose 4B*. As proteínas foram liberadas da fusão com a GST por clivagem com a protease TEV. As proteínas recombinantes serão utilizadas

na caracterização do padrão de localização dessas proteínas em componentes do cisto hidático e em organelas celulares, a fim de entender melhor os locais de atuação destas proteínas no parasito e nas suas células.

Palavras-chave: secreção, *Echinococcus*, hidatidose, histonas, metiltransferase, expressão, proteína recombinante

Abstract

Cystic hydatid disease is one of 17 neglected tropical diseases, according to the World Health Organization, and is a hyperendemic infection in countries of South America. It is a zoonosis caused by *Echinococcus granulosus*, a cestode which secretes and exposes numerous molecules responsible for the modulation of the host immune system and for the establishment/maintenance of chronic infection. The *E. granulosus* H2A histones were identified in proteomic analyses of hydatid fluid and excretory-secretory product obtained from protoscoleces (pre-adult) culture. Histones were also described in mitochondria and being able to translocate across the plasma membrane of mammalian cells. Histones have been shown that they present antimicrobial activity with involvement in the innate immune response and are potential candidates for vaccine in *Leishmania* infections. Typically, secreted proteins have an amino terminal extension called signal peptide, which is crucial for the efficient transport of the protein through the membrane. In this work, initially, searches were performed for signal peptide sequences and sequence that indicated the possible secretion of histones and related histones modifying proteins annotated in the genome of *E. granulosus* (GeneDB, <http://www.genedb.org>). The sequences of 71 proteins were analyzed using 13 prediction programs, allowing the selection of three for experimental studies: histone H2A His20607, histone H2A His9277 and SET methyltransferase. The cloning of the coding sequences of His9277, His20607 and SET methyltransferase proteins were performed on pGEX-TEV plasmid vector by *in vivo* homologous recombination, using *Escherichia coli* strain KC8. Different conditions of expression of His9277, His20607 and SET methyltransferase proteins were tested in *E. coli*. The expression of recombinant proteins in fusion with GST protein allowed their purification by affinity chromatography with Glutathione-Sepharose 4B resin. The proteins were released from the fusion with GST by cleavage with TEV protease. Recombinant proteins will be used to characterize the pattern of localization of these proteins in hydatid cyst

components and cell organelles to provide a better understanding about the sites of action of these proteins in the parasite and its cells.

Keywords: secretion, *Echinococcus*, hydatidosis, histone, methyltransferase, expression, recombinant protein

Lista de figuras

Figura 1: Mapa da distribuição global de <i>Echinococcus granulosus</i>	16
Figura 2: Ciclo de vida do parasito <i>Echinococcus granulosus</i>	17
Figura 3: Diagrama esquemático do metacestódeo.....	18
Figura 4: Nucleossomo e modificações pós-traducionais encontradas em histonas.....	19
Figura 5: Produtos de amplificação e confirmação clonagem da sequência codificadora da proteína His20607.....	30
Figura 6: Produtos de amplificação e confirmação da clonagem da sequência codificadora da proteína His9277.....	31
Figura 7: Produtos de amplificação e confirmação da clonagem da sequência codificadora da proteína SET metiltransferase.....	32
Figura 8: Expressão da proteína recombinante His20607 a 20°C.....	33
Figura 9: Expressão da proteína recombinante His20607 em <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3) sob duas condições de indução a 20°C por 16 horas.....	34
Figura 10: Expressão da proteína recombinante His9277 a 37°C.....	35
Figura 11: Expressão da proteína recombinante His9277 a 20°C.....	35
Figura 12: Expressão da proteína recombinante His9277 sob diferentes temperaturas de indução.....	36

Figura 13: Expressão da proteína recombinante SET metiltransferase a 37°C.....	37
Figura 14: Expressão da proteína recombinante SET metiltransferase a 20°C.....	38
Figura 15: Purificação da proteína recombinante His20607.....	39
Figura 16: Purificação da proteína recombinante His9277.....	40
Figura 17: Purificação da proteína recombinante SET metiltransferase.....	41

Lista de abreviaturas e unidades

ATP: adenosina trifosfato

cDNA: DNA complementar

DNA: ácido desoxirribonucleico

GST: glutationa-S-transferase

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa: quilodalton(s) (1000 daltons)

LPS: lipopolissacarídeos bacterianos

LTA: ácido lipoteico

LB: Luria Bertani

LC-ESI-Q-TOF MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem com analisador de tempo voo quadrupolo e ionização por *electrospray*

mRNA: RNA mensageiro

pb: par(es) de bases

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PCR: reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

RNA: ácido ribonucleico

RNAseq: sequenciamento de RNA

RT-PCR: transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase

SAP: fosfatase alcalina de camarão

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de SDS

TEV: do inglês, *tobacco etch virus*

UTR3': região transcrita não traduzida 3'

Sumário

1. Introdução	15
1.1. <i>Echinococcus granulosus</i> e hidatidose cística.....	15
1.2. Histonas.....	18
1.3. Enzima SET metiltransferase.....	20
2. Justificativa	21
3. Objetivos	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. Materiais e métodos	21
4.1. Análise do Potencial para a Secreção.....	22
4.2. Extração de RNA de protoescolices de <i>E. granulosus</i> e síntese de cDNA.....	22
4.3. Amplificação e clonagem das sequências codificadoras das proteínas His20607, His9277 e SET metiltransferase.....	23
4.4. Padronização das condições de expressão das proteínas recombinantes His20607, His9277 e SET metiltransferase em <i>E. coli</i>	25
4.5. Padronização da purificação das proteínas recombinantes His20607, His9277 e SET metiltransferase fusionadas a GST.....	26
4.6. Espectrometria de massas.....	27
5. Resultados	26
5.1. Análise do Potencial para a Secreção.....	27
5.2. Amplificação e clonagem das sequências codificadoras das proteínas His20607, His9277 e SET metiltransferase.....	29
5.3. Padronização das condições de expressão das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	32
5.3.1. Expressão da proteína recombinante His20607 em <i>E. coli</i>	32
5.3.2. Expressão da proteína recombinante His9277 em <i>E. coli</i>	34
5.3.3. Expressão da proteína recombinante SET metiltransferase em <i>E. coli</i>	37
5.4. Purificação das proteínas recombinantes fusionadas a GST.....	39
5.4.1. Purificação da proteína recombinante His20607.....	39

5.4.2. Purificação da proteína recombinante His9277.....	40
5.4.3. Purificação da proteína recombinante SET metiltransferase.....	40
6. Discussão.....	42
7. Perspectivas.....	45
8. Referências bibliográficas.....	46
9. Apêndice.....	51

1. Introdução

1.1. *Echinococcus granulosus* e hidatidose cística

A hidatidose cística é uma doença infecciosa causada pelo estágio larval do parasito *Echinococcus granulosus*. É considerada uma zoonose negligenciada por ser um problema de saúde pública em países em desenvolvimento (SIRACUSANO *et al.*, 2012), e gerando grande impacto econômico e médico, com uma distribuição estimada em 4 milhões de casos de pessoas infectadas e outras 40 milhões que correm risco de infecção pelo mundo (CRAIG *et al.*, 2007). A doença está na lista das 17 doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (<http://www.who.int/zoonoses/diseases/echinococcosis/en/index.html>). Além disso, apresenta um caráter hiperendêmico em países da América do Sul, como no Brasil (estado Rio Grande do Sul) e na Argentina, visto que a alta incidência da doença na região é devido à pecuária, que se caracteriza por ser uma atividade econômica expressiva na criação de bovinos e ovinos (BUDKE, 2006). Segundo levantamento da Coordenação de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Agronegócio do Estado do Rio Grande do Sul, dos 32.203 animais abatidos em janeiro de 2011, 18% estavam infectados com *E. granulosus*, sendo ovelhas os animais mais afetados (26%), seguido por gado (18%), búfalos (14%) e suínos (4,8%) (BALBINOTTI *et al.*, 2012). A infecção gera graves perdas na produção das indústrias de produtos derivados do gado. As perdas econômicas decorrem da condenação de vísceras infectadas, da diminuição da produtividade e da qualidade da carne e do leite, da redução no valor do couro, da redução na taxa de crescimento e fecundidade dos animais (TORGERSON *et al.*, 2003).

Echinococcus granulosus é um complexo composto por 10 genótipos com uma alta variabilidade genética. Dentre os genótipos que compõe o grupo estão: 2 genótipos infectivos para ovinos (G1 e G2), 2 genótipos infectivos para bovinos (G3 e G5), um genótipo infectivo para equinos, um genótipo infectivo para camelídeos (G6), 2 genótipos infectivos pra suínos (G7 e G9) e dois genótipos infectivos para cervídeos (G8 e G10). Os genótipos G1 – G3 formam o táxon *E. granulosus sensu stricto*, sendo o genótipo G1 o maior responsável

por infecções em humanos e juntamente com o genótipo G5 são os principais agentes da doença no Brasil (Figura 1). Os genótipos G4 e G5 receberam a nomeação de espécies *E. equinus* e *E. ortleppi*, respectivamente (CARDONA; CARMENA, 2013).

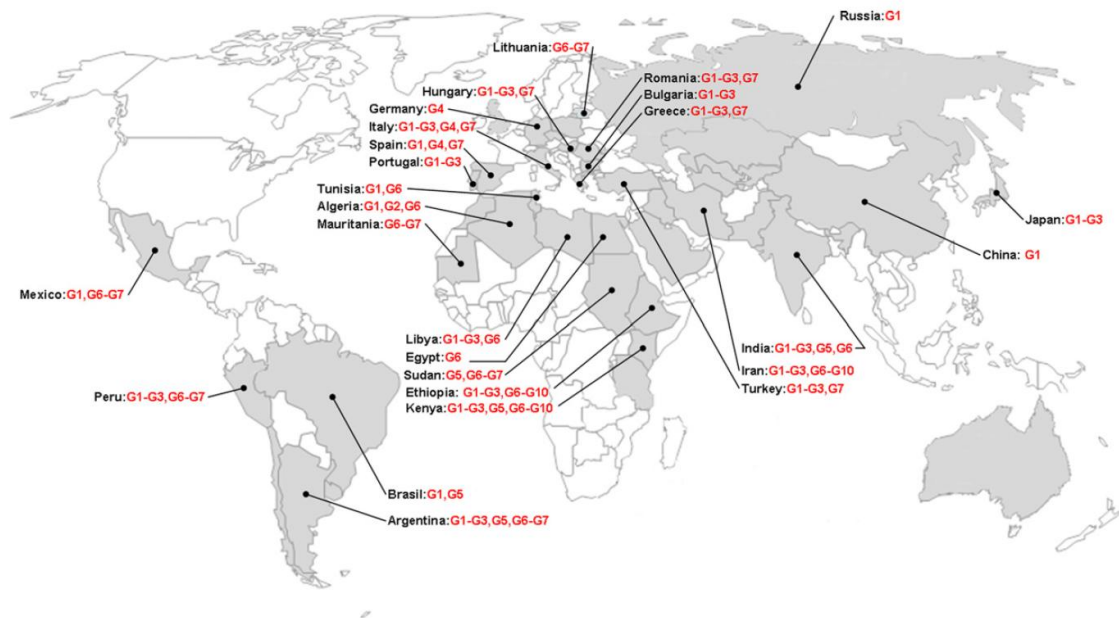


Figura 1: Mapa da distribuição global de *Echinococcus granulosus*. As flechas indicam os principais genótipos de ocorrência de acordo com o país (retirado de CARDONA; CARMENA, 2013).

O *E. granulosus* pertence à classe Cestoda e família Taeniidae. O parasito adulto é um pequeno verme achatado dorso-ventralmente (com no máximo 7 milímetros de comprimento), que vive fixado ao intestino delgado do hospedeiro definitivo, os canídeos, onde ocorre a fase sexuada do ciclo de vida do parasito. As proglótides grávidas (segmento do parasito que contém centenas de ovos) são liberadas nas fezes do hospedeiro definitivo. Esses ovos são ingeridos pelo hospedeiro intermediário – ungulados domésticos e, eventualmente, seres humanos –, onde há o desenvolvimento do estágio larval (metacestódeo ou cisto hidático) e a fase assexuada do ciclo de vida do parasito. Humanos tornam-se hospedeiros intermediários acidentais através da ingestão de ovos do parasito por meio do contato direto com o hospedeiro definitivo ou indiretamente consumindo água e vegetais contaminados com fezes de cães infectados. Os ovos eclodem e liberam as oncosferas que penetram na parede intestinal, circulam via sistema sanguíneo e/ou linfático até

ficarem presas em vasos de pequeno calibre em pulmão, fígado ou outros órgãos, onde darão origem ao cisto hidático (Figura 2)(SIRACUSANO *et al.*, 2012).

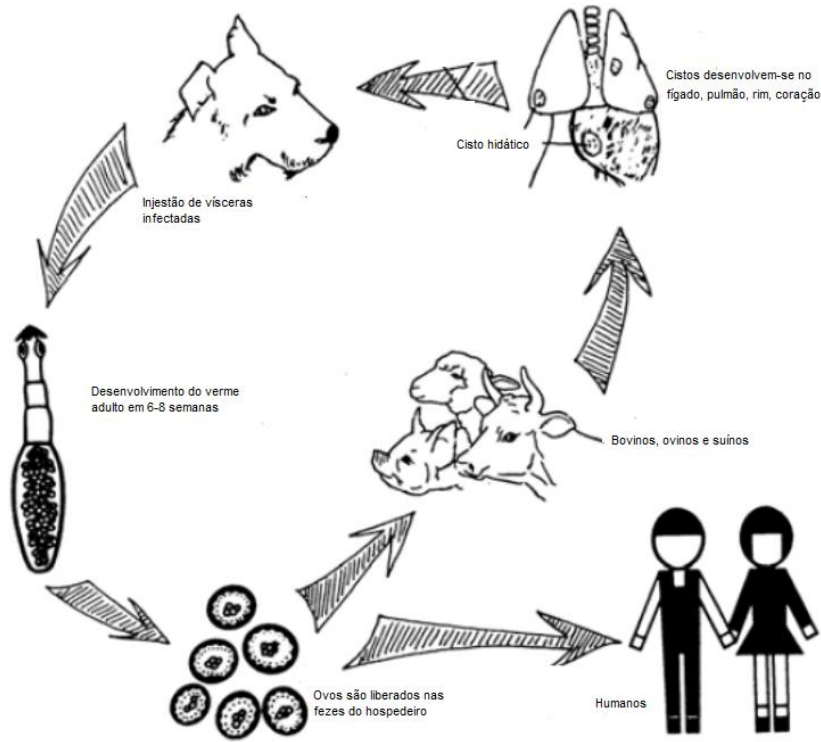


Figura 2: Ciclo de vida do parasito *Echinococcus granulosus* (modificado de ECKERT *et al.*, 2001).

