

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Caracterização das proteínas 14-3-3 expressas na fase larval patogênica de
Echinococcus spp.**

Tese de doutorado

Aline Teichmann

Porto Alegre, abril de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Caracterização das proteínas 14-3-3 expressas na fase larval patogênica de
Echinococcus spp.**

Aline Teichmann

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira
Coorientadora: Dra. Karina Mariante Monteiro

Porto Alegre, abril de 2015

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional e no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia da UFRGS, sendo financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela dedicação, auxílio, incentivo e oportunidade para a realização deste trabalho.

À minha amiga e coorientadora Dra. Karina Mariante Monteiro pela amizade, incentivo, ensinamentos, discussões, conselhos e pelo apoio nas horas boas e ruins.

Ao Dr. Arnaldo Zaha pelo apoio, auxílio, e oportunidade de convívio e aprendizado em seu laboratório.

À colega Daiani Machado de Vargas, pela partição no projeto e auxílio na realização dos experimentos.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), pelo suporte técnico nas análises de espectrometria de massas.

Ao Uniprote-MS (CBIOT), pelo suporte nas análises de espectrometria de massas.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica das UFRGS (CME-UFRGS) pelo suporte nas análises de imunofluorescência.

A todos os colegas e amigos dos laboratórios 204, 206 e 210 pela amizade, apoio e colaboração nas dúvidas e discussões.

Aos novos e velhos amigos, pelo companheirismo e principalmente pelos momentos de descontração.

Aos meus sogros, Angela e Gilberto, pelo apoio, carinho e por sempre estarem comigo.

A toda minha família, por todo amor, apoio, incentivo, orações, dedicação e compreensão pela minha ausência.

Ao meu marido Juliano pelo amor, dedicação, incentivo, por ser meu grande companheiro e por sempre estar presente em todos os desafios da minha vida.

Índice

Agradecimentos	4
Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	6
Lista de figuras	7
Lista de tabelas	8
Resumo	9
Abstract	10
1. Introdução	11
1.1. Gênero <i>Echinococcus</i>	11
1.2. Distribuição e importância da hidatidose	14
1.3. Manifestações clínicas e diagnóstico da hidatidose	16
1.4. Interações parasito-hospedeiro	17
1.5. Proteínas 14-3-3.....	18
2. Justificativas e objetivos	23
3. Capítulo I - Caracterização de isoformas 14-3-3 expressas na fase larval patogênica do <i>Echinococcus granulosus</i>	25
4. Capítulo II – Análise das isoformas 14-3-3 das espécies de <i>E. multilocularis</i> e <i>E. ortleppi</i>	96
4.1 Materiais & Métodos.....	96
4.1.1 Análise das sequências de isoformas 14-3-3 de <i>E. multilocularis</i>	96
4.1.2 Imunoblots.....	96
4.2 Resultados	97
4.2.1 Análise estrutural <i>in silico</i> de genes e proteínas 14-3-3 de <i>E. multilocularis</i>	97
4.2.2 Análise da expressão de proteínas 14-3-3 em componentes de cistos hidáticos de <i>E. ortleppi</i>	101
5. Discussão, conclusões e perspectivas	102
6. Referências	111
Curriculum Vitae.....	119

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

cDNA: DNA complementar

CDS: sequência de DNA codificadora

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DNA: ácido dexoxirribonucleico

Eg14-3-3: proteína 14-3-3 de *Echinococcus granulosus*

Em14-3-3: proteína 14-3-3 de *Echinococcus multilocularis*

Eo14-3-3: proteína 14-3-3 de *Echinococcus ortleppi*

ES: excreção/secreção

GST: glutationa-S-transferase

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa: quilodalton(s)

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem

PCR: reação em cadeia da polimerase

PBS: salina tamponada com fosfato

pH: potencial hidrogeniônico

PSC: protoescólex

PVDF: fluoreto de polivinilideno

pb: pares de base

RNA: ácido ribonucleico

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

2D: bidimensional

3D: tridimensional

Lista de figuras

Figura 1: Ciclo de vida de <i>E. granulosus</i> s.l. e <i>E. multilocularis</i> :	12
Figura 2: Representação esquemática do metacestódeo de <i>E. granulosus</i> s.l. e <i>E. multilocularis</i>	13
Figura 3: Mapa mostrando a distribuição global do <i>Echinococcus granulosus</i> s.l.	15
Figura 4: Mapa mostrando a distribuição global do <i>Echinococcus multilocularis</i> .	16
Figura 5: Efeitos das proteínas 14-3-3 sobre suas proteínas-alvo	20
Figura 6: Representação das estruturas éxon-íntron das regiões codificadoras dos genes de 14-3-3 de <i>E. multilocularis</i> (Em14-3-3)	97
Figura 7: Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos preditas das proteínas 14-3-3 de <i>E. multilocularis</i> (Em14-3-3).....	98
Figura 8: Análise do padrão de expressão de proteínas 14-3-3 em componentes do metacestódeo de <i>E. ortleppi</i>	101

Lista de tabelas

Tabela 1: Estrutura e perfil de transcrição dos genes de 14-3-3 de <i>E. multilocularis</i> , e característica das proteínas preditas.	99
Tabela 2: Níveis de identidade/similaridade (%) entre as proteínas Eg14-3-3 e Em14-3-3.....	100

Resumo

A família de proteínas 14-3-3 as quais desempenham funções reguladoras conservadas foi estudada em parasitos do gênero *Echinococcus*, agentes causadores de diferentes formas de hidatidose. Nos genomas de *Echinococcus granulosus* e de *Echinococcus multilocularis* seis isoformas foram encontradas (*Eg14-3-3.1-6* e *Em14-3-3.1-6*, respectivamente) com sequências e estruturas conservadas entre ortólogos. As estruturas gene/proteína de 14-3-3 de *E. granulosus* e de *E. multilocularis* foram analisadas e as relações filogenéticas com proteínas ortólogas foram estabelecidas para uma ampla gama de espécies. As quatro sequências de 14-3-3 expressas no metacestódeo de *E. granulosus* (*Eg14-3-3.1-4*) foram clonadas e as proteínas recombinantes foram expressas e purificadas. A avaliação do padrão de expressão demonstrou a presença destas proteínas em diferentes componentes do metacestódeo de *E. granulosus*, incluindo componentes da interface parasito-hospedeiro. Os papéis desempenhados por proteínas *Eg14-3-3* na biologia do parasito foram inferidos a partir dos repertórios de proteínas que interagem com cada isoforma recombinante, sendo avaliados por *gel overlay*, *cross linking*, ensaio de cromatografia de afinidade e posteriormente identificadas por espectrometria de massa. Um total de 95 proteínas de interação com as proteínas *Eg14-3-3* foi identificado. As isoformas *Eg14-3-3* apresentaram ligantes compartilhados (44 proteínas), indicando sobreposição de algumas funções, mas elas também se ligam a parceiros exclusivos (51 proteínas), o que sugere uma especialização funcional das *Eg14-3-3.1-4*. Esses repertórios de ligantes indicam o envolvimento das proteínas *Eg14-3-3* em várias vias bioquímicas no metacestódeo de *E. granulosus*. Neste estudo foi possível caracterizar as proteínas 14-3-3 de *Echinococcus* spp. e evidenciar os possíveis papéis que estas proteínas podem desempenhar no metacestódeo, sugerindo sua participação em mecanismos moleculares relacionados à sobrevivência e ao desenvolvimento do cisto hidático no hospedeiro intermediário.

Abstract

The 14-3-3 family, formed by conserved regulatory proteins, was studied in *Echinococcus* spp. parasites, the causative agents of different forms of hydatid disease. The genomes of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* code each for six 14-3-3 isoforms (Eg14-3-3.1-6 and Em14-3-3.1-6, respectively) with conserved sequences and structures between orthologues. *E. granulosus* and *E. multilocularis* 14-3-3 gene/protein structures were analyzed and their phylogenetic relationships were established with ortholog proteins from a wide range of eukaryotic species. The four 14-3-3 coding sequences expressed in *E. granulosus* metacestode (Eg14-3-3.1-4) were cloned and the corresponding recombinant proteins were expressed and purified. The evaluation of the expression pattern of Eg14-3-3.1-4 demonstrated the presence of these proteins in different components of *E. granulosus* metacestode, including interface components with the host. The roles played by Eg14-3-3 proteins in parasite biology were inferred from the repertoires of interacting proteins with each recombinant isoform, assessed by gel overlay, cross linking, affinity chromatography assays and identified by mass spectrometry. A total of 95 Eg14-3-3 protein ligands was identified. Eg14-3-3 isoforms have shared partners (44 proteins), indicating some overlapping functions, but they also bind exclusive partners (51 proteins), suggesting Eg14-3-3 functional specialization. These ligand repertoires indicate the involvement of Eg14-3-3 proteins in multiple biochemical pathways in the *E. granulosus* metacestode. It was possible to characterize the proteins 14-3-3 of *Echinococcus* spp. and evidence the possible roles played by these proteins in the metacestode, suggesting their participation in molecular mechanisms related to the survival and development of the hydatid cyst in the intermediate host.

1. Introdução

1.1. Gênero *Echinococcus*

Os helmintos do gênero *Echinococcus* pertencem à família Taeniidae da classe Cestoda, filo Platyhelminthes. Entre as espécies do gênero, as que apresentam maior relevância epidemiológica, devido a sua ampla distribuição geográfica e seu impacto em saúde pública e econômica, são o *Echinococcus granulosus* sensu lato (s.l.) e o *Echinococcus multilocularis*, causadoras da hidatidose cística e da hidatidose alveolar respectivamente (Jenkins *et al.*, 2005). O *Echinococcus granulosus* s.l. é um complexo de espécies que inclui *Echinococcus granulosus* sensu stricto (s.s.), aqui referido como *Echinococcus granulosus*, e o *Echinococcus ortleppi* (Balbinotti *et al.*, 2012), sendo que essas duas espécies são endêmicas no sul do Brasil.

