

Comparação das interações proteína-proteína da enzima glicolítica enolase: análise *in silico* de interações evolutivamente conservadas e análise *in vitro* do parasito *Echinococcus granulosus*

Paludo, G. P.^a, Lorenzatto, K. R.^a, Bonatto, D.^b & Ferreira, H. B.^a

^aLaboratório de Genômica Estrutural e Funcional; ^bLaboratório de Radiobiologia Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS
*gabrielappaludo@gmail.com

Introdução

Enzimas glicolíticas, como a enolase, têm sido descritas como proteínas multifuncionais complexas, podendo desempenhar funções não glicolíticas, ditas *moonlighting*[1]. Porém, pouco se sabe sobre estas funções, especialmente em parasitos. Em *Echinococcus granulosus*, o agente causador da hidatidose cística, uma isoforma da enolase (EgEno1) está entre as proteínas intracelulares detectadas nos produtos de excreção/secreção e entre componentes de interface parasito-hospedeiro[2]. Estas localizações ectópicas são indicativas de que a EgEno1 poderia estar desempenhando funções *moonlighting*, tornando esta proteína um atraente alvo para estudos. Em uma etapa anterior deste projeto, nosso grupo projetou redes de interação proteína-proteína (IPP) para a enolase de 4 organismos eucariotos – *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Saccharomyces cerevisiae* – representativas deste domínio da vida, identificando interações e processos biológicos conservados em mais de uma rede de IPP, sugerindo que algumas interações da enolase são evolutivamente conservadas em eucariotos. Neste trabalho, os dados de IPPs evolutivamente conservadas da enolase de organismos-modelo foram comparados com dados de IPP *in vitro* da EgEno1.