O cisto hidático é uma vesícula unilocular formada por duas camadas, pela camada laminar e pela camada germinativa, e é circundado pela camada adventícia (Figura 3). A camada laminar é uma camada protetora acelular. A camada germinativa reveste a parede interna do cisto hidático e é composta por células indiferenciadas e outros tipos celulares. A camada adventícia é uma camada de colágeno originada da resposta imune do hospedeiro. Das células indiferenciadas da camada germinativa surgem as cápsulas prolíferas onde no seu interior desenvolvem-se os protoescólices (forma pré-adulta do parasito) (MORSETH, 1967; LASCANO *et al.*, 1975). Quando ingerido pelo hospedeiro definitivo, cada protoescólex é capaz de desenvolver-se em um indivíduo adulto e maduro sexualmente em aproximadamente 4 a 6 semanas (THOMPSON, 1995).

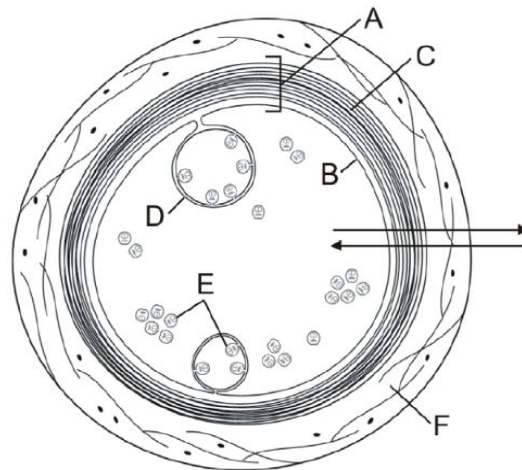


Figura 3: Diagrama esquemático do metacestódeo: A: parede do cisto hidático, B: camada germinativa, C: camada laminar, D: cápsula prolígera, E: protoescólices, F: camada adventícia, as setas indicam a troca de moléculas entre o parasito e o hospedeiro (retirado de MONTEIRO *et al.*, 2010).

1.2. Histonas

O nucleossomo é composto por um octâmero formado a partir de dímeros de histonas H2A, histonas H2B, histonas H3 e histonas H4 associado a aproximadamente 146 nucleotídeos, externamente a essa estrutura encontra-se uma única histona H1. As histonas apresentam uma cadeia polipeptídica similar baseada em uma longa hélice central, flanqueada lateralmente por hélices curtas e alças que interagem com o DNA. Uma região desestruturada composta por 15 a 30 resíduos de aminoácidos na extremidade amino-terminal é chamada de “cauda”, essa estrutura apresenta flexibilidade e se projeta para fora do nucleossomo. As histonas funcionam como aceptores para uma variedade de modificações pós-traducionais, incluindo acetilação, metilação e ubiquitinação de resíduos de lisina, fosforilação de resíduos de serina e de treonina, e metilação de resíduos de arginina (Figura 4)(KORNBERG; LORCH, 1999; FISCHLE *et al.*, 2003).

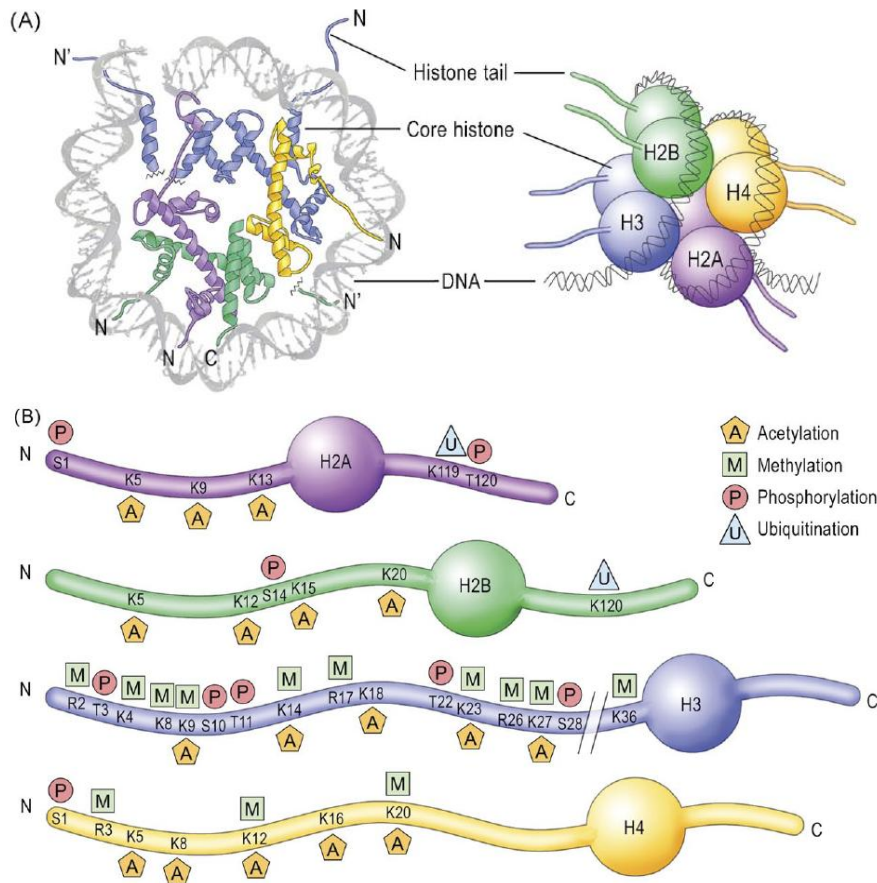


Figura 4: Nucleossomo e modificações pós-traducionais encontradas em histonas. (A) Estrutura do nucleossomo composto pelo DNA dupla-hélice envolvendo o octâmero de histonas; (B) Esquema representando as modificações pós-traducionais das extremidades NH₂ e COOH terminais na cadeia peptídica das histonas H2A, H2B, H3 e H4 (retirado de ALBERINI, 2009).

Em *E. granulosus*, a histona H2B de código GeneDB EgrG_000472800 foi identificada por análises proteômicas nos produtos de secreção/excreção de protoescólices em cultura *in vitro* (VIRGINIO *et al.*, 2012) e, juntamente com a His9277, no líquido hidático (MONTEIRO *et al.*, 2010). Uma histona H4 foi identificada nos produtos de secreção/excreção do parasito *Schistosoma mansoni* (EL RIDI *et al.*, 2008). Todos os membros da família de histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4) foram detectados em importantes quantidades em mitocôndrias de células de mamíferos, sendo que as histonas H2A e H2B foram encontradas como proteínas integrais de membrana e as histonas H1, H3 e H4 foram encontradas associadas à membrana mitocondrial externa (CHOI *et al.*, 2011), sugerindo que essas proteínas podem residir em vários compartimentos celulares. As histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4 foram descritas

como sendo capazes de fazer translocação direta através da membrana plasmática e com capacidade de carrear a entrada de macromoléculas em células de mamíferos (HARITON-GAZAL *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que a histona H4 presente em secreções de glândulas sebáceas possui propriedades antimicrobianas (LEE *et al.*, 2009), e as histonas H2A e H2B possuem propriedades antimicrobianas na placenta de humanos (KIM *et al.*, 2002); histonas H2A e H2B ligadas a vesículas lipídicas citosólicas formam um sistema de defesa antibacteriano para embriões de *Drosophila*, matando bactérias ao serem liberadas na presença de LPS ou de LTA (ANAND *et al.*, 2012), mostrando seu envolvimento na resposta imune inata. Além disso, histonas mostram ser potenciais candidatas para vacina em infecções causadas por *Leishmania* (CARRIÓN *et al.*, 2007; CARRIÓN *et al.*, 2008; MEDDEB-GARNAOUI *et al.*, 2010; CARRIÓN *et al.*, 2011).

1.3. Enzima SET metiltransferase

A enzima SET metiltransferase é uma histona-lisina N-metiltransferase, que possui o domínio SET e faz parte da superfamília de metiltransferases responsáveis por metilar resíduos de lisina pertencentes a caudas N-terminais de histonas. As enzimas com o domínio SET ligam-se a S-adenosil-L-metionina (AdoMet), que atua como doador do grupamento metila nos eventos de metilação dos resíduos de lisina. As metilações de resíduos específicos de lisina servem como modificações epigenéticas pós-traducionais que controlam a expressão de genes, funcionando como marcadores para o recrutamento de complexos específicos responsáveis pela organização da cromatina (DILLON *et al.*, 2005).

Embora os estudos estejam focados na metilação de proteínas histonas, vários estudos já identificaram outras proteínas metiladas. A metilação de resíduos de lisina tem sido observada em proteínas nucleares e citoplasmáticas, e está presente em eucariotos e procariotos. A metilação da proteína calmodulina é capaz de reduzir a sua capacidade de estimular a atividade da NAD quinase. A metilação da HSP90 está envolvida na montagem sarcômero através da estabilização proteína titina, e a metilação da HSP70 promove a sua associação a proteína Aurora Quinase B estimulando a

proliferação de células cancerosas. Além disso, a metilação de resíduos de lisina modula a atividade de proteínas bacterianas. A metilação da proteína pilina de *Synechocystis sp.* modula a motilidade celular, enquanto que a metilação do fator de alongamento EF-Tu diminui a sua atividade de GTPase e promove a sua dissociação da membrana. Os níveis de metilação da EF-Tu são aumentados em resposta à diminuição dos níveis de carbono, de nitrogênio e de fosfato disponíveis no meio, sugerindo que sinais extracelulares podem controlar a atividade de lisinas metiltransferases. As adesinas HBHA e LBP de *Mycobacterium tuberculosis*, importantes proteínas para a adesão à célula hospedeira, são fortemente metiladas. A metilação protege HBHA e LBP da clivagem proteolítica promovida pelo hospedeiro (LANOUILLE *et al.*, 2014).

2. Justificativa

Neste trabalho foram escolhidas 3 proteínas-alvo para estudos experimentais: a Histona H2A de código GeneDB EgrG_002060700 (His20607), a Histona H2A de código GeneDB EgrG_000927700 (His9277) e a Histona-lisina N-metiltransferase SET de código GeneDB EgrG_001142300 (SET metiltransferase).

Histonas já foram identificadas em meio extracelular, como nos produtos de secreção/excreção de protozoários e no líquido hidático de *E. granulosus*, e nos produtos de secreção/excreção de *Schistosoma mansoni*. Ainda, histonas foram encontradas em mitocôndrias, sugerindo que essas proteínas podem residir em vários compartimentos celulares, e demonstraram possuir propriedades antimicrobianas, revelando envolvimento na resposta imune inata e serem potenciais candidatas à vacina.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral:

Identificar histonas e proteínas relacionadas à modificação de histonas por análises *in silico* que possam ser secretadas e estar presentes em outros compartimentos celulares além do núcleo, e produzir essas proteínas para utilização em estudos experimentais com a finalidade de entender o papel dessas moléculas na relação parasito-hospedeiro de *E. granulosus*.

3.2. Objetivos específicos:

1. Buscar sequências de peptídeo sinal, de sequências que indicassem secreção e de sequências que indicassem localização diferente da nuclear em proteínas histonas e em proteínas relacionadas à modificação de histonas anotadas no genoma de *E. granulosus*;
2. Clonar as sequências codificadoras das proteínas His20607, His9277 e SET metiltransferase de *E. granulosus*;
3. Expressar em *Escherichia coli* e purificar as proteínas recombinantes;

4. Material e métodos

4.1. Análise do Potencial para a Secreção

Foram realizadas buscas de sequências de peptídeo sinal, de sequências que indicassem secreção e de sequências que indicassem localização diferente do núcleo em histonas e em proteínas relacionadas à modificação de histonas anotadas no genoma de *E. granulosus* (GeneDB, <http://www.genedb.org>). Foram analisadas as sequências de 71 proteínas do genoma de *E. granulosus* depositadas no GeneDB (Tabela A1 do Apêndice), utilizando-se os programas ProtFun2.2, NetNES1.1, NucPred, SOSUlsignal, SecretomeP1.0, SecretomeP2.0, SignalP4.0, TargetP1.1, PrediSi, TMHMM Server v.2.0, MitoProt II - v1.101, WoLF PSORT e iPSORT.

4.2. Extração de RNA de protoescolícos de *E. granulosus* e síntese de cDNA

Cistos hidáticos foram coletados de vísceras de bovinos naturalmente infectados, em colaboração com um frigorífico do Rio Grande do Sul. No processamento dos cistos, o líquido hidático foi aspirado assepticamente com o auxílio de seringas, e os protoescólices foram recuperados por sedimentação e lavados com solução PBS 1X (27 mM KCl, 20 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 100 mM NaHPO₄, pH 7.4) para remoção de contaminantes. Os protoescólices foram armazenados em reagente TRIzol® (Invitrogen) a -80°C até o momento da extração do RNA.