O *E. granulosus* s.l. e o *E. multilocularis* são endoparasitos de ciclos vitais heteroxenos (Figura 1). Carnívoros (canídeos ou felídeos) são os hospedeiros definitivos e herbívoros ou onívoros são os hospedeiros intermediários (Nakao *et al.*, 2013). O *E. granulosus* s.l. têm os canídeos como hospedeiros definitivos e os ungulados domésticos como hospedeiros intermediários. O *E. multilocularis* geralmente possui raposas como hospedeiros definitivos e roedores selvagens como hospedeiros intermediários. O homem é também hospedeiro intermediário acidental para ambas as espécies.

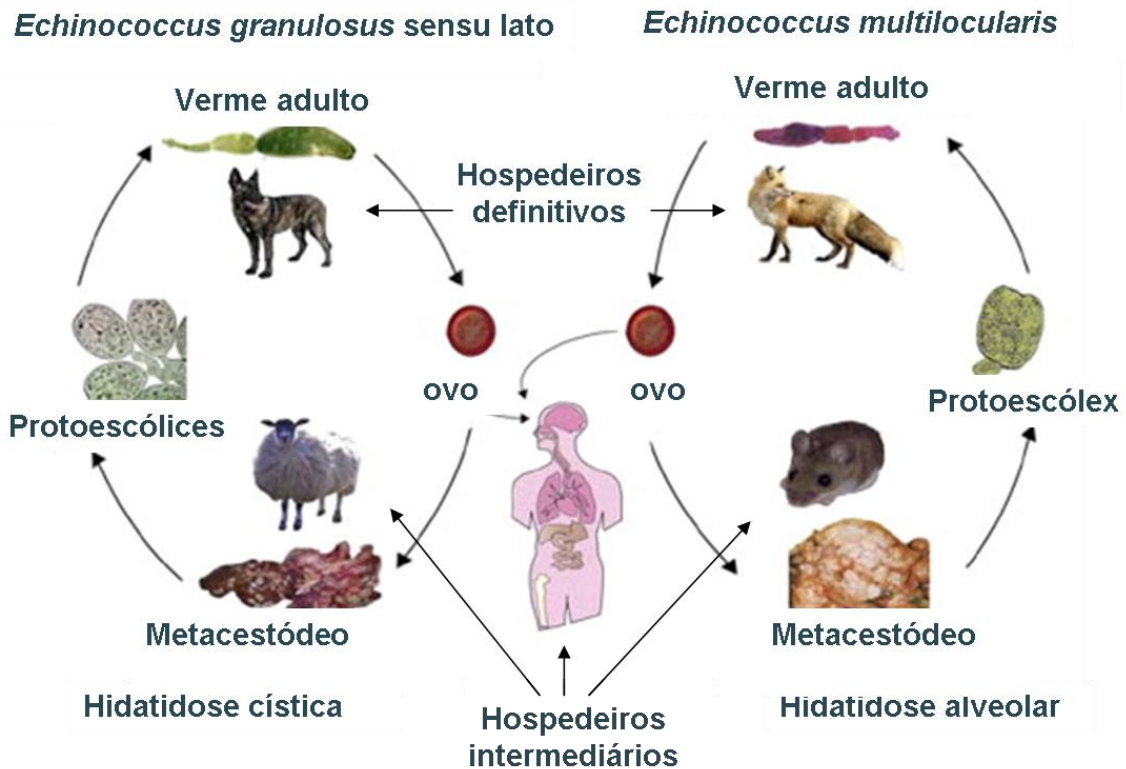


Figura 1: Ciclo de vida de *E. granulosus* s.l. e *E. multilocularis*: os hospedeiros intermediários infectam-se com o parasito quando ingerem acidentalmente seus ovos, que são liberados no ambiente pelo verme adulto juntamente com as fezes dos hospedeiros definitivos. Após serem ingeridos pelos hospedeiros intermediários, os ovos eclodem no intestino delgado liberando a oncosfera, que penetra na parede do intestino e é transportada através do sistema circulatório ou linfático para diferentes órgãos, onde se desenvolve no metacéstódeo (cistos ou vesículas). Os pré-adultos (protoescólices) originam-se a partir da membrana interna do metacéstódeo e quando ingeridos por um hospedeiro definitivo juntamente com vísceras infectadas têm a capacidade de se diferenciarem em vermes adultos, fechando o ciclo de vida. Modificado de Moro & Schantz (2009).

Os metacéstódeos de *E. granulosus* s.l. e *E. multilocularis* são cistos e vesículas, respectivamente, delimitados por uma parede composta por duas camadas, uma camada interna, a camada germinativa, responsável pela proliferação assexual do parasito e pela síntese de uma camada externa acelular e de espessura variável, a camada laminar (Díaz *et al.*, 2011). A camada germinativa é formada por diferentes tipos celulares, incluindo células musculares, armazenadoras de glicogênio e células indiferenciadas. A parte mais externa da camada germinativa é o tegumento, consistindo de um sincício citoplasmático do qual se projetam microtríquias que penetram na camada laminar. A camada laminar é uma matriz extracelular sintetizada e secretada pela camada

germinativa, tendo como principal componente uma trama de fibrilas ricas em carboidratos, constituídas predominantemente de glicoproteínas do tipo mucina.

O metacéstódeo é preenchido internamente pelo líquido hidático, que contém uma mistura de moléculas do parasito e do hospedeiro. Os protoescólices se originam da camada germinativa, sendo infectivos para os hospedeiros definitivos (Díaz *et al.*, 2011). Os metacéstódeos de *E. granulosus* s.l. e *E. multilocularis* apresentam morfologia e desenvolvimento bastante distintos (Jenkins *et al.*, 2005, Moro & Schantz 2009) (Figura 2). O metacéstódeo de *E. granulosus* s.l. se desenvolve como um cisto hidático unilocular, que apresenta um crescimento lento e cujo desenvolvimento é acompanhado pela formação de uma camada adventícia circundante produzida pelo hospedeiro. Já o metacéstódeo de *E. multilocularis* é multivesicularizado (formado por várias pequenas vesículas interconectadas) e exibe uma proliferação infiltrativa no órgão afetado e sem a formação de barreiras limitantes de tecido do hospedeiro (Díaz *et al.*, 2011). Ao longo da infecção, o metacéstódeo cresce ocasionando lesões císticas crônicas que podem persistir muitos anos, causando sintomas variados, dependendo de seu tamanho e localização (Díaz *et al.*, 2011).

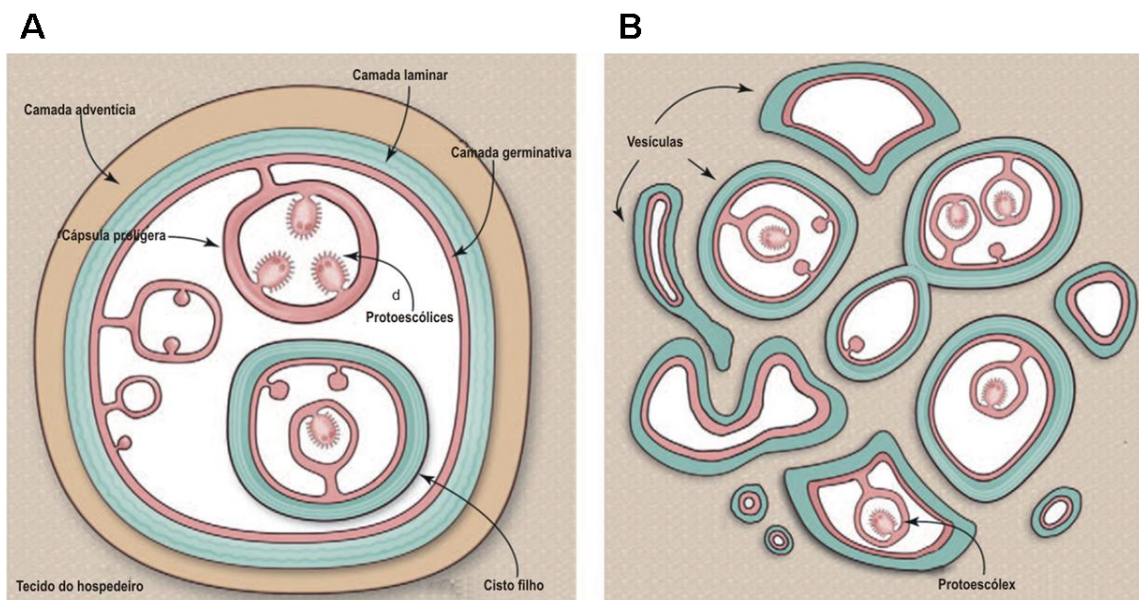


Figura 2: Representação esquemática do metacéstódeo de *E. granulosus* s.l. e *E. multilocularis*. A: *E. granulosus* s.l. - o metacéstódeo é uma estrutura unilocular delimitada pela camada adventícia constituída por tecido conjuntivo do hospedeiro. Cistos-filhos com sua própria parede ocasionalmente formam-se dentro de cistos maiores. B: *E. multilocularis* - o metacéstódeo é formado por várias pequenas vesículas e não é delimitado externamente pela camada adventícia. Modificado de Díaz *et al.*, (2011).