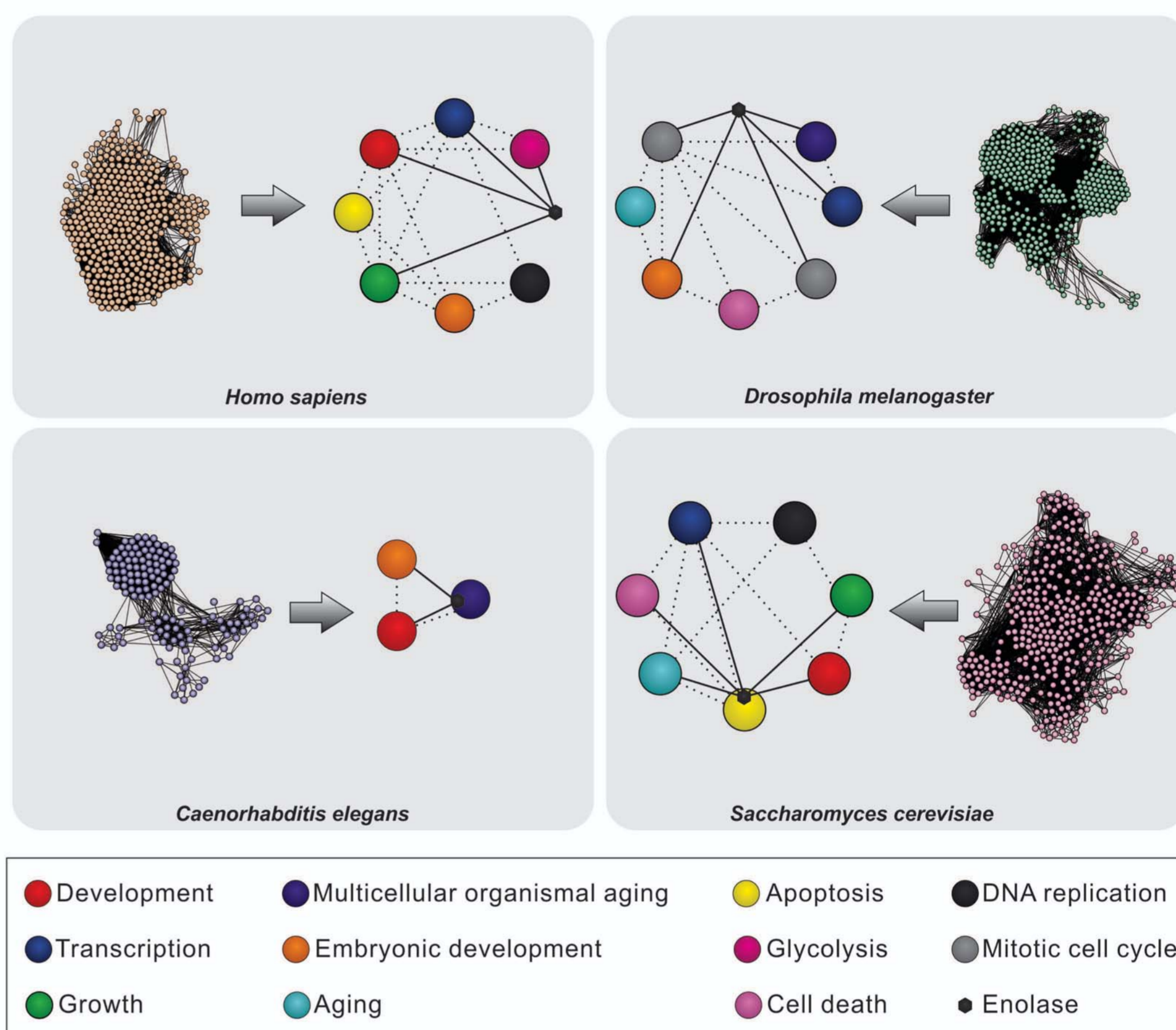


Figura 1. Comparação das redes de interação proteína-proteína das enolases de 4 eucariotos. As redes foram projetadas para *H. sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Saccharomyces cerevisiae* a partir de dados de interação proteína-proteína, clusters funcionais e suas interações com a enolase foram identificados por análises de modularidade e enriquecimento funcional.

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é investigar se a EgEno1 apresenta IPPs sugestivas de funções *moonlighting* conservadas para a enolase de eucariotos-modelo.

Objetivos específicos

- Identificação *in vitro* de proteínas de interação da EgEno1 em protoescólicas de *E. granulosus*;
- Comparação entre as proteínas de interação com as enolases utilizadas em experimento *in silico* com as proteínas de interação com a EgEno1.
- Comparação entre as funções anotadas das proteínas de interação das enolases de eucariotos com as de interação com a EgEno1.

Resultados

Nestes experimentos de *cross-linking*, 14 proteínas de proteoescólicas foram identificadas como interagentes da rEgEno1 (Tabela 1), duas das quais haviam sido preditas nas redes de PPI: fator de alongamento 1 α e transaldolase. A identificação das demais proteínas de interação com a rEgEno1, não preditas nas redes de IPP, sugere que estas interações ocorrem especificamente em *E. granulosus*. Estas proteínas podem estar relacionadas com funções *moonlighting* espécie-específica, podendo estar associadas a interações parasito-hospedeiro, e tornando-as proteínas interessantes para futuros experimentos de interação com a EgEno1.

As funções moleculares das proteínas de interação com a rEgEno1 foram recuperadas do Gene Ontology (GO). Este resultado mostrou que as proteínas de interação com a enolase do parasito não possuem as principais funções observadas nas redes de PPI, com exceção da proteína de choque térmico que está relacionada à resposta ao estresse.

Tabela 1. Proteínas de interação com a EgEno1 em protoescólicas

Proteína	Código*	GO**
Adenosil-homocisteinase	EgrG_000076900	Processo metabólico de carbono
Carbonil-redutase 1	EgrG_000113500	-
Fator de alongamento 1 α	EgrG_000982200	Tradução
Ndr	EgrG_001065500	-
Peróxido-redutase tioredoxina-dependente	EgrG_000913300	oxidação-redução
Proteína de choque térmico (membro HSP 3)	EgrG_000249600	resposta ao estresse
Proteína do complexo T	EgrG_000683800	enovelamento de proteínas
Transaldolase	EgrG_000092800	processo metabólico carboidrato
Catepsina D	EgrG_000970500	proteólise
Isocitrato-desidrogenase	EgrG_000344100	oxidação-redução
Malato-desidrogenase	EgrG_001185000	oxidação-redução
Profilina	EgrG_000122100	organização do citoesqueleto de actina
Aldeído-desidrogenase (membro A3 da família 1)	EgrG_000389100	oxidação-redução
Proteína de membrana basal (heparana sulfato)	EgrG_000575900	-

* Código das proteínas acessados no endereço <http://www.uniprot.org/>

** Ontologia do GO gerada através de anotação automática. Proteínas sem função determinada estão marcadas com um traço.

Metodologia

Neste trabalho foi realizada uma comparação dos dados de IPP evolutivamente conservados da enolase para com dados de IPP da EgEno1. As proteínas de IPP da EgEno1 foram identificadas através da realização de ensaios de *cross-linking* da proteína EgEno1 recombinante (rEgEno1), disponível em nosso laboratório, utilizando Sulfo-SBED. Assim, as proteínas do extrato proteico do parasito em sua fase pré-adulta que interagem com a rEgEno1, foram recuperadas e identificadas por espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS).

Perspectivas

Os resultados de interação *in vitro* para a EgEno1 são preliminares e novas estratégias de IPPs *in vitro* serão realizadas com o intuito de obter um panorama mais amplo das proteínas interagentes da EgEno1. Esta estratégia permitirá avaliar tanto a reprodutibilidade dos ensaios *in vitro* bem como explorar a presença de outras IPPs conservadas nos estudos *in silico*.

Referências

- [1] Sriram, Get al.(2005). Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes play? American journal of human genetics. 76: 911–924.
- [2] Lorenzatto, KRet al.(2012). Fructose-bisphosphate aldolase and enolase from *Echinococcus granulosus*: Genes, expression patterns and protein interactions of two potential moonlighting proteins. Gene. 506: 76-84.