O RNA foi extraído de 50 µl de protoescólices utilizando-se 1 ml do reagente TRIzol® (Invitrogen), conforme o protocolo do fabricante. Para a posterior reação de RT-PCR, o RNA obtido foi tratado com DNase I livre de RNase (Fermentas). A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se 4 µg de RNA, com a enzima *M-MuLV Reverse Transcriptase* (Fermentas) e *Oligo(dT)₁₈ Primer* (Fermentas).

4. 3. Amplificação e clonagem das sequências codificadoras das proteínas His20607, His9277 e SET metiltransferase

As sequências codificadoras das proteínas His20607, His9277 e SET metiltransferase anotadas no genoma de *E. granulosus* (GeneDB, <http://www.genedb.org>) com os códigos EgrG_002060700, EgrG_000927700 e EgrG_001142300 foram clonadas no vetor de expressão pGEX-TEV, respectivamente (VARGAS *et al.*, 2010). Para clonagem, as sequências codificadoras das proteínas foram amplificadas por uma PCR primária com oligonucleotídeos iniciadores (his20607_F e his20607_R para His20607, his9277_F e his9277_R para His9277, e set_F e set_R para SET metiltransferase)(Tabela1) que continham nucleotídeos específicos para amplificação de cada uma das sequências-alvo e mais 24 nucleotídeos de homologia com cada extremidade do vetor pGEX-TEV; os produtos da PCR foram usados como molde para uma PCR secundária, com os oligonucleotídeos iniciadores FrecII e RrecII (Tabela 1) que continham uma região adicional de mais 26 nucleotídeos de homologia com cada extremidade do vetor. Na PCR primária, as sequências codificadoras das proteínas

His20607 e SET metiltransferase foram amplificadas a partir de DNA (obtido da biblioteca de DNA genômico pertencente ao laboratório) e a sequência codificadora da proteína His9277 foi amplificada a partir de cDNA (obtido conforme item 4.2.). Os oligonucleotídeos iniciadores foram projetados no *software* Vector NTI Advance 10 (Invitrogen). As PCRs foram realizadas utilizando o *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Fermentas), conforme as instruções do fabricante. O resultado foi analisado em gel de agarose 1% corado com *GelRed*.

Foram projetados iniciadores para a amplificação da sequência codificadora de cada proteína correspondente, excetuando a região que continha a sequência codificadora de peptídeo sinal para as proteínas His20607 e SET metiltransferase, conforme os dados obtidos pelos programas de predição de peptídeo sinal (SOSUisignal, SignalP4.0, PrediSi e iPSORT). A proteína His9277 não possui sequência codificadora peptídeo sinal e, por isso, sua sequência foi clonada integralmente.

O vetor pGEX-TEV foi linearizado por clivagem com a endonuclease de restrição *XhoI* e defosforilado com a enzima SAP para remoção de grupamentos fosfato, impedindo a religação do DNA durante a clonagem. O vetor clivado foi purificado, utilizando o *kit* de purificação de DNA GFX (GE Healthcare). Para a clonagem por recombinação homóloga *in vivo* (PARRISH *et al.*, 2004) foi utilizada a *Escherichia coli* KC8. As células bacterianas foram transformadas com 50 ng de cada vetor linearizado e 50 ng do produto de PCR a ser clonado em 25 µl de tampão KCM 2x (200 mM KCl, 60 mM CaCl₂, 100 mM MgCl₂). Após choque térmico, as células foram incubadas em 1 ml de meio LB a 37°C por 1 hora, e semeadas em meio seletivo com os antibióticos tetraciclina e ampicilina. A identificação dos plasmídeos recombinantes foi realizada por PCR de colônia utilizando os iniciadores específicos do vetor pGEX-TEV (pGEX-Alt5' e pGEX-Alt3') (Tabela1). A extração de DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Os clones utilizados para posterior expressão foram sequenciados em sequenciador automático MEGABACE 1000.

Tabela 1: Lista das seqüências de oligonucleotídeos utilizados. Tm (temperaturas de anelamento utilizadas nos programas das PCRs).

Nome	Seqüência do oligonucleotídeo	Tm(°C)
his20607_F	5'TATTTTCAGGGAGAATTCCCGGGTGTCTACTTGGCTGCTGT GCT3'	66
his20607_R	5'GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCACTACTCCTTGCTGACC ACC3'	66
his9277_F	5'TATTTTCAGGGAGAATTCCCGGGTATGGCTGGTGGTAAAGC GG3'	66
his9277_R	5'GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCAAACACCAAGAGGTTTG GACGG 3'	66
set_F	5'TATTTTCAGGGAGAATTCCCGGGTCTTCAGTGCAATTCGGA G	63
set_R	5'GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCACGCTTCTTTAAATATTA ATACACA 3'	63
Frecll	5'TGGTTCCGCGTGGATCTGAAAACCTGTATTTTCAGGAGAAT TCCCGGGT3'	60
Rrecll	5'TGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGGTTTCGGTGA TGACGGTGAAAACC3'	60
pGEX-Alt5'	5'CCTGGATGCGTTCCCAAAA3'	57
pGEX-Alt3'	5'CGACACCCGCCAACACC3'	57

4.4. Padronização das condições de expressão das proteínas recombinantes His20607, His9277 e SET metiltransferase em *E. coli*

A expressão da proteína recombinante His20607 em fusão com a proteína GST foi testada nas células de *E. coli* BL21 Codon Plus RP (DE3), *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, *E. coli* BL21 pLYSE (DE3), e *E. coli* BL21 Codon Plus Ril (DE3) e *E. coli* BL21 Star (DE3) sob indução com 0,1 mM de IPTG por 16 horas a 20°C. A cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3) foi testada para a expressão da proteína His20607 também sob a condição de 0,05 mM de IPTG por 16 horas a 20°C.

A expressão da proteína recombinante His9277 em fusão com a proteína GST foi testada sob a condição de 0,1 mM de IPTG, por 3 horas a 37°C nas cepas *E. coli* BL21 Codon Plus RP (DE3) e *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, e

utilizando-se a mesmas cepas incluindo as *E. coli* BL21 pLYSE (DE3), *E. coli* BL21 Codon Plus Ril (DE3) e *E. coli* BL21 Star (DE3) sob a condição de 0,1 mM de IPTG por 16 horas a 20°C. Para expressão da proteína His9277 em *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS também foram utilizadas as temperaturas de 23°C e 27 °C para expressão por 16 horas com 0,1 mM de IPTG.

A expressão da proteína recombinante SET metiltransferase em fusão com a proteína GST foi testada sob agitação com a 0,1 mM de IPTG, por 3 horas a 37°C nas linhagens de *E. coli* BL21 Codon Plus Ril (DE3), *E. coli* BL21 Codon Plus RP (DE3) e *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, e utilizando-se a mesmas cepas incluindo a cepa *E. coli* BL21 pLysE (DE3) por 16 horas a 20°C com 0,1 mM de IPTG. A expressão das proteínas recombinantes foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS PAGE 12%.

4.5. Padronização da purificação das proteínas recombinantes His20607, His9277 e SET metiltransferase fusionadas a GST

A expressão das proteínas recombinantes em fusão com a proteína GST permitiu a purificação por cromatografia de afinidade. Após a indução, as células bacterianas foram rompidas por sonicação e o lisado foi centrifugado a 20.000 rpm por 30 minutos a 4°C para obtenção da fração solúvel de proteínas, que foi incubada com a resina *Glutathione-Sepharose 4B* (GE Healthcare) para a purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade, conforme as recomendações do fabricante. A proteínas recombinantes foram liberadas da ligação com a proteína GST por clivagem com a protease TEV na proporção 0,01 mg da protease para 0,1 mg da proteína de fusão, com incubação a 34°C por 16 horas. A eficiência da clivagem foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida–SDS-PAGE 15%.

A resina contendo a proteína recombinante His20607 em fusão com a GST, antecedendo a clivagem com protease TEV, foi lavada com 20 volumes de tampão contendo 5mM de ATP (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 5 mM ATP), a fim de remover a chaperonina groEL (60kDa) de *E. coli* associada com a proteína recombinante. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida–SDS-PAGE 15%.

Após a clivagem da proteína His9277 em fusão com a GST utilizando a protease TEV, foram realizadas lavagens da resina com 3 volumes de tampão 0,1% Triton X-100 em PBS 1X pH7.4 para eluição da proteína His9277 livre da fusão com a GST.

Antes da clivagem com a protease TEV, foram testados dois tipos de tampões contendo ATP para a lavagem da resina que continha ligada a proteína SET metiltransferase em fusão com a GST. No primeiro teste, foram realizadas lavagens de 20 volumes de 5 mM de ATP (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 5 mM ATP). No segundo teste, também foram realizadas lavagens de 20 volumes, mas de 10 mM de ATP (PBS 1X pH7.4, 10mM ATP). Tais testes também objetivavam a retirada da proteína contaminante de *E. coli* associada à proteína de estudo. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida–SDS-PAGE 12%.

4.6. Espectrometria de massas

A identificação da proteína contaminante de *E. coli* presente nas eluições da proteína recombinante SET metiltransferase foi realizada por espectrometria de massas LC-ESI-Q-TOF MS/MS. As bandas do gel de poliacrilamida–SDS-PAGE 12% correspondentes às proteínas presentes nas eluições da SET metiltransferase foram retiradas, tratadas e identificadas, conforme descrito por MONTEIRO *et al.*, 2010.

5. Resultados

5.1. Análise do Potencial para a Secreção

A His20607 foi apontada por 8 programas como sendo destinada à secreção e por 1 programa possuindo localização diferente da nuclear. A His9277 foi apontada por 1 programa como possuindo uma sequência rica em leucina, que indica a exportação da proteína para o citoplasma, por 1 programa indicando localização diferente da nuclear e por 1 programa como sendo exportada para mitocôndria. A SET metiltransferase foi apontada por 4

programas como sendo destinada à secreção, por 1 programa indicando localização extracelular, por 1 programa indicando localização diferente da nuclear e por 1 programa como sendo exportada para mitocôndria (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados obtidos a partir de programas para a predição da presença de sequência de peptídeo sinal, de secreção e de localização celular das proteínas His9277, His20607 e SET metiltransferase.

Programas	His20607	His9277	SET metiltransferase
ProtFun 2.2	Metabolismo energético, enzima, resposta imune	Tradução, proteína estrutural	Metabolismo energético, enzima, isomerase, resposta imune
NetNES1.1	-	89-97 sequência rica em leucina (exportação núcleo p/ citoplasma)	-
NucPred	Não nuclear	Não nuclear	Não nuclear
SOSUlsignal	Peptídeo sinal (36aa) e 1 hélice transmembrana (23aa)	Proteína solúvel	Peptídeo sinal (20aa)
SecretomeP1.0	Secreção	-	Secreção
SecretomeP2.0	Secreção	-	Secreção
SignalP4.0	Peptídeo sinal	-	-
TargetP1.1	Secreção	-	Secreção
PrediSi	Peptídeo sinal, secreção	-	-
TMHMM Server v.2.0	1 hélice transmembrana	-	-
WoLF PSORT	Secreção	Núcleo	Extracelular
iPSORT	Peptídeo sinal	-	-
MitoProt II - v1.101	-	Exportação p/ mitocôndria	Exportação p/ mitocôndria

Além disso, transcritos dos genes que codificam a His9277 e a SET metiltransferase foram detectados em protoescólices, conforme dados obtidos por RNAseq (TSAI *et al.*, 2013).

5.2. Amplificação e clonagem das sequências codificadoras das proteínas His20607, His9277 e SET metiltransferase

As sequências codificadoras das proteínas His20607 e SET metiltransferase foram amplificadas a partir de DNA por PCR primária, por meio dos iniciadores his20607_F e his20607_R gerando um produto de 272 pb (Figura 5A), e dos iniciadores set_F e set_R gerando um produto de 512 pb (Figura 7A), respectivamente. A sequência codificadora da proteína His9277 foi amplificada a partir de cDNA por PCR primária por meio dos iniciadores his9277_F e his9277_R, gerando um produto de 443 pb (Figura 6A). Os produtos das reações primárias foram utilizados como molde para uma segunda reação de PCR com os iniciadores FreclI e RrecII, gerando fragmentos de 322 pb para His20607 (Figura 5B), de 493 pb para His9277 (Figura 6B), e de 562 pb para SET metiltransferase (Figura 7A).

A clonagem por recombinação homóloga no vetor pGEX-TEV foi confirmada por PCR de colônia e resultou em 5 colônias recombinantes do total de 14 colônias para a sequência da His20607, 6 colônias recombinantes do total de 14 colônias para a sequência da His9277 e 12 colônias recombinantes de 22 colônias para a sequência da SET metiltransferase. Nessa reação de PCR, a região amplificada corresponde ao sítio múltiplo de clonagem onde as sequências são inseridas. Plasmídeos recombinantes apresentaram produtos de 615 pb para His20607 (Figura 5C), de 786 pb para a His9277 (Figura 6C) e de 855 pb para a SET metiltransferase (Figura 7B), enquanto os não recombinantes apresentaram produtos de 393 pb.