1.2. Distribuição e importância da hidatidose

A hidatidose cística tem uma distribuição mundial (Figura 3) com caráter endêmico ou hiperendêmico no Cone Sul (incluindo o sul do Brasil) e na região andina (de la Rue 2008, Gavidia *et al.*, 2008, Moro *et al.*, 2008). O Rio Grande do Sul é considerado uma zona altamente endêmica da hidatidose cística, especialmente nos municípios que fazem fronteira com o Uruguai e a Argentina. A alta incidência da doença nestas regiões é resultado da pecuária, atividade econômica expressiva nestes municípios, com a criação de bovinos e ovinos. Dados do Departamento de Defesa Sanitária Animal do Rio Grande do Sul relataram que a hidatidose cística em bovinos se manteve estável em 10% entre os animais abatidos no período 2005 a 2010, e dados da Secretaria de Agricultura do Estado relataram que dos 32.203 animais abatidos em janeiro de 2011, 18% estava infectados com *E. granulosus* s.l. (Balbinotti *et al.*, 2012).

A hidatidose cística apresenta considerável impacto tanto para a agricultura como para a saúde pública, causando importantes consequências sócio-econômicas em áreas endêmicas (Budke *et al.*, 2006). No mundo, a doença acarreta perdas estimadas em 1 milhão de DALYs (*disability adjusted life years*) devido a sua morbidade e prejuízos anuais da ordem de US\$ 764 milhões em gastos no tratamento de pacientes humanos. Já as perdas associadas à redução na produção pecuária somam mais de US\$ 2 bilhões em todo o mundo (Budke *et al.*, 2006, Battelli 2009).

Devido à presença do verme adulto no hospedeiro definitivo ser assintomática (Thompson *et al.*, 1995), o significado clínico e econômico de *E. granulosus* s.l. é quase completamente restrito à infecção com o metacestódeo. Como a hidatidose cística afeta tanto animais como o homem, ela apresenta considerável impacto tanto para a agricultura como para a saúde pública, relacionados ao tratamento médico ou cirúrgico de pacientes humanos. A hidatidose cística, apesar de não estar associada a altos índices de mortalidade (1-2%), provoca também prejuízos econômicos indiretos em função da sua morbidade, a qual acarreta na diminuição da produtividade do indivíduo (Torgerson & Budke 2003). A infecção do gado resulta em perdas econômicas

associadas a produção animal devido a condenação das vísceras infectadas, diminuição da produção e qualidade de carne, leite e lã, redução da taxa de natalidade e fecundidade e retardo no crescimento dos animais (Torgerson 2003).

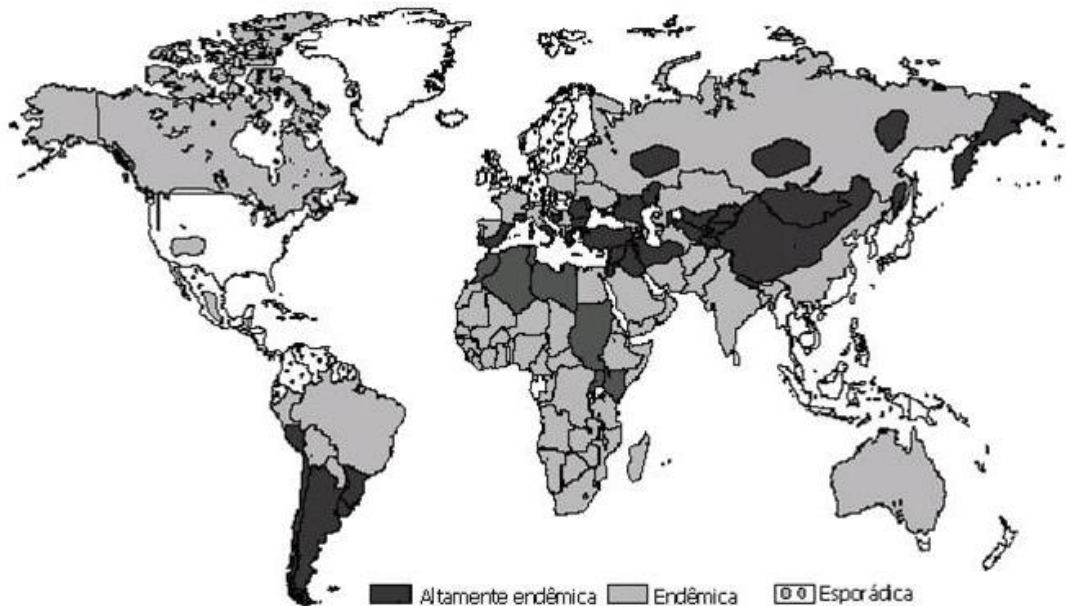


Figura 3: Mapa mostrando a distribuição global do *Echinococcus granulosus* s.l. O Rio Grande do Sul é considerado uma zona altamente endêmica. Modificado de Budke *et al.*, (2006).

A hidatidose alveolar, causada pelo *E. multilocularis*, por sua vez, é uma doença restrita ao hemisfério norte, sendo endêmica em alguns países e esporádica em outros locais, incluindo a América do Norte e a Europa (Kern 2010) (Figura 4). Estimativas recentes indicam que há em torno de 20.000 novos casos anuais de hidatidose alveolar no mundo, sendo 91% deles na China (Kern 2010, Torgerson *et al.*, 2010). As estimativas globais de prejuízos na saúde pública humana decorrentes da hidatidose alveolar são de aproximadamente 670.000 DALYs por ano (Torgerson *et al.*, 2010).



Figura 4: Mapa mostrando a distribuição global do *Echinococcus multilocularis*. A distribuição do parasito encontra-se restrita ao hemisfério norte. Modificado de Torgenson *et al.*, (2010).

1.3. Manifestações clínicas e diagnóstico da hidatidose

Na hidatidose cística humana, as manifestações clínicas resultam do crescimento de uma massa cística. Os sintomas são decorrentes de uma lesão invasiva, que compromete a função do órgão afetado e causa compressão em órgãos e tecidos vizinhos. Estes sintomas dependem, fundamentalmente, da localização e tamanho do cisto. Como o cisto hidático possui crescimento lento e localização variável, a doença apresenta sintomas tardios e inespecíficos (McManus *et al.*, 2003, McManus *et al.*, 2012). Normalmente, o hospedeiro não desenvolve sintomas clínicos até que o cisto apresente pelo menos 10 cm de diâmetro (Eckert & Deplazes 2004). Reações de hipersensibilidade podem ocorrer com o rompimento eventual do cisto, com a subsequente liberação do seu conteúdo, podendo precipitar uma reação anafilática, que pode variar em severidade desde uma simples urticária até um choque fatal (McManus *et al.*, 2003).

Na hidatidose alveolar humana, a fase latente geralmente é mais longa (até 15 anos) antes do início da doença crônica (McManus *et al.*, 2012). Normalmente, *E. multilocularis* se desenvolve no lobo direito do fígado do hospedeiro e as

lesões podem variar de poucos milímetros até 15-20 cm de diâmetro em áreas de infiltração. Os sintomas geralmente incluem dor epigástrica ou icterícia.

A inespecificidade dos sintomas e a baixa sensibilidade dos métodos físicos disponíveis para a detecção dos cistos e vesículas, incluindo radiologia, ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética, torna complicado o diagnóstico clínico da hidatidose humana visto que esses métodos encontram dificuldades para a detecção de pequenos cistos ou vesículas (McManus *et al.*, 2012). A sorologia é um auxiliar no diagnóstico e também pode ser usada para monitorar pacientes após a cirurgia ou tratamento medicamentoso. A caracterização limitada do repertório antigênico do parasito limita o desenvolvimento de vacinas, embora algumas proteínas com potencial para utilização em vacinação contra a hidatidose cística ou contra a hidatidose alveolar já tenham sido identificadas (Gottstein 2005, Gottstein *et al.*, 2006, Lightowlers 2006).

1.4. Interações parasito-hospedeiro

Diferentes mecanismos moleculares de interação com o hospedeiro são utilizados pelos helmintos no estabelecimento de infecções crônicas, como no caso de infecções com as fases larvais patogênicas de parasitos do gênero *Echinococcus*. Estes mecanismos são importantes para a nutrição, o metabolismo e o desenvolvimento destes parasitos e também para evasão da resposta imune do hospedeiro (Brindley *et al.*, 2009) e são mediados principalmente por proteínas presentes na superfície tegumentar e nos produtos de ES dos parasitos (Van Hellemond *et al.*, 2006, Hewitson *et al.*, 2009). No caso de *Echinococcus* a camada laminar também é um elemento essencial para a relação parasito-hospedeiro, sendo que esta desempenha papéis que incluem a proteção do parasito ao ataque das células do sistema imunológico do hospedeiro e o provável estabelecimento da regulação da inflamação local (Diaz *et al.*, 2015).

A biologia molecular de espécies do gênero *Echinococcus* e de suas interações com espécies hospedeiras ainda é pouco conhecida. Sabe-se que as proteínas excretadas/secretadas pelo parasito são capazes de interagir com o sistema imune do hospedeiro, de forma a estimular e/ou modular a resposta

imune (Siracusano *et al.*, 2008). Nas últimas décadas ocorreram maiores avanços em estudos biológicos de *E. granulosus* e *E. multilocularis* nas áreas de genômica, transcritômica e proteômica, os quais têm viabilizado a caracterização de genes expressos pelas fases larvais patogênicas desses parasitos (Fernández *et al.*, 2002, Monteiro *et al.*, 2010, Aziz *et al.*, 2011, Parkinson *et al.*, 2012, Virginio *et al.*, 2012, Tsai *et al.*, 2013, Zheng *et al.*, 2013).