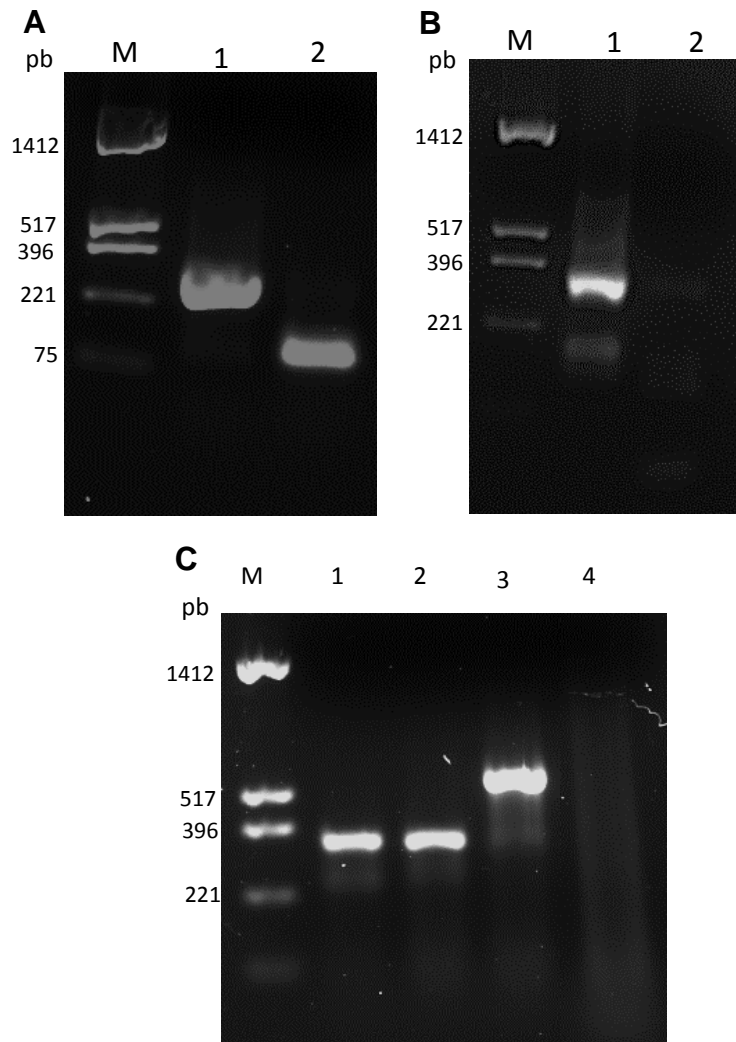


Figura 5: Produtos de amplificação e confirmação da clonagem da sequência codificadora da proteína His20607. Em **A**, PCR primária: **M** - Marcador de tamanho molecular (pb); **1** - PCR primária (fragmento de 272 pb – sequência codificadora); **2** - Controle negativo da reação de PCR, sem adição de DNA. Em **B**, PCR secundária: **M** - Marcador de tamanho molecular (pb); **1** - PCR secundária (fragmento de 322 pb); **2** - Controle negativo da reação de PCR, sem adição de DNA. Em **C**, confirmação da clonagem da sequência codificadora: **M** - Marcador de tamanho molecular (pb); **1** - Vetor pGEX-TEV íntegro (fragmento de 393 pb); **2** - Colônia não-recombinante (fragmento de 393 pb); **3** - Colônia recombinante (fragmento de 615 pb); **4** - Controle negativo da reação de PCR, sem adição de DNA.

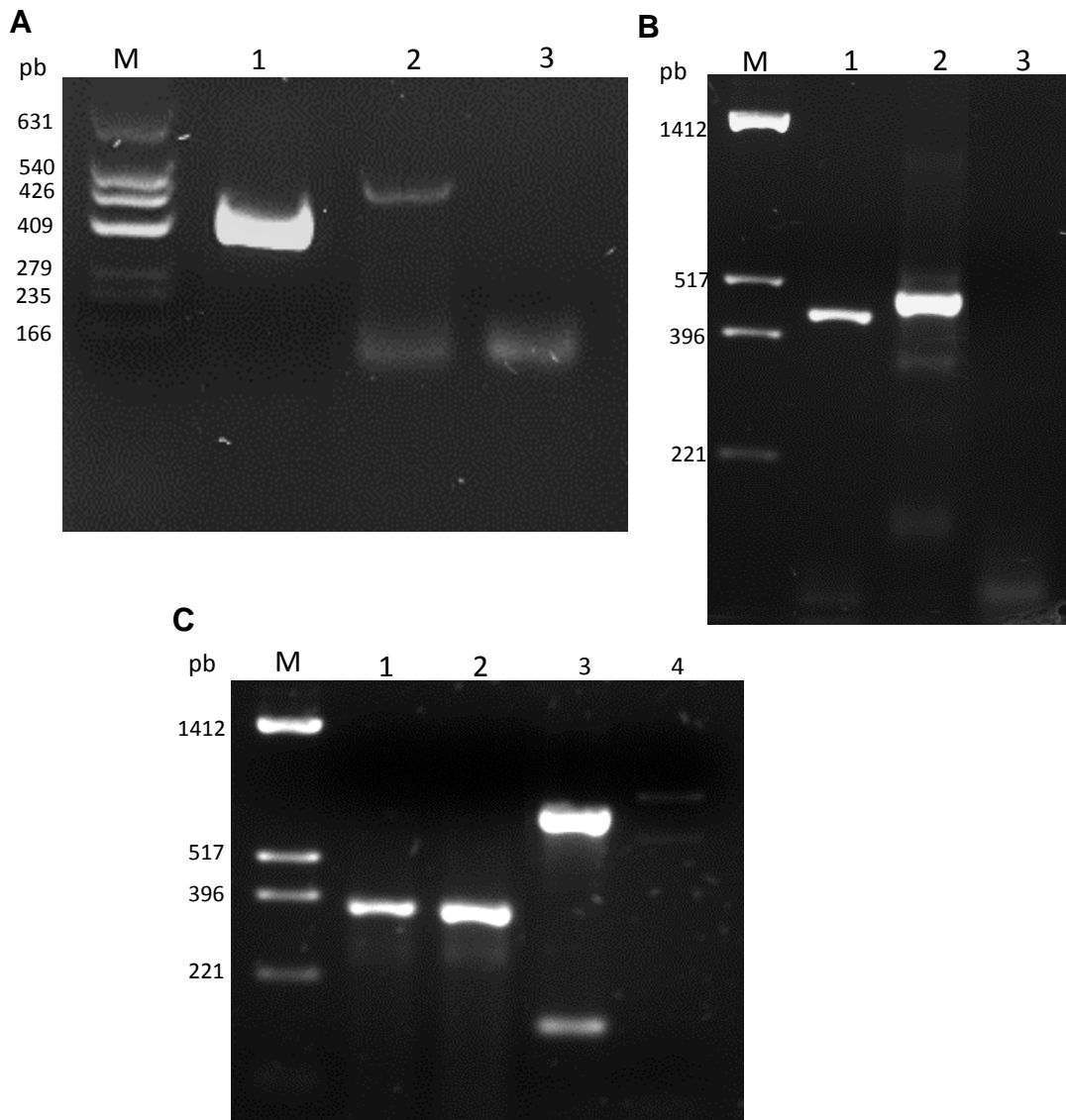


Figura 6: Produtos de amplificação e confirmação da clonagem da sequência codificadora da proteína His9277. Em **A**, PCR primária: **M** - Marcador de tamanho molecular (pb); **1** - amostra de cDNA (fragmento de 443 pb – sequência codificadora); **2** - amostra de DNA genômico (fragmento de 493 pb – sequência do gene com íntron); **3** - Controle negativo da reação de PCR, sem adição de DNA. Em **B**, PCR secundária: **M** - Marcador de tamanho molecular (pb); **1** - PCR primária (fragmento de 443 pb – sequência codificadora); **2** - PCR secundária (fragmento de 493pb); **3** - Controle negativo da reação de PCR, sem adição de DNA. Em **C**, confirmação da clonagem da sequência codificadora: **M** - Marcador de tamanho molecular (pb); **1** - Vetor pGEX-TEV íntegro (fragmento de 393 pb); **2** - Colônia não-recombinante (fragmento de 393 pb); **3** - Colônia recombinante (fragmento de 786 pb); **4** - Controle negativo da reação de PCR, sem adição de DNA.

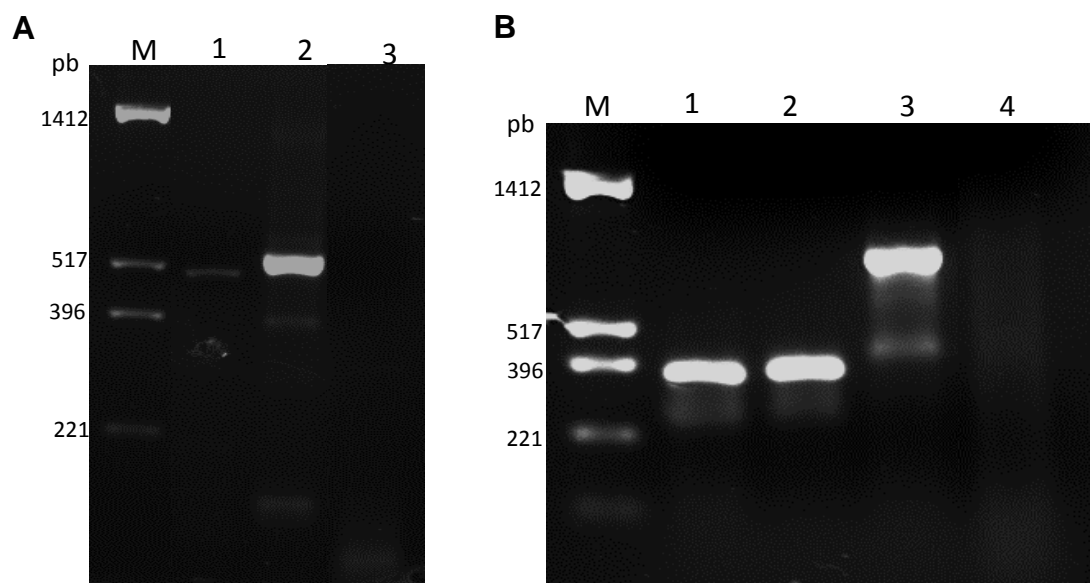


Figura 7: Produtos de amplificação e confirmação da clonagem da sequência codificadora da proteína SET metiltransferase. Em **A**, PCR primária e PCR secundária: **M** - Marcador de tamanho molecular (pb); **1** - PCR primária (fragmento de 512 pb – sequência codificadora); **2** - PCR secundária (fragmento de 562 pb); **3** - Controle negativo da reação de PCR, sem adição de DNA. Em **B**, confirmação da clonagem da sequência codificadora: **M** - Marcador de tamanho molecular (pb); **1** - Vetor pGEX-TEV íntegro (fragmento de 393 pb); **2** - Colônia não-recombinante (fragmento de 393 pb); **3** - Colônia recombinante (fragmento de 855 pb); **4** - Controle negativo da reação de PCR, sem adição de DNA.

5.3. Padronização das condições de expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*

5.3.1. Expressão da proteína recombinante His20607 em *E. coli*

A melhor condição de expressão para a proteína His20607 por 16 horas a 20°C foi na cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) (Figura 8). Também foi realizado um teste com diferentes concentrações de IPTG (0,05 mM e 0,1 mM), sendo que a condição de 0,05 mM de IPTG apresentou o melhor rendimento na expressão da proteína (Figura 9). A proteína His20607 em fusão com a GST apresentou massa molecular de 32 kDa.

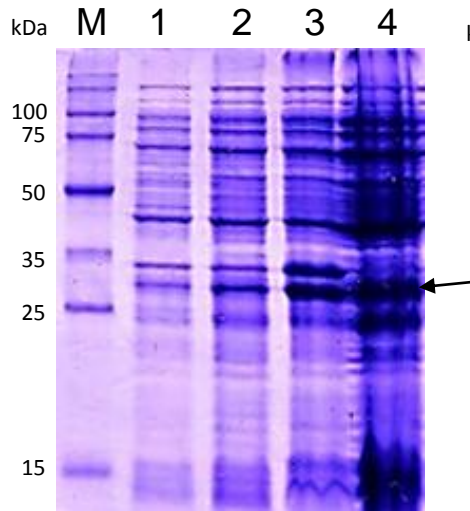
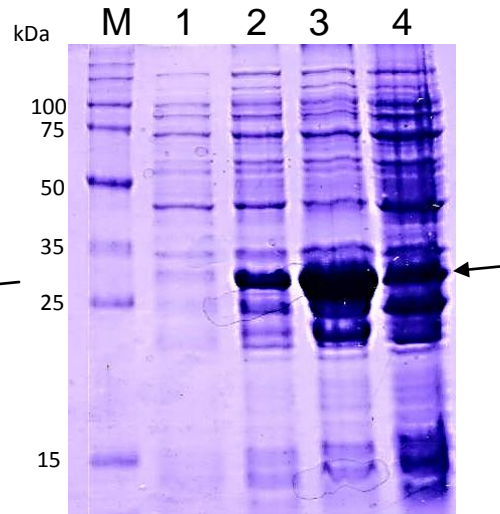
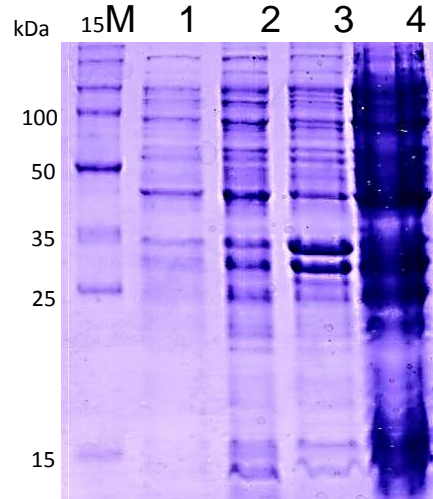
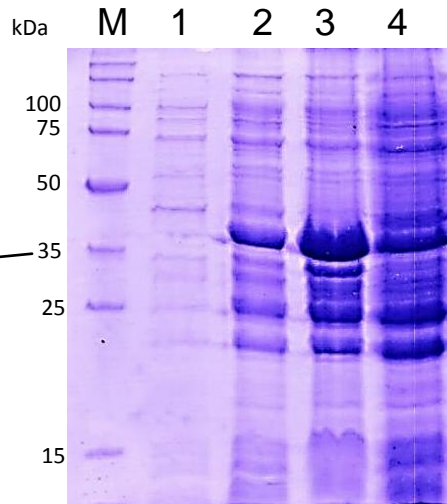
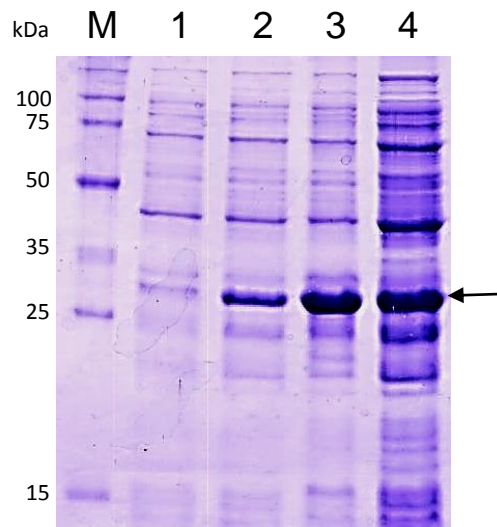
A**B****C****D****E**

Figura 8: Expressão da proteína recombinante His20607 a 20°C. Indução com 0,1 mM de IPTG por 16 horas a 20°C, utilizando-se as cepas de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS (A), *E. coli* BL21 Codon Plus RP (DE3)(B), *E. coli* BL21 Codon Plus Ril (DE3)(C), *E. coli* BL21 pLYSE (DE3)(D) e *E. coli* BL21 Star (DE3)(E). M - Marcador de massa molecular (kDa); 1 - Cultura não-induzida; 2 - Expressão da proteína His20607 em fusão com a GST em cultura induzida; 3 - Fração insolúvel; 4 - Fração solúvel. A proteína His20607 em fusão com a GST (32 kDa) está indicada pela seta.

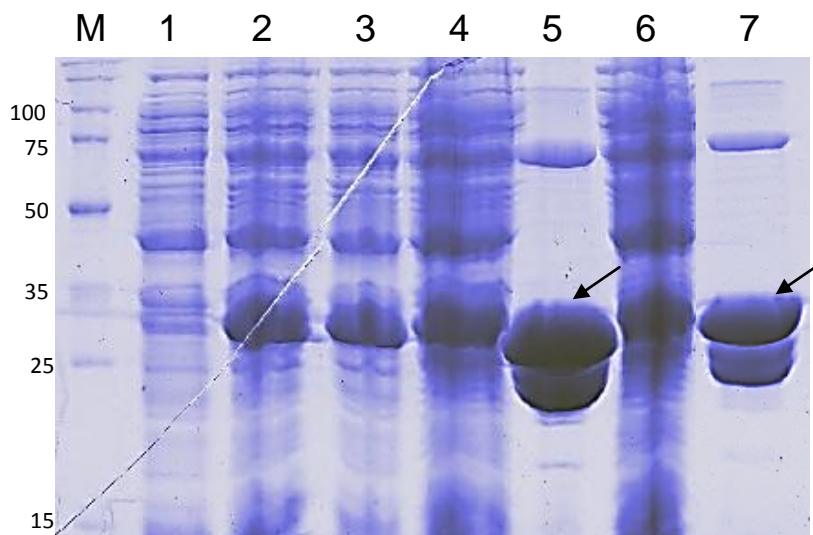


Figura 9: Expressão da proteína recombinante His20607 em *E. coli* BL21 Star (DE3) sob duas condições de indução a 20°C por 16 horas: M - Marcador de massa molecular (kDa); 1 - Cultura não-induzida; 2 - Cultura induzida com 0,05 mM de IPTG; 3 - Cultura induzida com 0,1 mM de IPTG; 4 - Fração solúvel da indução com 0,05 mM de IPTG; 5 - Resina após a fração solúvel da indução com 0,05 mM de IPTG; 6 - Fração solúvel da indução com 0,1 mM de IPTG; 7 - Resina após a fração solúvel da indução com 0,1 mM de IPTG. A proteína His20607 em fusão com a GST (32 kDa) está indicada pela seta.

5.3.2. Expressão da proteína recombinante His9277 em *E. coli*

A proteína His9277 não apresentou solubilidade sob a temperatura de 37°C para expressão, houve um bom rendimento na quantidade de proteína produzida, mas somente na fração insolúvel a His9277 é observada (Figura 10). A melhor condição de expressão para a proteína His9277 foi na cepa *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS (Figura 11). Também foram testadas diferentes temperaturas, sendo que a temperatura de 23°C apresentou menor quantidade de produto truncado (GST) e maior quantidade da proteína His9277 em fusão com a GST (Figura 12). A proteína His9277 em fusão com a GST apresentou massa molecular de 37 kDa.

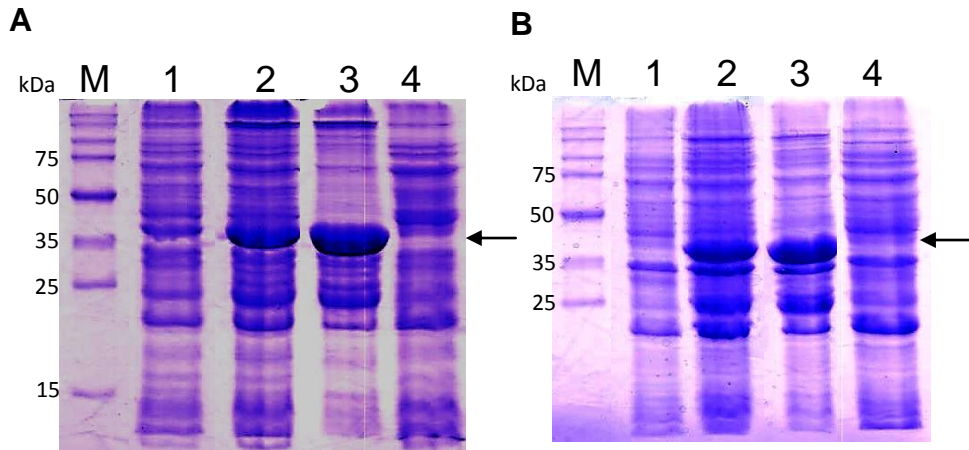
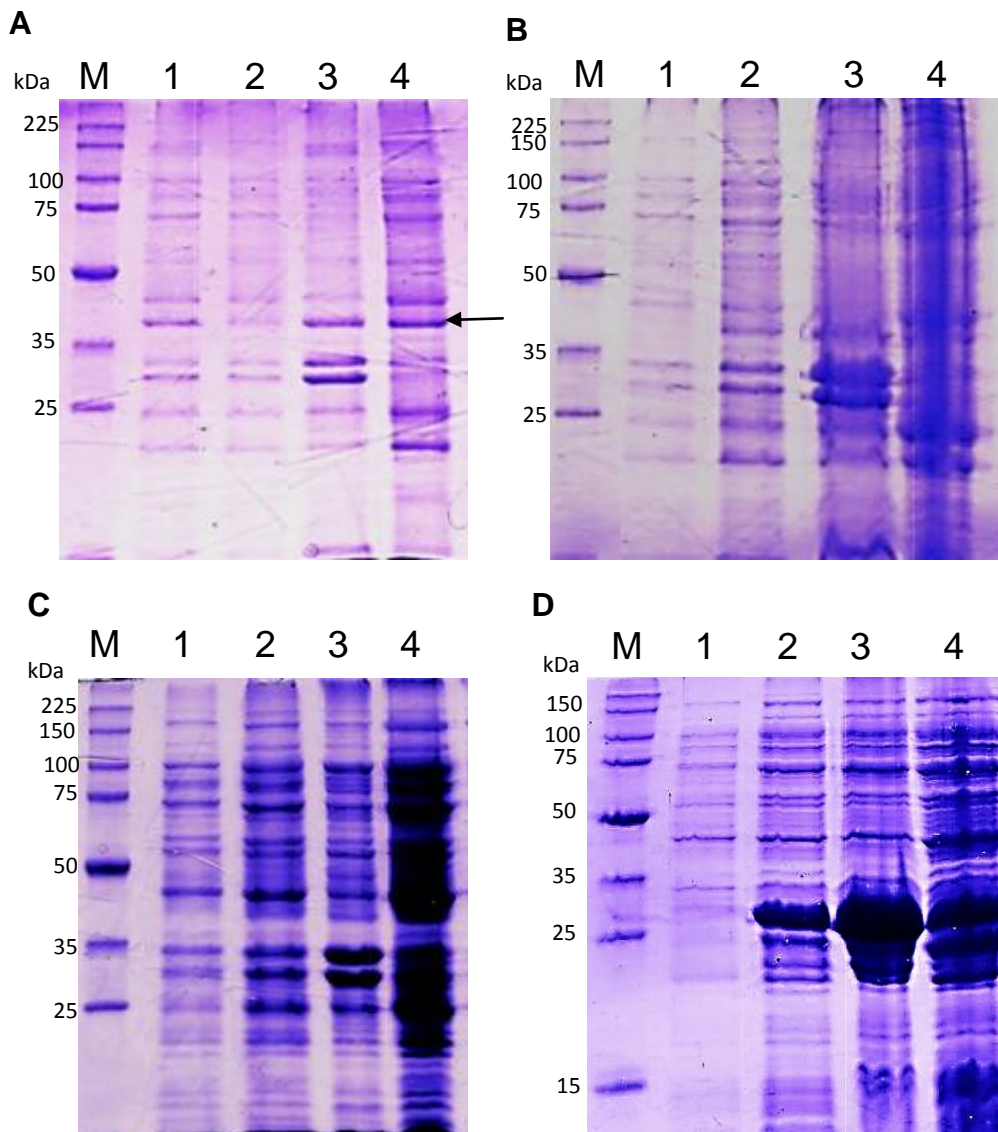


Figura 10: Expressão da proteína recombinante His9277 a 37°C. Indução com 0,1mM IPTG por 3 horas a 37°C, utilizando-se as cepas de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS (A) e *E. coli* BL21 Codon Plus RP (DE3)(B). **M** - Marcador de massa molecular (kDa); **1** - Cultura não-induzida; **2** - Expressão da proteína His9277 em fusão com a GST em cultura induzida; **3** - Fração insolúvel de proteínas; **4** - Fração solúvel de proteínas. A proteína His9277 em fusão com a GST (37 kDa) está indicada pela seta.



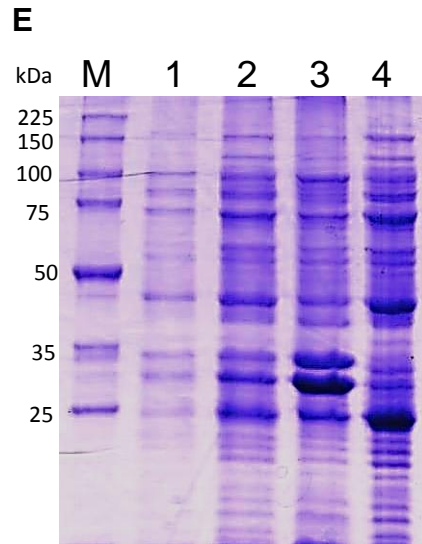


Figura 11: Expressão da proteína recombinante His9277 a 20°C. Indução com 0,1 mM IPTG por 16 horas a 20°C, utilizando-se as cepas de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS (**A**), *E. coli* BL21 Codon Plus RP (DE3)(**B**), *E. coli* BL21 Codon Plus Ril (DE3)(**C**), *E. coli* BL21 pLYSE (DE3) (**D**) e *E. coli* BL21 Star (DE3)(**E**). **M** - Marcador de massa molecular (kDa); **1** - Cultura não-induzida; **2** - Expressão da proteína His9277 em fusão com a GST em cultura induzida; **3** - Fração insolúvel de proteínas; **4** - Fração solúvel de proteínas. A proteína His9277 em fusão com a GST (37 kDa) está indicada pela seta.