Apesar da grande disponibilidade de dados moleculares, os mecanismos moleculares associados ao estabelecimento e manutenção do metacéstódeo de *Echinococcus* spp. nas vísceras do hospedeiro intermediário ainda não estão totalmente elucidados. A fim de melhor compreender aspectos básicos da biologia de *E. granulosus*, a identificação de proteínas expressas na fase larval patogênica do parasito vem sendo realizada, incluindo análises proteômicas dos principais componentes do cisto hidático de *E. granulosus* (camada germinativa, protoescólices e líquido hidático) (Monteiro *et al.*, 2010, Aziz *et al.*, 2011) e de produtos de ES de protoescólices em cultura (Virginio *et al.*, 2012). Essas abordagens revelaram novos alvos interessantes de estudo, como as proteínas 14-3-3, que ocorrem na interface parasito-hospedeiro, sendo assim potencialmente envolvidas nas estratégias de desenvolvimento e sobrevivência do metacéstódeo no hospedeiro intermediário. A importância da 14-3-3 também está relacionada com a sua participação em diversos processos fisiológicos, tais como proliferação celular, tráfego de proteínas, rearranjo do citoesqueleto e sobrevivência (Morrison 2009, Yasmin *et al.*, 2010).

1.5. Proteínas 14-3-3

As proteínas 14-3-3 constituem uma família altamente conservada de moléculas reguladoras eucarióticas (Dougherty & Morrison 2004, Mhaweche 2005, Yasmin *et al.*, 2010). São proteínas ácidas, de massa molecular de aproximadamente 30 kDa. Estruturalmente, essas proteínas possuem nove α -hélices antiparalelas e podem formar homo e /ou heterodímeros (Fu *et al.*, 2000). A variabilidade máxima das sequências de aminoácidos de proteínas 14-3-3 ocorre na extremidade C-terminal, que se apresenta como uma região desorganizada nas análises estruturais disponíveis, sendo sugerido que essa

região atua na inibição de interações proteína-proteína de uma maneira específica (Obsil & Obsilova 2011).

Proteínas 14-3-3 foram identificadas em todos os organismos eucarióticos até o momento estudados (Obsil & Obsilova 2011). O número de isoformas identificadas apresenta grande variação, conforme a espécie (Bridges & Moorhead 2005). Em *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*, apenas duas diferentes isoformas foram identificadas; seres humanos apresentam sete isoformas; e em *Arabidopsis* spp. foram identificadas doze isoformas de proteínas 14-3-3. O alto grau de conservação e a natureza ubíqua das proteínas 14-3-3 refletem sua importância na biologia dos organismos eucarióticos, o que já foi evidenciado por diversos estudos. Em células eucarióticas, as proteínas 14-3-3 são encontradas principalmente no citoplasma, mas também já foram identificadas na membrana plasmática e em organelas intracelulares, como o núcleo e o aparelho de Golgi (Fu *et al.*, 2000).

Em diferentes organismos já foi demonstrado que as proteínas 14-3-3 são capazes de interagir com mais de 300 proteínas-alvo distintas incluindo diferentes repertórios de ligantes (Pozuelo Rubio *et al.*, 2004, Kjarland *et al.*, 2006, Lalle *et al.*, 2012). As proteínas 14-3-3 foram as primeiras moléculas identificadas que se ligavam especificamente a motivos com resíduos de fosfoserina e fosfotreonina (Obsil & Obsilova 2011), sendo esses motivos definidos como RSXpSXP e RXXXpSXP (onde R = Arginina; S = Serina; X = qualquer aminoácido; pS = fosfoserina; e P = prolina; a fosfotreonina – pT – pode substituir a pS). Há, contudo, vários casos descritos de proteínas-alvo não-fosforiladas. As atividades das proteínas 14-3-3 sobre seus alvos específicos podem ser exercidas por indução de mudanças conformacionais, por oclusão física de estruturas proteicas ou através da estruturação de um arcabouço proteico (*scaffolding*) (Bridges & Moorhead 2005) (Figura 5).

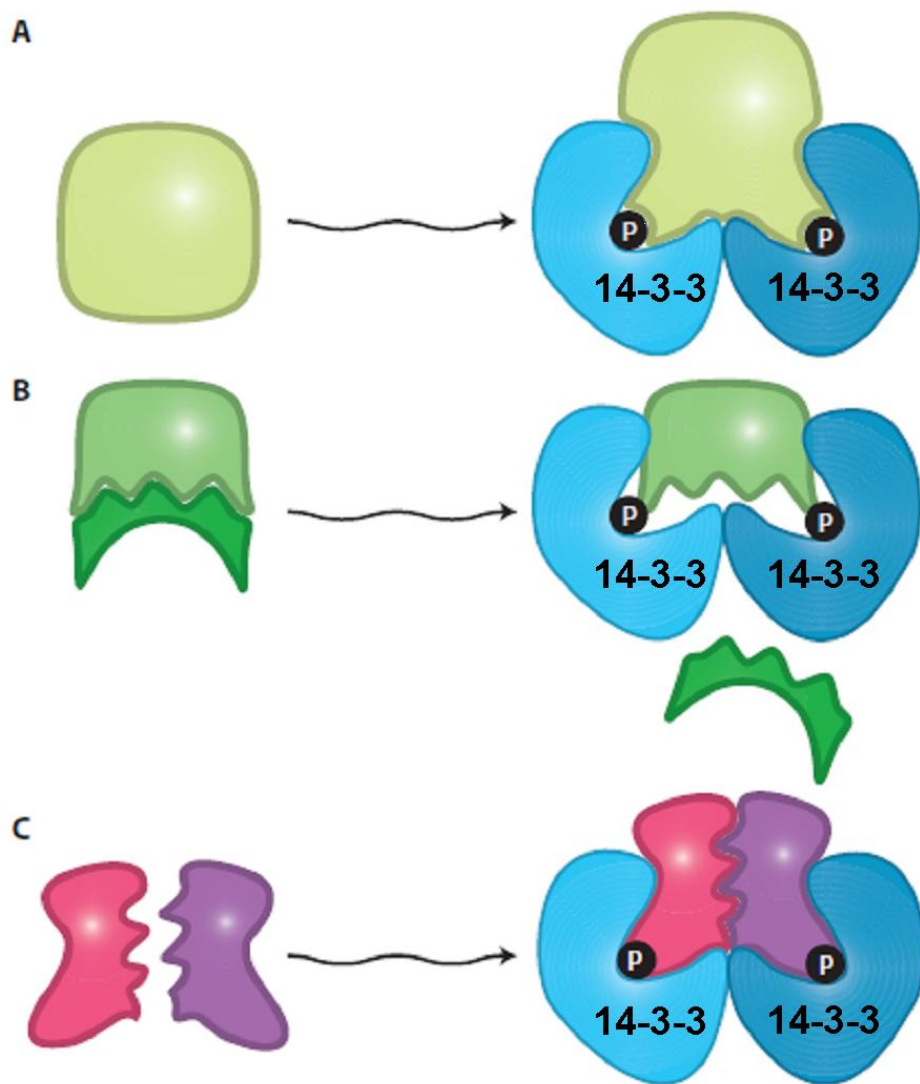


Figura 5: Efeitos das proteínas 14-3-3 sobre suas proteínas-alvo. (A) Mudança conformacional na proteína-alvo; (B) oclusão física de uma proteína ou de uma região que interage com outra proteína; (C) estabilização de um complexo proteico. Cada monômero de da proteína 14-3-3 é apresentado em diferentes tons de azul. Modificado de Bridges & Moorhead (2005).

Através de interações com um amplo repertório de proteínas-alvo e em diferentes contextos celulares, as proteínas 14-3-3 desempenham um papel central em rotas de sinalização eucarióticas (Darling *et al.*, 2005, Morrison 2009, Yasmin *et al.*, 2010, Gardino & Yaffe 2011, Kleppe *et al.*, 2011). Elas podem regular funções biológicas complexas, como o controle do ciclo celular, a apoptose, a organização do citoesqueleto, a resistência ao estresse, a proliferação e a diferenciação celular e o desenvolvimento.

Entre os ligantes proteicos de proteínas 14-3-3 identificados estão muitas enzimas envolvidas no metabolismo primário, além de moléculas sinalizadoras, fatores de transcrição e proteínas de citoesqueleto (Schoonheim *et al.*, 2007). É estimado que haja aproximadamente 25% de sobreposição entre os interatomos de 14-3-3 identificados nos diferentes estudos para diferentes organismos (Bridges & Moorhead 2005). Possivelmente, essa variação seja decorrente do material biológico bem como da isoforma específica estudada, o que dificulta comparar esses resultados.

As proteínas 14-3-3 podem apresentar tanto redundância como complementaridade funcional. Em organismos com mais de uma isoforma de 14-3-3, a perda de uma delas por deleção gênica pode ser tolerada, o que indica certo grau de redundância funcional, mas a deleção de todos os genes de 14-3-3, testada experimentalmente em leveduras, é letal (Gelperin *et al.*, 1995).

Com a disponibilidade de mais estudos e o uso de refinados métodos de análise se espera que funções isoforma-específicas sejam descobertas (Kleppe *et al.*, 2011). As diferenças espaciais e temporais no padrão de expressão dos genes de 14-3-3 durante o desenvolvimento de plantas e animais sugerem que pode haver papéis específicos para cada isoforma durante os diferentes estágios do desenvolvimento (Siles-Lucas & Gottstein 2003). A especificidade funcional das isoformas de 14-3-3 pode ser resultado da expressão de genes específicos ou de regulação por um ou mais ligantes isoforma-específico (Gardino *et al.*, 2006, Acevedo *et al.*, 2007).

Entre os organismos com modo de vida parasitário, as proteínas 14-3-3 também já foram identificadas. Entre os helmintos, as proteínas 14-3-3 de *Taenia solium* foram detectadas na superfície de oncosferas, o que pode evidenciar a participação destas proteínas nos mecanismos de penetração do intestino durante os primeiros passos da infecção (Santivañez *et al.*, 2010). As proteínas 14-3-3 foram reconhecidas por soros de pacientes com neurocisticercose, sugerindo seu potencial diagnóstico e vacinal (Salazar-Anton & Lindh 2011). Espécies dos gêneros *Schistosoma* e *Echinococcus* também tiveram as proteínas 14-3-3 estudadas, sendo que diversos trabalhos sugerem que essas proteínas poderiam

desempenhar algumas funções mais especializadas no contexto do contato íntimo e de longa duração entre parasito e hospedeiro (Siles-Lucas & Gottstein 2003).