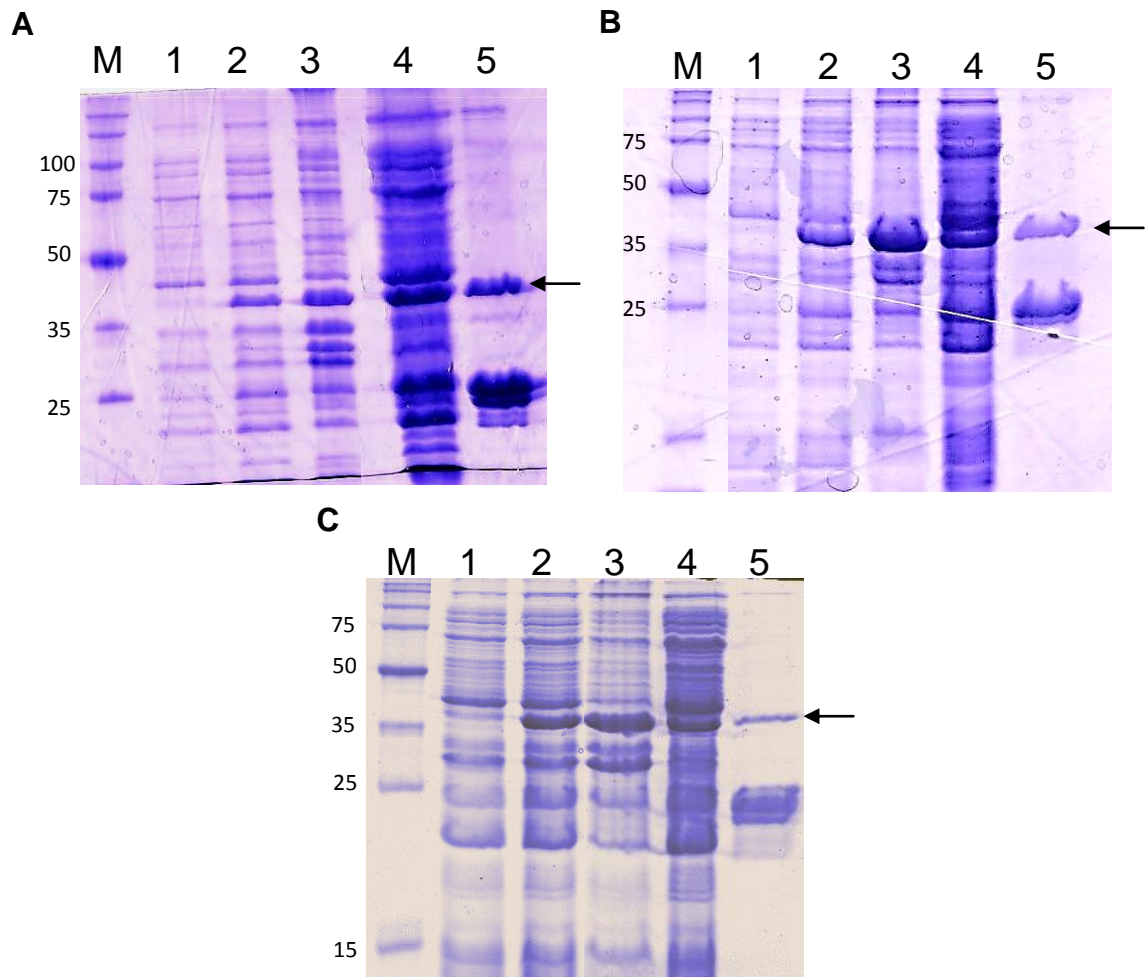


Figura 12: Expressão da proteína recombinante His9277 sob diferentes temperaturas de indução. Indução com 0,1 mM IPTG por 16 horas, utilizando-se a cepa de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS por 16 horas submetida: a 20°C (**A**), a 23°C (**B**) e a 27°C (**C**). **M** - Marcador de massa molecular (kDa); **1** - Cultura não-induzida; **2** - Expressão da proteína His9277 em fusão com a GST em cultura induzida; **3** - Fração insolúvel de proteínas; **4** - Fração solúvel de proteínas; **5** - Resina de cromatografia de afinidade após a fração solúvel de proteínas. A proteína His9277 em fusão com a GST (37 kDa) está indicada pela seta.

5.3.3. Expressão da proteína recombinante SET metiltransferase em *E. coli*

A proteína SET metiltransferase apresentou um bom rendimento na quantidade de proteína produzida a 37°C, mas grande parte foi observada na fração insolúvel de proteínas (Figura 13). A melhor condição de expressão para a proteína SET metiltransferase de forma solúvel foi na cepa *E. coli* BL21 Codon Plus Ril (DE3) sob indução com 0,1 mM de IPTG por 16 horas a 20°C (Figura 14). A proteína SET metiltransferase em fusão com a GST apresentou massa molecular de 41 kDa.

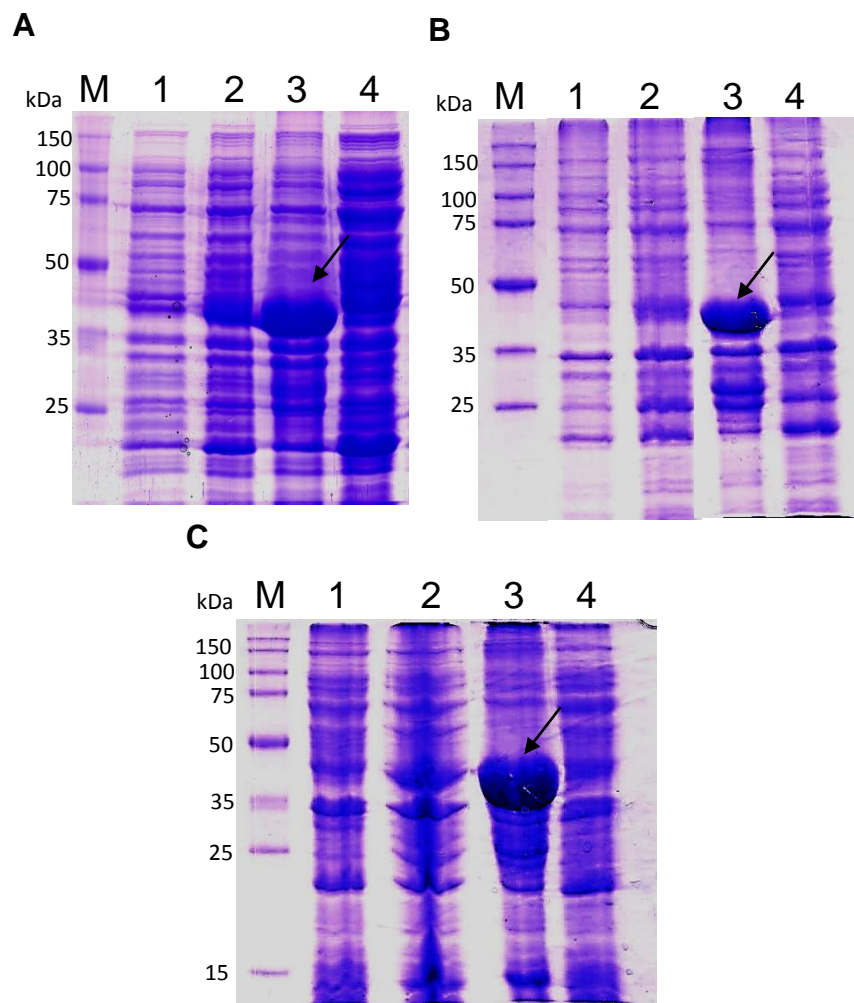


Figura 13: Expressão da proteína recombinante SET metiltransferase a 37°C. Indução com 0,1 mM IPTG por 3 horas a 37°C, utilizando-se as cepas de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS (A), *E. coli* BL21 Codon Plus RP (B) e *E. coli* BL21 Codon Plus Ril (DE3) (C). M - Marcador de massa molecular (kDa); 1 - Cultura não-induzida; 2 - Expressão da proteína SET metiltransferase em fusão com a GST em cultura induzida; 3 - Fração insolúvel de proteínas; 4 - Fração solúvel de proteínas. A proteína SET metiltransferase em fusão com a GST (41 kDa) está indicada pela seta.

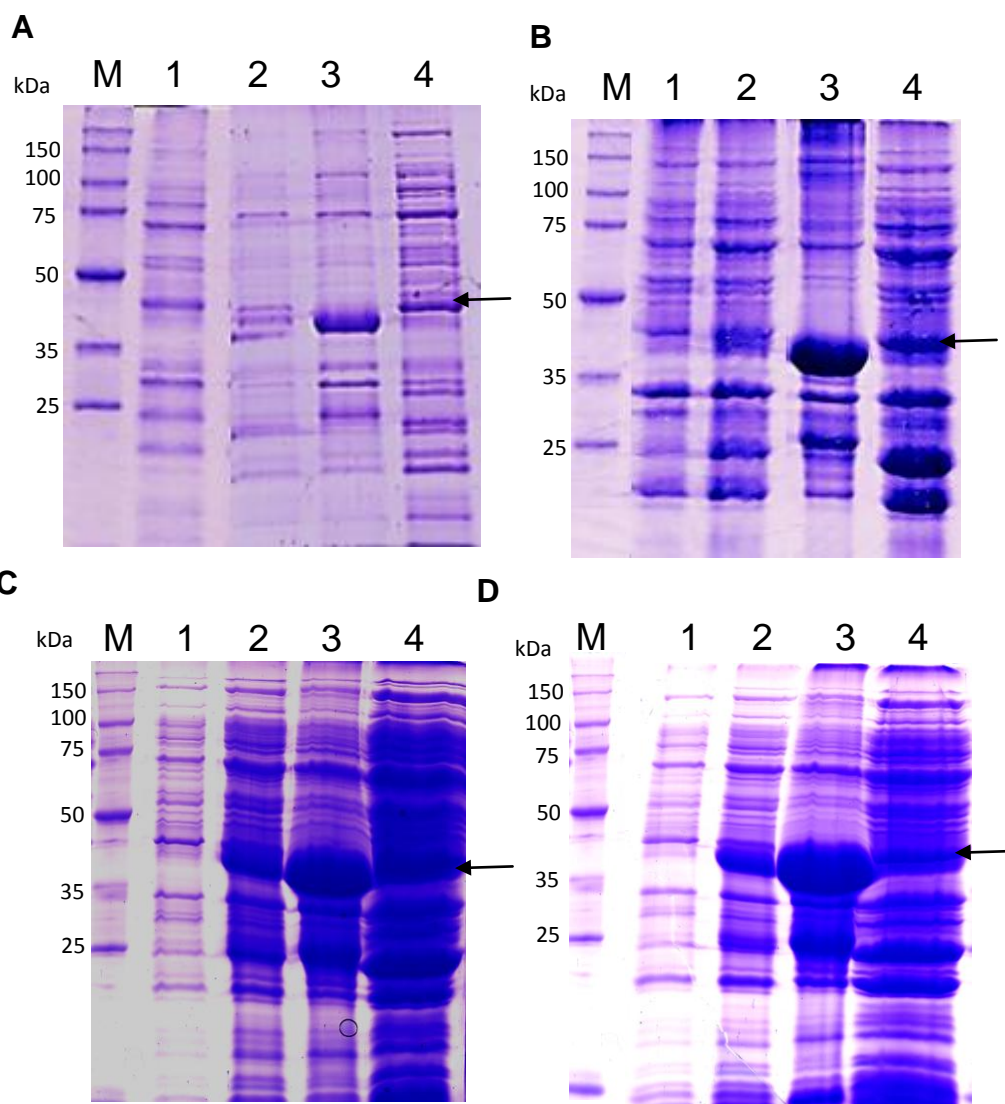


Figura 14: Expressão da proteína recombinante SET metiltransferase a 20°C. Indução com 0,1 mM IPTG por 16 horas a 20°C, utilizando-se as cepas de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS (A), *E. coli* BL21 Codon Plus RP (DE3)(B), *E. coli* BL21 Codon Plus Ril (DE3)(C) e *E. coli* BL21 pLYSE (DE3)(D). M - Marcador de massa molecular (kDa); 1 - Cultura não-induzida; 2 - Expressão da proteína SET metiltransferase em fusão com a GST em cultura induzida; 3 - Fração insolúvel de proteínas; 4 - Fração solúvel de proteínas. A proteína SET metiltransferase em fusão com a GST (41 kDa) está indicada pela seta.

5.4. Purificação das proteínas recombinantes fusionadas a GST

5.4.1. Purificação da proteína recombinante His20607

A proteína His20607 foi purificada por cromatografia de afinidade, conforme descrito no item 4.5. Após a clivagem com a protease TEV, a proteína His20607 livre da porção GST apresentou massa molecular de 8 kDa. Entretanto, as eluições após a clivagem estavam contaminadas pela presença de uma proteína de *E. coli*, provavelmente uma chaperona (Figura 15A). Foram realizadas lavagens com tampão contendo ATP que apresentaram eficiência parcial para a remoção da proteína contaminante de *E. coli* (Figura 15B).

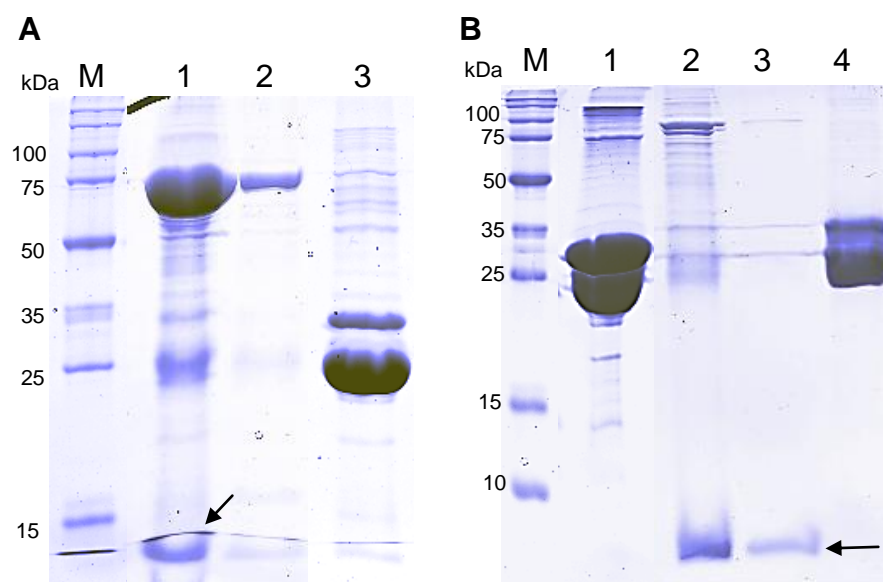


Figura 15: Purificação da proteína recombinante His20607. Em **A**, sem a utilização ATP: **M** - Marcador de massa molecular (kDa); **1** - 1ª eluição após clivagem com a protease TEV da proteína His20607 em fusão com a GST; **2** - 2ª eluição após clivagem com a protease TEV da proteína His20607 em fusão com a GST; **3** - Resina após as eluições. Em **B**, com a utilização de ATP. **M** - Marcador de massa molecular (kDa); **1** - Resina após lavagens com ATP; **2** - 1ª eluição após clivagem com a protease TEV da proteína His20607 em fusão com a GST; **3** - 2ª eluição após clivagem com a protease TEV da proteína His20607 em fusão com a GST; **4** - Resina após as eluições. A proteína His20607 livre da fusão com a GST (8 kDa) está indicada pela seta.

5.4.2. Purificação da proteína recombinante His9277

A proteína His9277 foi purificada por cromatografia de afinidade, conforme descrito no item 4.5. Após a clivagem com a protease TEV, a proteína His9277 livre da porção GST apresentou massa molecular de 14 kDa. Após ter sido clivada, a His9277 ficou retida na resina e, então, foi realizada a tentativa de eluir a proteína da resina com 0,1% Triton X-100. Entretanto, a proteína continuou aderida à resina (Figura 16).