Em *E. granulosus* s.l. e *E. multilocularis*, há evidências experimentais preliminares do envolvimento das proteínas 14-3-3 com processos potencialmente relevantes para o estabelecimento e desenvolvimento do parasito (Siles-Lucas & Gottstein 2003, Andrade *et al.*, 2004, Siles-Lucas *et al.*, 2008). Por exemplo, análises comparativas dos níveis de expressão dessas proteínas no metacestódeo de *E. granulosus* s.l. e *E. multilocularis*, demonstraram que as 14-3-3 são expressas em níveis relativamente mais elevados na camada germinativa de *E. multilocularis*, sugerindo o seu envolvimento na proliferação do tipo tumoral dos cistos de *E. multilocularis* (Siles-Lucas *et al.*, 1998, Siles-Lucas *et al.*, 2001). Também foi observado que uma 14-3-3 de *E. granulosus* s.l. é produzida na glândula rostellar do adulto, sugerindo seu envolvimento em processos secretórios associados à fixação do parasito no intestino delgado do hospedeiro definitivo (Siles-Lucas *et al.*, 2000).

Há evidências cumulativas em *E. multilocularis* de que proteínas 14-3-3 são antígenos com potencial diagnóstico e vacinal bem como proteínas com potencial imunomodulador. Camundongos vacinados com uma proteína 14-3-3 recombinante de *E. multilocularis* apresentaram proteção de 97% contra a infecção primária com ovos do parasito, indicando um envolvimento crucial desta molécula já nos primeiros estágios da interação parasito-hospedeiro (Siles-Lucas *et al.*, 2003, Siles-Lucas *et al.*, 2008). As proteínas 14-3-3 também foram identificadas como proteínas imunogênicas em experimentos utilizando soros de pacientes infectados com a fase larval de *E. granulosus* s.l. (Monteiro *et al.*, 2010). Em um estudo realizado do efeito da proteína 14-3-3 de *E. multilocularis* na produção de óxido nítrico foi demonstrado que a proteína 14-3-3 diminui a produção de óxido nítrico por macrófagos ativados, indicando um papel imunomodulador por parte das proteínas 14-3-3 de *E. multilocularis* (Andrade *et al.*, 2004). Todos estes estudos sugerem que as proteínas 14-3-3 de *Echinococcus* spp. parecem desempenhar um papel potencialmente importante na biologia do parasito, o que as torna alvos bastante interessantes para estudo.

2. Justificativas e objetivos

O conhecimento sobre os processos moleculares envolvidos na biologia de parasitos do gênero *Echinococcus*, sua relação com o hospedeiro e o seu desenvolvimento ainda são pouco compreendidos, principalmente em nível molecular. Proteínas 14-3-3 desempenham papéis centrais e conservados em rotas de sinalização eucarióticas que coordenam funções celulares essenciais e o próprio desenvolvimento. Além disso, essas proteínas podem, em organismos parasitos como espécies do gênero *Echinococcus*, desempenhar algumas funções mais especializadas no contexto da relação parasito-hospedeiro. Assim, a caracterização das proteínas 14-3-3 presentes em metacestódeos de *Echinococcus* spp. pode auxiliar na elucidação de mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento, desenvolvimento e manutenção do estágio larval patogênico desses parasitos.

Este estudo tem como objetivo geral a caracterização de diferentes isoformas de proteínas 14-3-3 de *Echinococcus* spp. quanto a suas estruturas, seus padrões de expressão e seus repertórios de ligantes.

Este trabalho tem como objetivos específicos:

1. Determinar as estruturas éxon-íntron dos genes de 14-3-3 em *E. granulosus* e *E. multilocularis* (*Eg14-3-3.1-6* e *Em14-3-3.1-6*, respectivamente) e analisar as relações filogenéticas das proteínas 14-3-3 do gênero *Echinococcus* com proteínas 14-3-3 de outros organismos eucariotos;
2. Prever as estruturas tridimensionais das isoformas *Eg14-3-3.1-6* a partir de modelos disponíveis;
3. Clonar as sequências codificadoras, expressar e purificar as quatro isoformas *Eg14-3-3.1-4* para produzir as proteínas recombinantes e posterior produção de soros anti-14-3-3 isoforma-específicos;

4. Determinar o padrão de expressão das isoformas Eg14-3-3 na fase larval patogênica através de diferentes componentes do cisto hidático de *E. granulosus* s.l.;
5. Identificar o repertório global de proteínas ligantes das diferentes isoformas de Eg14-3-3 em extratos proteicos de protoescólices de *E. granulosus*;
6. Analisar as proteínas de interação das isoformas Eg14-3-3 para inferências sobre possíveis funções desempenhadas por estas proteínas na forma larval patogênica do parasito.

3. Capítulo I - Caracterização de isoformas 14-3-3 expressas na fase larval patogênica do *Echinococcus granulosus*

Este capítulo inclui o manuscrito intitulado “Characterization of 14-3-3 isoforms expressed in the *Echinococcus granulosus* pathogenic larval stage”, que foi aceito para publicação na *Journal of Proteome Research* e tem a autoria de Aline Teichmann, Daiani M. Vargas, Karina M. Monteiro, Bruna V. Meneghetti, Cristine S. Dutra, Rodolfo Paredes, Norbel Galanti, Arnaldo Zaha, e Henrique B. Ferreira.

Contribuição dos autores

Aline Teichmann: realizou os experimentos com as isoformas Eg14-3-3.1 e Eg14-3-3.2, incluindo clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes, produção de soros anti-14-3-3 isoforma-específicos e ensaios de 2D *gel overlay*, *cross linking* e cromatografia de afinidade. Os experimentos de imunofluorescência e imunoblots foram realizadas para as quatro isoformas, bem como as análises para identificação das proteínas de interação no LNBio e posterior análise dos dados gerados por espectrometria de massas. Filogenia para todas as sequências. Elaboração do manuscrito.

Daiani M. Vargas: realizou os experimentos com as isoformas Eg14-3-3.3 e Eg14-3-3.4, incluindo clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes produção de soros anti-14-3-3 isoforma-específicos e ensaios de 2D *gel overlay*, *cross linking* e cromatografia de afinidade.

Karina M. Monteiro: Coorientadora. Participou do delineamento de todos os experimentos que foram executados, das análises dos resultados obtidos e da elaboração do manuscrito.

Bruna V. Meneghetti: Auxiliou nos experimentos com as isoformas Eg14-3-3.1 e Eg14-3-3.2 e realizou a predição *in silico* das estruturas tridimensionais sob a minha supervisão.

Cristine S. Dutra: Auxiliou nos ensaios de imunoblots e realizou os experimentos de 2D *gel overlay* para a isoforma Eg14-3-3.1 sob a minha supervisão.

Rodolfo Paredes & Norbel Galanti: o treinamento em métodos de preparação inicial de cortes de protoesclóides e camada germinativa para imunofluorescência foram iniciados a partir de estágio da primeira autora nos laboratórios destes dois pesquisadores, no Chile.

Arnaldo Zaha: Participou das discussões dos resultados obtidos e da elaboração do manuscrito.

Henrique B. Ferreira: Orientador. Participou do delineamento de todos os experimentos que foram executados, das análises dos resultados obtidos e da elaboração do manuscrito.

Characterization of 14-3-3 isoforms expressed in the *Echinococcus granulosus* pathogenic larval stage

Aline Teichmann,^{§**} Daiani M. Vargas,^{§**} Karina M. Monteiro,[§] Bruna V. Meneghetti,[§] Cristine S. Dutra,[§] Rodolfo Paredes,[‡] Norbel Galanti,[#] Arnaldo Zaha,[§] and Henrique B. Ferreira^{§,*}

[§]Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional and Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

[‡]Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile

[#]Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

ABSTRACT: The 14-3-3 protein family of eukaryotic regulators was studied in *Echinococcus granulosus*, the causative agent of cystic hydatid disease. These proteins mediate important cellular processes in eukaryotes and are expected to play important roles in parasite biology. Six isoforms of *E. granulosus* 14-3-3 genes and proteins (Eg14-3-3.1-6) were analyzed, and their phylogenetic relationships were established with *bona fide* 14-3-3 orthologous proteins from eukaryotic species. Eg14-3-3 isoforms with previous evidence of expression (Eg14-3-3.1-4) in *E. granulosus* pathogenic larval stage (metacestode) were cloned, and recombinant proteins were used for functional studies. These protein isoforms were detected in different components of *E. granulosus* metacestode, including interface components with the host. The roles that are played by Eg14-3-3 proteins in parasite biology were inferred from the repertoires of interacting proteins with each isoform, as assessed by gel overlay, cross linking and affinity chromatography assays. A total of 95 Eg14-3-3 protein ligands were identified by mass spectrometry. Eg14-3-3 isoforms have shared partners (44 proteins), indicating some overlapping functions; however, they also bind exclusive partners (51 proteins), suggesting Eg14-3-3 functional specialization. These ligand repertoires indicate the involvement of Eg14-3-3 proteins in multiple biochemical pathways in the *E. granulosus* metacestode and note some degree of isoform specialization.