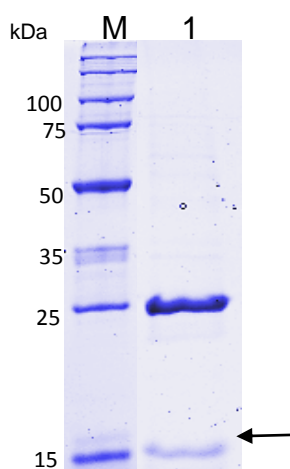


Figura 16: Purificação da proteína recombinante His9277. **M** - Marcador de massa molecular (kDa); **1** - Resina após as eluições. A proteína His9277 livre da fusão com a GST (14 kDa) está indicada pela seta.

5.4.3. Purificação da proteína recombinante SET metiltransferase

A proteína SET metiltransferase foi purificada por cromatografia de afinidade, conforme descrito no item 4.5. Após a clivagem com a protease TEV, a proteína SET metiltransferase livre da porção GST apresentou massa molecular de 17 kDa. Entretanto, as eluições após a clivagem estavam contaminadas pela presença da chaperonina de *E. coli* groEL (Figura 17A) identificada por espectrometria de massas (conforme item 4.6.). Então, antes da clivagem foram realizadas lavagens da resina com tampões contendo 5 mM ATP e 10 mM ATP. No primeiro teste realizado com 5 mM ATP, a chaperonina continuou em quantidade semelhante na resina (Figura 17B), e no segundo teste com 10 mM ATP, a chaperonina e a proteína SET metiltransferase em

fusão com a GST foram removidas juntamente da resina (Figura 17C). Os testes realizados com lavagens utilizando ATP não apresentaram sucesso para a remoção da chaperonina groEL de *E.coli*.

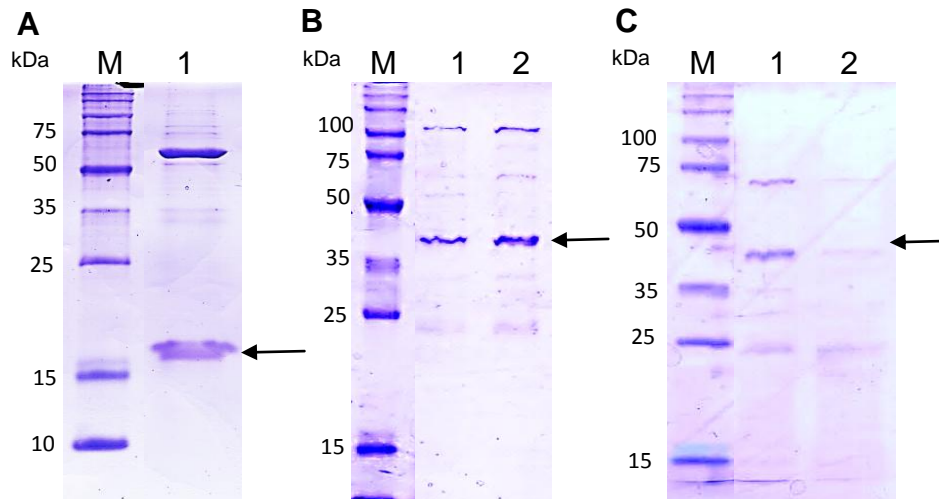


Figura 17: Purificação da proteína recombinante SET metiltransferase. Em **A**, purificação da proteína SET metiltransferase após clivagem: **M** - Marcador de massa molecular (kDa); **1** - Eluição. A proteína SET metiltransferase livre da fusão com GST (17 kDa) está indicada pela seta. Em **B**, purificação com a utilização de 5 mM ATP. **M** - Marcador de massa molecular (kDa); **1** - Resina antes da lavagem com 5 mM ATP; **2** - Resina após a lavagem com 5 mM ATP. A proteína SET metiltransferase em fusão com GST (41 kDa) está indicada pela seta. Em **C**, purificação com a utilização de 10 mM ATP. **M** - Marcador de massa molecular (kDa); **1** - Resina antes da lavagem com 10 mM ATP; **2** - Resina após a lavagem com 10 mM ATP. A proteína SET metiltransferase em fusão com GST (41 kDa) está indicada pela seta. A chaperonina groEL de *E. coli* apresenta massa molecular de 60 kDa.

6. Discussão

Neste trabalho, foram escolhidas as proteínas His20607, His9277 e SET metiltransferase para estudos experimentais. Foram realizadas buscas de sequências de peptídeo sinal, de sequências que indicassem secreção e de sequências que indicassem localização diferente da nuclear. Proteínas secretadas tipicamente possuem uma extensão amino-terminal, denominada de peptídeo sinal (BRIGGS *et al.*, 1986). As proteínas His9277, His20607 e SET metiltransferase apresentaram resultados positivos em um maior número de programas. Além disso, a proteína His9277 já foi encontrada presente no líquido hidático de *E. granulosus* por análises proteômicas (MONTEIRO *et al.*, 2010). A função histórica das proteínas histonas e de proteínas relacionadas à modificação de histonas é ligada a organização do DNA e a regulação na expressão gênica (FISCHLE *et al.*, 2003; FNU *et al.*, 2011). Entretanto, esses dados de predição podem evidenciar novas funções desempenhadas e a localização distinta da nuclear em outros compartimentos celulares do parasito. Logo, há evidências de que essas moléculas possam estar envolvidas em múltiplas funções biológicas.

As clonagens foram realizadas por recombinação homóloga *in vivo* devido à praticidade e eficiência da técnica (PARRISH *et al.*, 2004). A fim de aumentar a eficiência da clonagem, foram projetados iniciadores que inseriram 50 nucleotídeos homólogos ao vetor pGEX-TEV em cada extremidade das sequências-alvo e foi realizado um tratamento do vetor com a enzima SAP para remoção de grupamentos fosfato, impedindo a religação do DNA após a clivagem do vetor e aumentando a eficiência da clonagem (OLINER *et al.* 1993). Para as proteínas His20607 e SET metiltransferase as sequências clonadas correspondiam as sequências codificadoras das proteínas, excluindo-se a parte das sequências que codificavam peptídeo sinal. A sequência codificadora de peptídeo sinal foi retirada devido ao seu caráter hidrofóbico, que poderia acarretar na insolubilidade das proteínas recombinantes ao serem expressas em *E. coli*. A sequência correspondente ao peptídeo sinal possuía 28 aminoácidos para a proteína His20607 de 101 aminoácidos totais e 20 aminoácidos para a SET metiltransferase de 174 aminoácidos totais. Proteínas

secretadas tipicamente possuem uma sequência de peptídeo sinal, a qual é crucial para a eficiência do transporte da proteína através da membrana. Essas moléculas destinadas à rota de secreção geralmente são sintetizadas na sua forma precursora – com peptídeo sinal – e passam por uma série de etapas até a sua maturação: síntese, inserção na membrana do retículo endoplasmático, translocação, reconhecimento do peptídeo sinal e clivagem por uma peptidase de sinal para a obtenção no final da proteína madura (BRIGGS *et al.*, 1986).

O vetor pGEX-TEV foi escolhido para a clonagem das proteínas de interesse por ter um promotor forte (*tac*), que permite um elevado nível de transcrição da sequência clonada, e por possuir uma eficiente regulação para minimizar cargas metabólicas durante a multiplicação da célula hospedeira (WEICKERT *et al.*, 1996), assim como os demais vetores comerciais da série pGEX. Além disso, a expressão das proteínas de interesse em fusão com a proteína GST de *Schistosoma japonicum* (SMITH; JOHNSON, 1988) possibilita a sua purificação por cromatografia de afinidade a partir de extratos de *E. coli*. O vetor pGEX-TEV foi construído a partir da modificação do vetor pGEX-4T-1 com a inserção do sítio de clivagem para a protease TEV (VARGAS *et al.*, 2009). Isso viabilizou a liberação da proteína de interesse expressa em fusão com GST por clivagem com a protease TEV que é produzida em nosso laboratório, utilizando-se o vetor pRK508 que contém sua sequência codificadora clonada, o que reduz os custos da produção de proteínas recombinantes.

Na PCR primária, as sequências codificadoras das proteínas His20607 e SET metiltransferase foram amplificadas a partir de DNA genômico, visto que as sequências de seus genes não possuíam íntrons. A sequência codificadora da proteína His9277 foi amplificada a partir de cDNA, devido à presença de um íntron no gene, e por possuir sequência para poliadenilação foi possível a utilização de cDNA sintetizado com o iniciador *Oligo(DT)₁₈ primer*. O *Oligo(DT)₁₈ primer* é um iniciador com uma sequência de 18 timinas que se ancora a cauda de poli(A) de RNAs mensageiros, possibilitando a síntese de cDNA pela enzima transcriptase reversa. Ao contrário dos mRNA eucarióticos de metazoários, os RNAm de histonas não possuem cauda de poli(A) na UTR 3'. A extremidade 3' contém uma sequência autocomplementar que forma uma estrutura haste-alça, criando um sítio de ligação para o complexo proteico que

inclui a proteína de ligação haste-alça (SLBP) que estabiliza a extremidade 3' do mRNA de histona, impedindo a sua degradação. Contudo, em plantas, fungos, protozoários e leveduras, os mRNAs de histonas não são poliadenilados. Ainda, em plantas e metazoários os genes de histonas não possuem íntrons (OSLEY, 1991). Entretanto, há vários exemplos de exceções descritas, visto que já foram encontrados mRNA de histonas poliadenilados em aves (BRUSH *et al.*, 1985; CHALLONER, 1989), milho (CHAUBET, 1988), *Drosophila* e camundongo (DÁVILA LÓPEZ; SAMUELSSON, 2008), e em humanos há também a presença de mRNA de histonas poliadenilados e com íntrons (WELLS; KEDES, 1985; MANNIRONI, 1989). Há a hipótese de que a possivelmente a extremidade 3' encontrada em mRNA de histonas pertencente a metazoários tenha surgido ao final evolução após a divergência de animais e plantas (DOMINSKI, 1999).

As proteínas His20607 e SET metiltransferase não puderam ser purificadas devido à presença em suas eluições de proteínas contaminantes de *E. coli*. A proteína contaminante para a SET metiltransferase foi identificada por espectrometria de massas como a chaperonina groEL (HSP60) de *E. coli*. Foram realizados testes com lavagens de ATP na tentativa de remover a chaperona groEL de *E. coli* da associação com a proteína SET metiltransferase, uma vez que ATP é descrito como ligante alostérico da chaperonina GroEL. GroEL é um homo-oligômero formado por 14 subunidades dispostas em dois anéis, cada anel contém uma grande cavidade central que funciona como um compartimento de dobramento para cadeias polipeptídicas. Posteriormente, a liberação das proteínas nativas é controlada pela hidrólise de ATP (SHEENA *et al.*, 2006). No entanto, as lavagens com ATP não se mostraram eficientes para a remoção da proteína contaminante em associação com a proteína SET metiltransferase. Para a proteína His20607, a metodologia apresentou eficiência parcial, sendo que somente na segunda eluição foi possível a obtenção de uma fração com melhor grau de pureza da proteína. Isso acarreta em um baixo rendimento na produção da proteína recombinante. Ainda assim, há outras metodologias descritas como, por exemplo, lavagem da resina com a proteína de fusão ligada, utilizando um extrato de proteínas desnaturadas (RIAL, CECCARELLI; 2002) ou adição de proteínas desnaturadas ao lisado bacteriano antes da passagem pela resina de

cromatografia (ROHMAN; HARRISON-LAVOIE, 2000). O objetivo dessas estratégias é promover a competição entre proteínas desnaturadas e a proteína de estudo pela ligação a chaperoninas e chaperonas de *E. coli*.

Após a clivagem com a protease TEV, não foi possível purificar a proteína recombinante His9277, visto que ela se ligou com alta afinidade à resina *Glutathione-Sepharose 4B*. Foram feitas lavagens da resina utilizando o detergente Triton X-100, a fim de romper possíveis interações hidrofóbicas não específicas entre a resina e a proteína His9277, mas a proteína continuou aderida à resina. Assim, serão testadas outras metodologias para eluição da proteína recombinante clivada da resina: a clivagem da proteína recombinante em solução e, após, a passagem pela resina; utilização de um buffer de eluição com pH baixo (100 mM glicina, pH 2.5-3.0) e, após, adição de 1/10 volume de solução alcalina (1000 mM Tris-HCl, pH 8.5) para neutralização do pH; utilização de um tampão desnaturante (75 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 0,1% SDS, pH 7.4) (TEICHMANN, 2010). A utilização de um tampão desnaturante inviabiliza a utilização da proteína para ensaios funcionais, uma vez que essas abordagens exigem a conformação nativa da molécula.

7. Perspectivas

As proteínas recombinantes serão utilizadas para imunização de animais, a fim de produzir antissoros policlonais que serão utilizados em experimentos para a determinação do padrão de expressão espacial das proteínas nativas correspondentes em organelas celulares e em diferentes componentes do cisto hidático, por meio de experimentos de imunoblot e de imuno-histoquímica. Serão utilizadas amostras de líquido hidático (representativa de produtos de secreção/excreção), de camada germinativa (camada interna e proliferativa da parede do cisto) e de protoescólices (formas pré-adultas geradas a partir da camada germinativa). Além disso, também serão verificados os efeitos da exposição dessas proteínas em células do sistema imune quanto a viabilidade celular e secreção de citocinas. Essas técnicas permitirão entender melhor os locais e os mecanismos de atuação dessas proteínas no parasito e em suas células.

8. Referências Bibliográficas

ALBERINI, C. M. **Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity.** *Physiol Rev*, v. 89, n. 1, p. 121-45, Jan 2009. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19126756> >

ANAND, P. *et al.* **A novel role for lipid droplets in the organismal antibacterial response.** *Elife*, v. 1, p. e00003, 2012. ISSN 2050-084X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150794> >.

BALBINOTTI, H. *et al.* ***Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) loads in cattle from Southern Brazil.** *Vet Parasitol*, v. 188, n. 3-4, p. 255-60, Sep 2012. ISSN 1873-2550. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22571833> >.

BRIGGS, M. S. *et al.* **Conformations of signal peptides induced by lipids suggest initial steps in protein export.** *Science*, v. 233, n. 4760, p. 206-8, Jul 1986. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2941862> >.

BRUSH, D. *et al.* **Replacement variant histone genes contain intervening sequences.** *Mol Cell Biol*, v. 5, n. 6, p. 1307-17, Jun 1985. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2863747> >.

BUDKE, C. M.; DEPLAZES, P.; TORGERSON, P. R. **Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis.** *Emerg Infect Dis*, v. 12, n. 2, p. 296-303, Feb 2006. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16494758> >.

CARDONA, G. A.; CARMENA, D. **A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals.** *Vet Parasitol*, v. 192, n. 1-3, p. 10-32, Feb 2013. ISSN 1873-2550. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23084536> >.

CARRIÓN, J. *et al.* **Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Leishmania infantum* nucleosomal histones confers protection against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice.** *Microbes Infect*, v. 9, n. 6, p. 735-43, May 2007. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400015> >.

CARRIÓN, J. **Mechanisms of immunity to *Leishmania major* infection in mice: the contribution of DNA vaccines coding for two novel sets of histones (H2A-H2B or H3-H4).** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 34, n. 5, p. 381-6, Sep 2011. ISSN 1878-1667. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21840052> >.

CARRIÓN, J.; FOLGUEIRA, C.; ALONSO, C. **Transitory or long-lasting immunity to *Leishmania major* infection: the result of immunogenicity and multicomponent properties of histone DNA vaccines.** *Vaccine*, v. 26, n. 9, p.

1155-65, Feb 2008. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18255202> >.

CHALLONER, P. B.; MOSS, S. B.; GROUDINE, M. **Expression of replication-dependent histone genes in avian spermatids involves an alternate pathway of mRNA 3'-end formation.** Mol Cell Biol, v. 9, n. 3, p. 902-13, Mar 1989. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2471062> >.

CHAUBET, N. *et al.* **The histone H3 and H4 mRNAs are polyadenylated in maize.** Nucleic Acids Res, v. 16, n. 4, p. 1295-304, Feb 1988. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2831497> >.

CHOI, Y. S. *et al.* **Shot-gun proteomic analysis of mitochondrial D-loop DNA binding proteins: identification of mitochondrial histones.** Mol Biosyst, v. 7, n. 5, p. 1523-36, May 2011. ISSN 1742-2051. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21359316> >.

CRAIG, P. S. *et al.* **Prevention and control of cystic echinococcosis.** Lancet Infect Dis, v. 7, n. 6, p. 385-94, Jun 2007. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17521591> >.

DÁVILA LÓPEZ, M.; SAMUELSSON, T. **Early evolution of histone mRNA 3' end processing.** RNA, v. 14, n. 1, p. 1-10, Jan 2008. ISSN 1469-9001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17998288> >.

DILLON, S. C. *et al.* **The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases.** Genome Biol, v. 6, n. 8, p. 227, 2005. ISSN 1465-6914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16086857> >.

DOMINSKI, Z.; MARZLUFF, W. F. **Formation of the 3' end of histone mRNA.** Gene, v. 239, n. 1, p. 1-14, Oct 1999. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10571029> >.

ECKERT, J. *et al.* **WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern.** World Organisation for Animal Health (Office International des Epizooties) and World Health Organization, 2001. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/2001/929044522X.pdf>>

EL RIDI, R.; TALLIMA, H. **Schistosoma mansoni ex vivo lung-stage larvae excretory-secretory antigens as vaccine candidates against schistosomiasis.** Vaccine, v. 27, n. 5, p. 666-73, Jan 2009. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056448> >.

FISCHLE, W.; WANG, Y.; ALLIS, C. D. **Histone and chromatin cross-talk.** Curr Opin Cell Biol, v. 15, n. 2, p. 172-83, Apr 2003. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648673> >.

FNU, S. et al. Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 2, p. 540-5, Jan 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187428> >.

HARITON-GAZAL, E. et al. **Direct translocation of histone molecules across cell membranes.** J Cell Sci, v. 116, n. Pt 22, p. 4577-86, Nov 2003. ISSN 0021-9533. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576351> >.

KIM, H. S. et al. **Endotoxin-neutralizing antimicrobial proteins of the human placenta.** J Immunol, v. 168, n. 5, p. 2356-64, Mar 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11859126> >.

KORNBERG, R. D.; LORCH, Y. **Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome.** Cell, v. 98, n. 3, p. 285-94, Aug 1999. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458604> >.

LANOUILLE, S. et al. **The functional diversity of protein lysine methylation.** Mol Syst Biol, v. 10, p. 724, 2014. ISSN 1744-4292. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24714364> >.

LASCANO, E. F.; COLTORTI, E. A.; VARELA-DÍAZ, V. M. **Fine structure of the germinal membrane of *Echinococcus granulosus* cysts.** J Parasitol, v. 61, n. 5, p. 853-60, Oct 1975. ISSN 0022-3395. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1185424> >.

LEE, D. Y. et al. **Histone H4 is a major component of the antimicrobial action of human sebocytes.** J Invest Dermatol, v. 129, n. 10, p. 2489-96, Oct 2009. ISSN 1523-1747. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19536143> >.

MANNIRONI, C.; BONNER, W. M.; HATCH, C. L. **H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals.** Nucleic Acids Res, v. 17, n. 22, p. 9113-26, Nov 1989. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2587254> >.

MEDDEB-GARNAOUI, A. et al. **Cellular and humoral responses induced by *Leishmania* histone H2B and its divergent and conserved parts in cutaneous and visceral leishmaniasis patients, respectively.** Vaccine, v. 28, n. 7, p. 1881-6, Feb 2010. ISSN 1873-2518. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20005858> >.

MONTEIRO, K. M. et al. **Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host.** Proteomics, v. 10, n. 10, p. 1985-99, May 2010. ISSN 1615-9861. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20217864> >.

MORSETH, D. J. **Fine structure of the hydatid cyst and protoscolex of *Echinococcus granulosus***. J Parasitol, v. 53, n. 2, p. 312-25, Apr 1967. ISSN 0022-3395. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6067104> >.

OLINER, J. D.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. **In vivo cloning of PCR products in *E. coli***. Nucleic Acids Res, v. 21, n. 22, p. 5192-7, Nov 1993. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8255776> >.

OSLEY, M. A. **The regulation of histone synthesis in the cell cycle**. Annu Rev Biochem, v. 60, p. 827-61, 1991. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1883210> >.

PARRISH, J. R. *et al.* **High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in vivo recombination in *Escherichia coli***. J Proteome Res, v. 3, n. 3, p. 582-6, 2004 May-Jun 2004. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15253440> >.

RIAL, D. V.; CECCARELLI, E. A. **Removal of DnaK contamination during fusion protein purifications**. Protein Expr Purif, v. 25, n. 3, p. 503-7, Aug 2002. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12182832> >.

ROHMAN, M.; HARRISON-LAVOIE, K. J. **Separation of copurifying GroEL from glutathione-S-transferase fusion proteins**. Protein Expr Purif, v. 20, n. 1, p. 45-7, Oct 2000. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11035949> >.

SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York, Cold Spring Harbor, 2001, volume 3.

SIRACUSANO, A. *et al.* **Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: an evolving story**. Clin Dev Immunol, v. 2012, p. 639362, 2012. ISSN 1740-2530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22110535> >.

SIRACUSANO, A. *et al.* **Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection**. Exp Parasitol, v. 119, n. 4, p. 483-9, Aug 2008. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18329023> >.

SMITH, D. B.; JOHNSON, K. S. **Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase**. Gene, v. 67, n. 1, p. 31-40, Jul 1988. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3047011> >.

TEICHMANN, A. **Clonagem e expressão da proteína 14-3-3 epsilon 1 de *Echinococcus granulosus* em *Escherichia coli***. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em biologia celular e molecular, Porto Alegre, Outubro 2010. Disponível em: <

<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/30207/000772178.pdf?sequence=1> >.

TORGERSON, P. R. **Economic effects of echinococcosis.** Acta Trop, v. 85, n. 2, p. 113-8, Feb 2003. ISSN 0001-706X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12606088> >.

THOMPSON, R.C.A. **Biology and systematics of *Echinococcus*. In *Echinococcus* and hydatid disease.** CAB International, Wallingford, 1-50, 1995.

TSAI, I. J. et al. **The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism.** Nature, v. 496, n. 7443, p. 57-63, Apr 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23485966> >.

VARGAS, D. M. *et al.* **Characterization of 14-3-3 zeta 2 Isoform from *Echinococcus granulosus* Larval Stage.** In: XXXVIII Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq,, Aguas de Lindoia, 2009.

VIRGINIO, V. G. *et al.* **Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces.** Mol Biochem Parasitol, v. 183, n. 1, p. 15-22, May 2012. ISSN 1872-9428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22261090> >.

WEICKERT, M. J. *et al.* **Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*.** Curr Opin Biotechnol, v. 7, n. 5, p. 494-9, Oct 1996. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8939627> >.

WELLS, D.; KEDES, L. **Structure of a human histone cDNA: evidence that basally expressed histone genes have intervening sequences and encode polyadenylylated mRNAs.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 82, n. 9, p. 2834-8, May 1985. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2859593> >.

9. Apêndice

Tabela A1: Nome e código das 71 proteínas depositadas no genoma de *E. granulosus* e analisadas pelos programas de predição para presença de sequência de peptídeo sinal, de secreção e de localização celular.

Nome GeneDB	Código GeneDB
Centromere specific histone H3 CENP A	EgrG_000922800
Histone	EgrG_002016600
Histone acetyltransferase KAT2B	EgrG_000899900
Histone acetyltransferase KAT2B	EgrG_000900000
Histone acetyltransferase MYST2	EgrG_000633200
Histone acetyltransferase myst3	EgrG_001167700
Histone acetyltransferase myst4	EgrG_000171900
Histone acetyltransferase tip60	EgrG_001181900
Histone acetyltransferase type B catalytic	EgrG_000223500
Histone arginine methyltransferase CARMER	EgrG_000421400
Histone binding protein Caf1	EgrG_000611800
Histone chaperone asf1 b	EgrG_000439100
Histone cluster 1, H2bb	EgrG_000306200
Histone cluster H2AJ	EgrG_000209600
Histone deacetylase	EgrG_000527350
Histone deacetylase 1	EgrG_001102300
Histone deacetylase 3	EgrG_001114800
Histone deacetylase 6	EgrG_000970800
Histone deacetylase 6	EgrG_000970900
Histone deacetylase 6	EgrG_000971000
Histone deacetylase 7	EgrG_000831600
Histone deacetylase 8	EgrG_000103800
Histone deacetylase complex subunit sap18	EgrG_001123800
Histone deacetylase complex subunit sap18	EgrG_000660300
Histone H1 delta	EgrG_000906000
Histone H1 gamma protein	EgrG_000499300
Histone H1 gamma protein	EgrG_000499100
Histone H2A	EgrG_000927700

Histone H2A	EgrG_000472900
Histone H2A	EgrG_002051200
Histone H2A	EgrG_002051500
Histone H2A	EgrG_000338200
Histone H2A	EgrG_000472600
Histone H2A	EgrG_002060700
Histone H2A	EgrG_000650200
Histone H2A family member Y	EgrG_000688200
Histone H2B	EgrG_000322800
Histone H2B	EgrG_000323300
Histone H2B	EgrG_000472800
Histone H2B	EgrG_002051400
Histone H3	EgrG_000789400
Histone h3 methyltransferase	EgrG_000184700
Histone H4	EgrG_000128000
Histone H4	EgrG_000323100
Histone H4	EgrG_000748300
Histone H4 transcription factor	EgrG_000751500
Histone lysine methyltransferase setb	EgrG_001170100
Histone lysine N methyltransferase	EgrG_000362900
Histone lysine N methyltransferase Ez	EgrG_000439200
Histone lysine N methyltransferase H3 lysine 36	EgrG_000897900
Histone lysine N methyltransferase MLL3	EgrG_000101600
Histone lysine N methyltransferase MLL3	EgrG_000993000
Histone lysine N methyltransferase MLL3	EgrG_000899100
Histone lysine N methyltransferase MLL5	EgrG_000223900
Histone lysine N methyltransferase NSD3	EgrG_000011000
Histone lysine N methyltransferase NSD3	EgrG_000750900
Histone lysine n methyltransferase setb1	EgrG_001170200
Histone lysine N methyltransferase SETD2	EgrG_000452300
Histone lysine N methyltransferase SETD2	EgrG_000674500
Histone lysine n methyltransferase setd8	EgrG_001031500
Histone lysine N methyltransferase SETDB2	EgrG_002008500

Histone lysine N methyltransferase SETMAR	EgrG_001142300
Histone lysine n methyltransferase suv420h1	EgrG_000750400
Histone RNA hairpin binding protein	EgrG_000099900
Lysine specific histone demethylase 1A	EgrG_000095900
Lysine specific histone demethylase 1A	EgrG_000210300
Lysine specific histone demethylase 1B	EgrG_000656800
Myst histone acetyltransferase 1	EgrG_000898000
NHP2 non histone chromosome protein 2 1	EgrG_001075100
Set1:ash2 histone methyltransferase complex	EgrG_000489600
Sin3 histone deacetylase corepressor complex	EgrG_001016300