KEYWORDS: 14-3-3 proteins, *Echinococcus granulosus*, protein-protein interactions, host–parasite interactions

INTRODUCTION

Hydatid disease is a parasitic infection that is caused by the larval stage of tapeworms of the genus *Echinococcus*. *Echinococcus granulosus* sensu lato (s.l.), a complex of four cryptic species with worldwide distribution, includes important members of the genus due to its infectivity to both human and animal hosts.¹ *Echinococcus granulosus* sensu stricto (s.s.), from now on referred to as *E. granulosus*, is the most prevalent species of the *E. granulosus* s.l. complex in South America and is responsible for most human echinococcal infections in Brazil.²⁻⁴

The *E. granulosus* pathogenic larval form (metacestode) is a two-layered unilocular cyst.⁵ The cyst wall (CW) is formed by an inner layer called the germinal layer (GL) and an outer layer called the laminated layer (LL). The GL is responsible for the formation of brood capsules and pre-adults (protoscoleces, PSC). The GL also produces the LL, which is a thick, acellular, carbohydrate-rich, specialized extracellular matrix. *E. granulosus* metacestodes are filled with the so-called hydatid fluid, which contains excretory-secretory products from both the GL and PSC, along with host proteins.⁶

E. granulosus metacestodes cause chronic infection in suitable intermediate hosts, being able to grow and remain viable and fertile (capable of producing protoscoleces) for long periods of time (up to years).⁵ During this time, there is an intense cross-talk between parasite and host, with an exchange of proteins and other molecules. Host-parasite interactions are assumed to trigger important signaling pathways in both parasite and host cells, which are determinants of the infection outcome and parasite development.⁶ In this scenario, 14-3-3 proteins, which are ubiquitous eukaryotic cell regulators,⁷⁻⁹ are expected to mediate important parasite cellular functions, depending on their interactions with different protein counterparts.

The 14-3-3 proteins are highly conserved and can perform a wide range of cellular functions by interacting with a ligand repertoire that exceeds 300 interaction partners in different organisms.¹⁰⁻¹² Structurally, 14-3-3 are small (~30 kDa), acidic proteins that form both homo and heterodimers, which can bind either to phosphoserine/phosphothreonine residues or to sequence-specific, non-

phosphorylated motifs of protein partners.¹⁰ The 14-3-3 proposed mechanisms of action include the modification of activity of the bound ligands, changes in the association of the bound ligands with other cellular components, and the altered intracellular destination of 14-3-3 bound cargo.¹³

The number of different 14-3-3 isoforms varies from species to species. This number can be as low as 2, such as in yeast, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*, to as high as 7 in mammals or 12 in *Arabidopsis*.¹³ In helminth parasites, 14-3-3 proteins have been identified at the host-parasite interface¹⁴ and described as differentially expressed between parasite stages¹⁵ and as potential diagnostic or vaccinal antigens.^{16,17} For *E. granulosus*, six 14-3-3 protein-encoding genes were annotated in the genome sequences.^{15,18} The expression of four of these 14-3-3 isoforms in distinct parasite life stages, metacestode components and in excretion/secretion products of protoscoleces has been detected by transcriptomic^{15,18,19} and proteomic studies.^{7,9} Immunohistochemical studies of *E. granulosus* adult worm also showed an association of 14-3-3 proteins with the outer apical area (rostellum) and rostellar gland secretion, suggesting roles in parasite adhesion and nutrition.²⁰ Despite this evidence that the 14-3-3 protein family plays important roles in *E. granulosus* development, virtually no information is available on the cellular processes that are regulated by these proteins.

In the present study, we revised and compared the exon-intron organization of *E. granulosus* 14-3-3 genes (*Eg14-3-3*). The deduced amino acid sequences were used to provide three-dimensional molecular models and to establish the phylogenetic relationships of the *Eg14-3-3* with 14-3-3 proteins of a wide range of organisms, including parasites and model organisms. To gather evidence for *Eg14-3-3* functions in parasite biology, especially during the infection of the intermediate host, we also investigated the repertoires of interacting proteins with each of the four *Eg14-3-3* isoforms that are expressed during the *E. granulosus* metacestode stage. Three independent methods demonstrated that, along with several shared protein interactions, each *Eg14-3-3* isoform has a set of exclusive ligands, which is suggestive of functional specialization. The identified sets of protein ligands indicate the involvement of 14-3-3 proteins in several *E. granulosus*

cellular functions, such as energy production, carbohydrate metabolism and intracellular trafficking. The implications of Eg14-3-3 protein interactions and its inferred roles in parasite survival and growth during host infection are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Parasite material

E. granulosus hydatid cysts were obtained from the lungs and livers of naturally infected bovines from a commercial slaughterhouse (São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brazil). The hydatid cyst fluid (HCF) was aseptically aspirated and 10-fold concentrated by lyophilization. The GL was separated from the laminated layer using a tissue scraper. Protoscoleces (PSC) were washed 3 times in phosphate buffer saline (PBS). Parasite genotyping, for confirmation of the G1 haplotype for *E. granulosus* s.s., was performed as described by Balbinotti et al.²

Nucleotide and amino acid sequences and phylogenetic analyses

The *E. granulosus* genome sequences that were used in this work were obtained from GeneDB (www.genedb.org). The six annotated *E. granulosus* 14-3-3 genes (EgrG_001192500, EgrG_000231300, EgrG_000364000, EgrG_001060100, EgrG_000789700, and EgrG_000314100), here referred to as *Eg14-3-3.1-6*, respectively, were analyzed with the GeneMark-E,²¹ Fgenesh²² and GeneScan²³ algorithms to confirm the exon–intron structures and coding DNA sequences (CDSs). The CDS translations and molecular masses and the isoelectric point predictions were performed using tools that were available on the ExPASy website (<http://expasy.org/>). The deduced amino acid sequences were aligned using ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Forty-eight orthologous 14-3-3 protein sequences from parasites and model organisms were recovered from the GeneDB (www.genedb.org) and NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) databases using the BLAST tool and *Eg14-3-3* sequences as queries. Phylogenetic analyses were performed by the Neighbor-Joining²⁴ methods using MEGA6.²⁵ The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are

shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the p-distance method. All of the ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 328 positions in the final dataset.

Molecular modeling of the Eg14-3-3 isoforms

Tridimensional (3D) molecular models of Eg14-3-3 isoforms were built by comparative modeling. The search for templates and the generation of molecular models were conducted as previously described.²⁶ The templates that were used for Eg14-3-3 modeling were from *Homo sapiens* (PDB code: 2BR9)²⁷ for Eg14-3-3.1; *Nicotiana tabacum* (PDB code: 1O9C)²⁸ for Eg14-3-3.2; *Bos taurus* (PDB codes: 2V7D and 1A38)^{29,30} for Eg14-3-3.3 and Eg14-3-3.4, respectively; *H. sapiens* (PDB code: 3UAL)³¹ for Eg14-3-3.5; and *Cryptosporidium parvum* (PDB code: 2NPM)³² for Eg14-3-3.6. Alignments between Eg14-3-3 isoforms and the templates were used to generate Eg14-3-3 3D structures using Modeller version 9.8.³³ The visualization and manipulation of the molecular images were performed with PyMOL version 1.3 (www.pymol.org). The final models were evaluated with PROSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), PROCHECK (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>), TM-score (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-score/>), Swiss-pdb Viewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>) and Qmean Server (<http://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi>).

RNA extraction, cDNA synthesis and cloning

E. granulosus PSC RNA extraction, cDNA synthesis and cloning were carried out essentially as described by Lorenzatto et al.³⁴ The coding sequences of the Eg14-3-3 isoforms were amplified by PCR with gene-specific forward and reverse primers for Eg14-3-3.1 (5'-TTGGTCGTTATGTCTTCTCTCAGT-3' and 5'-

CTCCGACATTTCTTCATTTA-3'), *Eg14-3-3.2* (5'-ATGGCTACGAAAAGTCCTA-3' and 5'-CTAATCCCGCTTGTACC-3'), *Eg14-3-3.3* (5'-ATGGCAGCTATTACCTCTTG-3' and 5'-TTAGGAGTCGGTCTCACATT-3') and *Eg14-3-3.4* (5'-ATGGCTGAGCTTCTGTCCAC-3' and 5'-TTCAGCACCCCTCGGTATT-3'). The gene-specific primers also included 24-nt recombination tags matching the cloning vector pGEX-TEV, with *Frecl* (5'-TATTTTCAGGGAGAATTCCCGGGT-3') and *Rrecl* (5'-GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCA-3') respectively added to their 5' ends. The PCR products were used as templates for a second amplification reaction with primers containing additional nucleotide sequences matching the cloning vector, namely *Frecll* (5'-TGGTTCGCGTGGATCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGAGAATTCCCGGGT-3') and *Rrecll* (5'-GGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCA-3'). The *Eg14-3-3* CDSs (*Eg14-3-3.1* - 744 bp, *Eg14-3-3.2* - 768 bp, *Eg14-3-3.3* - 747 bp and *Eg14-3-3.4* - 771 bp), which were tagged with 50-bp matching pGEX-TEV at their 5' and 3' ends, were cloned by *in vivo* homologous recombination.

Recombinant protein expression and purification

Recombinant *Eg14-3-3* isoforms were expressed using *Escherichia coli* strains Rosetta, BL21-CodonPlus-RP and BL21-CodonPlus-RIL (Stratagene, USA). The expression of the recombinant proteins that were fused to glutathione S-transferase (GST) (1L of culture) was induced with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 0.1 mM at 37°C or 20°C for 3 h or 18 h. After induction, the cells were harvested and lysed. GST fusion proteins were recovered from the soluble fraction by affinity chromatography in Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare, UK) followed by cleavage with TEV protease as previously described.³⁴ The purified proteins were analyzed by 12% SDS-PAGE, and the protein concentrations were measured using a Qubit™ quantitation fluorometer and Quant-iT™ reagents (Invitrogen, USA).

Immunoblots

Eg14-3-3 isoform-specific antisera were produced by rabbit immunization. Antisera production and antibody purification were carried out as previously described,³⁴ using 250 µg of each Eg14-3-3 recombinant protein per animal in each of the three performed immunizations. The experimental procedures were previously approved by the Ethical Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (<http://www.ufrgs.br/ceua/>). For immunoblot assays, *E. granulosus* PSC and GL samples were homogenized in a glass Dounce tissue grinder with PBS containing 1 mM PMSF and 1% Triton X-100. The homogenates were centrifuged at 20,000 g for 30 min at 4°C to remove the insoluble fraction. The soluble proteins were quantified using a QubitTM quantitation fluorometer and Quant-iTTM reagents (Invitrogen). The protein samples were resolved by 12% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (HybondTM, GE Healthcare). The membranes were blocked for 16 h with 5% nonfat dry milk in PBS-T (PBS containing 0.1% Tween-20) and then incubated with specific anti-14-3-3 isoform rabbit polyclonal antibodies at a 1:20,000 (v/v) dilution for 1 h and 30 min. After four washes with PBS-T, the membranes were incubated with a goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase (ECLTM, GE Healthcare) at a 1:9,000 (v/v) dilution for 1 h. Antigen-antibody reactions were detected with the ECL Plus kit (GE Healthcare) and imaged using the VersaDoc imaging system (Bio-Rad, USA). Recombinant Eg14-3-3 proteins (~50 ng) were used to assess the antisera specificity.

Immunofluorescence

E. granulosus PSC and CW tissues were prepared as described by Paredes et al.³⁵ Paraffin-embedded sections (5 µm thick) were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, USA) and 0.05% Tween in PBS for 1 h at 37°C. The sections were then incubated in a humid chamber for 1 h at 37°C with isoform-specific anti-Eg14-3-3 purified IgG that was diluted 1:50 v/v in blocking solution. After three washes with PBS, sections were incubated in a humid chamber for 1 h at 37°C with goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (Invitrogen) that was diluted 1:100 v/v in blocking solution. The sections

were then incubated with 50 μ M 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 20 min at 37°C and mounted with Fluoromount.

Whole-mount specimens were prepared as described by Koziol et al.³⁶ with some modifications. *E. granulosus* PSC were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min and washed three times (10 min each) with PBS/0.3% Triton X-100 (PBS-Triton). The sample permeabilization was achieved by a 5-min treatment with 20 μ g/ml proteinase K (Fermentas, USA) in PBS-Triton, followed by re-fixation with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. The samples were then washed three times with PBS-Triton and blocked for 2 h in PBS-Triton with 3% BSA. Incubation with isoform-specific anti-Eg14-3-3 purified IgG antibodies diluted 1:50 v/v in PBS-Triton with 3% BSA was carried out overnight at 4°C. The samples were then washed six times with PBS-Triton for 10 min each and incubated for 1 h at 37°C with goat anti-rabbit IgG that was conjugated with Alexa Fluor 488 (Invitrogen) and diluted 1:100 v/v in PBS-Triton. Finally, the samples were washed six times with PBS-Triton for 10 min each, co-stained with 50 μ M DAPI and Phalloidin Alexa Fluor 594 (Sigma-Aldrich) for 20 min at 37°C, and mounted with Fluoromount. Sections and whole-mount specimens were observed under the confocal microscope (Olympus FluoView 1000). The images were digitally captured and processed using the Olympus FluoView version 2.1c and the Olympus FluoView version 3.0 Viewer software.

Two-dimensional gel overlay

Two-dimensional (2D) gel electrophoresis and gel overlay experiments were performed as described by Monteiro et al.⁷ and Meek et al.,³⁷ respectively, with modifications. *E. granulosus* PSC were homogenized in a glass Dounce tissue grinder with 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 1.15 mM Na₂MoO₄, and 2 mM Mg-ATP. The homogenates were centrifuged at 20,000 g for 30 min at 4°C to remove the insoluble fraction. The soluble proteins were quantified by fluorimetry using a QubitTM quantitation fluorometer and Quant-iTTM reagents (Invitrogen). The protein extracts (2 mg) were separated by 2D gel electrophoresis (20 × 20 cm 12% SDS-PAGE gels) and electrotransferred to nitrocellulose membranes (HybondTM, GE

Healthcare) as described by Monteiro et al.⁷ Then, the membranes were blocked for 16 h with 5% ECL blocking agent (GE Healthcare) and individually incubated for 2 h at 4°C with recombinant Eg14-3-3 protein isoforms (1 µg/ml) that were previously biotinylated with the ECL Protein Biotinylation Module (GE Healthcare). Protein-protein interactions were detected with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate, followed by revelation with ECL reagents (GE Healthcare), and imaged using the VersaDoc imaging system (Bio-Rad). The images from the 2D gel electrophoresis and 2D gel overlay experiments were analyzed using PDQuest 8.0 software (Bio-Rad) for spot detection and matching. For Eg14-3-3-binding protein identification, reactive protein spots were manually excised from corresponding 2D gels and digested with trypsin according to Monteiro et al.⁷ The resulting peptides were analyzed by mass spectrometry, as described in the mass spectrometry section. A 2D gel overlay control experiment was performed with the GST protein tagged with biotin. Specificity controls were carried out by one-dimensional gel overlay using biotinylated Eg14-3-3 recombinant proteins that were preincubated for 1 h with 0.016 mM or 0.1 mM of the competitor R18 peptide (CVPRDLSWLDLEANMCLP)³⁷ (Bachem, USA). All overlay experiments were performed in replicate, each replicate with a pool of PSC that was obtained from 3 to 5 different individuals (metacestodes). Higher than 90% of coincidence was observed between replicates for both gel and blotting spots.

Protein cross linking

E. granulosus PSC proteins that interact with Eg14-3-3 recombinant isoforms were recovered by cross linking using the Sulfo-SBED (sulfosuccinimidyl-2-[6-(biotinamido)-2-(p-azido-benzamido) hexanoamido] ethyl-1,3-dithiopropionate) Biotin Label Transfer Reagent (Pierce, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1 mg of Eg14-3-3 recombinant isoforms was labeled with a 5-fold molar excess of Sulfo-SBED. Sulfo-SBED-Eg14-3-3 complexes were individually incubated with a PSC protein extract (5 mg, processed as described for two-dimensional gel overlay experiments) for 30 min at room temperature and for 15 min under UV irradiation that was produced by a Boitton UV lamp (365 nm, 6 W) at a distance of 5 cm. The complexes Eg14-3-3-

Sulfo-SBED-interacting proteins were cleaved with DTT, and the biotin-labeled Eg14-3-3-interacting proteins were recovered by affinity chromatography using a monomeric avidin column (Pierce). The bound proteins were sequentially washed with 5 column volumes of each of the following buffers: PBS, PBS/0.1% Triton-X-100, PBS, 100 mM NaCl/0.05% SDS, 200 mM NaCl/0.05% SDS and PBS. The biotinylated proteins were eluted from the resin with 2 mM biotin (Pierce). The protein extracts that were used for the cross linking experiments were produced from a pool of PSC from five different individuals (metacestodes), which was necessary to provide the minimum amount of protein that was required to perform the experiments. This PSC pool was assumed to be representative of possible biological variations.

Eg14-3-3 affinity chromatography

Recombinant Eg14-3-3 proteins were individually coupled to an activated CH-Sepharose 4B (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions. The beads with immobilized Eg14-3-3 recombinant isoforms were separately incubated with an *E. granulosus* PSC protein extract (20 mg, processed as described for two-dimensional gel overlay experiments) for 16 h at 4°C. Then, the resins were transferred to disposable chromatography columns (Bio-Rad) and washed with 10 bed volumes of low salt wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT), followed by washes with 10 volumes of high salt buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM DTT). The Eg14-3-3-binding proteins were specifically eluted from the columns with 5 ml of 1 mM R18 peptide that was dissolved in high-salt buffer. The protein extracts that were used for the affinity chromatography experiments were produced from a pool of PSC from 20 different individuals (metacestodes), which was necessary to provide the minimum amount of protein that was required to perform the experiments. This PSC pool was assumed to be representative of possible biological variations.

Mass spectrometry

Tryptic peptides from 2D gel electrophoresis protein spots were analyzed by MALDI-Q-TOF MS/MS (Waters, UK) as described by Monteiro et al.⁷ The analyses

were performed on a Waters Micromass Q-TOF Premier mass spectrometer that was equipped with a standard MALDI source (Waters). The MS spectra were recorded from 800 to 3000 m/z, with an automatic scan rate of 1 s, and an interscan delay of 0.1 s. The MS/MS spectra for the five most intense ions were automatically acquired in data-dependent acquisition (DDA) mode, when the peak intensity increased to greater than a 30-count threshold. The CID collision energy was automatically set according to the m/z ratio of the precursor ion.

The Eg14-3-3-interacting proteins that were recovered by protein cross linking and affinity chromatography were precipitated overnight at -20°C with ice-cold 20% (w/v) trichloroacetic acid/acetone, and the protein pellet was resuspended in 8 M urea/25 mM NH₄HCO₃, pH 8.0. The samples were subjected to trypsin digestion and desalination as described by Monteiro et al.⁷ The mass spectrometric analysis was performed using the nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry system (nLC-MS/MS) on an EASY-nLC system (Proxeon Biosystem, USA) that was connected to a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA) through a Proxeon nanoelectrospray ion source. Two micrograms of peptides were separated with a 2-90% acetonitrile gradient in 0.1% formic acid using the analytical PicoFrit Column (C18, 20 cm × ID 75 μm, 5-μm particle size, New Objective, USA) at a flow of 300 nl/min for 65 min. The nanoelectrospray voltage was set to 2.2 kV, and the source temperature was 275°C. The full-scan MS spectra (m/z 300–1600) were acquired in the Orbitrap analyzer after accumulation to a target value of 1 × 10⁶. The resolution in the Orbitrap was set to r = 60,000, and the 20 most intense peptide ions with charge states ≥2 were sequentially isolated to a target value of 20,000 and fragmented in the linear ion trap using low-energy CID (normalized collision energy of 35%). The signal threshold for triggering an MS/MS event was set to 1000 counts. Dynamic exclusion was enabled with an exclusion size list of 500, an exclusion duration of 60 s, and a repeat count of 1. An activation q = 0.25 and activation time of 10 ms were used.

Database searching and bioinformatics

The raw files were processed using Mascot Distiller version 2.4 to generate mgf files. For protein identification, MS/MS data were searched using Mascot software version 2.3.02 against a local *E. granulosus* database containing deduced amino acid sequences (10,445) from genome annotation as available on GeneDB. For MALDI-Q-TOF MS/MS, the following parameters were used: maximum of one missed cleavage, fixed carbamidomethyl alkylation of cysteines, variable oxidation of methionine, and 0.1 mass unit tolerance on parent and fragment ions. The significance threshold was set at $p < 0.05$, and only those peptides with individual ion scores above this significance threshold were considered for protein identification. For the LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer, the search parameters consisted of carbamidomethylation as a fixed modification, oxidation of methionine as a variable modification, one trypsin missed cleavage and a tolerance of 10 ppm for precursor and 1 Da for fragment ions. Scaffold version 4.0.5 was used to validate the peptide and protein identifications. The peptide identifications were accepted if they could be established with >95% probability, as specified by the Peptide Prophet algorithm,³⁸ and protein identifications were accepted if they could be established at a greater-than-99% probability and contained at least 2 identified peptides.³⁹ Eukaryotic Orthologous Group (KOG)⁴⁰ annotations were assigned to identified proteins based on sequence similarity searches against the KOG annotated proteins using the eggNOG_{4.0} tool (http://eggnog.embl.de/version_4.0.beta/).⁴¹

RESULTS AND DISCUSSION

***Eg14-3-3* genes and encoded proteins**

The six *Eg14-3-3* genes were compared regarding their exon-intron structures and sequences. These genes contain 3 or 4 exons ranging in size from 33 to 384 bp that are separated by introns ranging in size from 29 to 190 bp (Figure S1). The *Eg14-3-3* genes encode *Eg14-3-3* proteins with 211 to 256 aa and deduced molecular masses ranging from ~24.3 to ~29.4 kDa (Table S1). *Eg14-3-3.5* is the smallest protein isoform due to its shorter N-terminal extension.

The sequence alignments of the Eg14-3-3 deduced amino acid sequences (Figure S2) shows identities/similarities ranging from 21%-54%/38%-72% respectively, between paralogs. The 14-3-3.5 isoform is the most divergent, with a 21%/38% overall identity/similarity between paralogs. Multiple sequence alignments were also performed between the Eg14-3-3 proteins and the 14-3-3 orthologous proteins from a wide range of eukaryotic species, including other helminthes and model organisms. This analysis revealed identities between ~30-99% with other helminthes and ~30-50% with model organisms (Table S2).

To further explore the phylogenetic relationships of Eg14-3-3 proteins, we built a phylogenetic tree including the 48 ortholog sequences that were used in the alignments described above. This analysis demonstrated that Eg14-3-3 proteins, along with 14-3-3 proteins from other helminthes, form a group separate from that formed by 14-3-3 proteins from more complex organisms, such as *D. melanogaster*, *B. taurus* and *H. sapiens* (Figure S3).

Eukaryotic 14-3-3 proteins are typically grouped into two distinct groups, one comprising the non-epsilon isoforms and another comprising the epsilon isoforms.⁴² In our analysis, these groups were indeed observed for 14-3-3 proteins from more complex organisms, which formed a wide monophyletic group, including beta, alpha, zeta, delta, theta, eta, gamma and sigma isoforms, apart from the other monophyletic group formed by epsilon isoforms.

Eg14-3-3.1-6 isoforms form another six monophyletic groups, along with their respective orthologs from related organisms, such as *Echinococcus multilocularis*, *Taenia solium* and *Hymenolepis microstoma*. The Eg14-3-3.5 and Eg14-3-3.6 isoforms diverge not only from 14-3-3 proteins from more complex organisms but also from their paralogs, indicating that the six-paralog configuration of the *Echinococcus* 14-3-3 family was established prior to the speciation events that separated *E. granulosus* and *E. multilocularis*.

Structural modeling of Eg14-3-3 isoforms

To gain insights into the structure of Eg14-3-3 proteins, we built 3D molecular models for the six isoforms, using the available ortholog templates with the highest identities/similarities with each of the studied isoforms. Quality

assessments of the Eg14-3-3-built models indicated good overall accuracy and stereochemical properties (Table S3). The 3D models (Figure 1) indicate that the Eg14-3-3.1-4 isoforms have typical structural characteristics of *bona fide* eukaryotic 14-3-3 proteins, while Eg14-3-3.5 and Eg14-3-3.6 isoforms were more divergent.

In the Eg14-3-3.1-4 models (Figure 1A-D) each monomer consists of nine antiparallel α -helices (α 1-9, indicated in Figure 1 and Figure S2) forming an elongated bundle. On the other hand, the Eg14-3-3.5 and Eg14-3-3.6 models present elongated bundles formed by different α -helix configurations (Figure 1E-F). While, Eg14-3-3.5 present eight α -helices, missing the first N-terminal (α 1) helix (Figure 1E), Eg14-3-3.6 presents a structure with the α 3 helix split into two shorter α -helices (α 3a- α 3b, Figure 1F). In all Eg14-3-3 protein models, the N-terminal and C-terminal ends were not structured and presented different sizes. The non-structured N-terminal is missing in Eg14-3-3.5 and is 6-17 aa long for the other isoforms. The non-structured C-terminal, in turn, is 8-20 aa-long, with the shortest being found in Eg14-3-3.3.

As typical for 14-3-3 protein family members, the Eg14-3-3 isoforms 1-4 are likely to form homodimers, according to our modelling and sequence analysis. Homodimerization of 14-3-3 proteins relies on helices α 1 to α 4, especially on an Arg residue, in the α 2 helix, and a Glu residue, in the α 4 helix (Arg19 and Glu92, respectively, in the human 14-3-3 ϵ protein used as reference; Figure S2), involved in the formation salt bridges between protein monomers.^{27,43} The Eg14-3-3.1-4 isoforms all present typical sets of α 1- α 4 helices and the conserved Arg and Glu residues (Figure S2). Homodimer formation may not occur in Eg14-3-3.5, which misses the α 1 helix and the conserved Arg residue in the α 2 helix, and in Eg14-3-3.6, in which the conserved α 2 helix Arg residue is replaced by a Leu residue.

The 14-3-3 protein dimer structure forms a groove, in which two phosphoprotein-binding sites are found, one in each monomer.⁴³ Typically, a set of five conserved residues (Arg57, Arg130, Tyr131, Asn176 and Asn227, in the human 14-3-3 ϵ protein used as reference; Figure S2) is important for the primary interaction with client phosphorylated proteins.²⁷ All these residues were found in the Eg14-3-3.1-6 isoforms. Secondary, additional interactions between 14-3-3

proteins and their protein clients rely on the flexible loop between the $\alpha 8$ and $\alpha 9$ helices. This loop is considered of critical importance for the specificity of the interactions between each isoform and its targets in a phosphorylation-independent manner.^{27,44} In the Eg14-3-3.1-6 proteins, the loop between the $\alpha 8$ and $\alpha 9$ helices is somewhat variable, which may define differences among isoform ligand repertoires.

Amino and carboxyl unstructured end regions of 14-3-3 proteins, as those found in Eg14-3-3 isoforms, are more divergent than the core protein region and may interact with isoform-specific client proteins and/or confer specialized subcellular and tissue localization.⁴² It has been speculated that the C-terminal end functions as a suppressor of unspecific interactions between 14-3-3 and ligands.⁴⁵

Expression analysis of Eg14-3-3 isoforms in hydatid cyst components

Previous *E. granulosus* RNA-Seq data (see Table S1) reported that the *Eg14-3-3.1-4* genes are the most highly expressed for this family in all of the analyzed parasite stages, from onchosphere to adult.^{15,18} Moreover, previous proteomic studies detected the presence of Eg14-3-3.1-4 proteins in *E. granulosus* PSC, excretory/secretory (ES) products and metacestode components^{7,9} Based on their higher expression levels throughout the parasite's life cycle and on their structural features being more similar to *bona fide* 14-3-3 proteins, the Eg14-3-3.1-4 isoforms were selected for further characterization.

Eg14-3-3.1-4 CDS were cloned and expressed in *E. coli*, and isoform-specific anti-Eg14-3-3 sera were raised in rabbits. The specificity of polyclonal antisera to the corresponding protein isoforms was demonstrated by immunoblot (Figure S4), with no detectable cross reactivity under our assay conditions. These antisera were used in immunoblot experiments to further investigate the Eg14-3-3 expression pattern in the pathogenic larval stage of *E. granulosus* (Figure 2). The expression of all four of the Eg14-3-3 isoforms that were analyzed was observed in PSC and GL samples from the different tested parasite cysts. No Eg14-3-3 isoform was detected in *E. granulosus* HCF.

Our immunoblot results regarding Eg14-3-3 expression agree with previous transcriptional and proteomic studies that reported the expression of Eg14-3-3.1-4

isoforms at the *E. granulosus* pathogenic larval stage. Zheng et al.¹⁵ and Tsai et al.¹⁸ reported *Eg14-3-3.1* and *Eg14-3-3.3* as having higher expression levels in parasite metacestode. Although this differential expression is not obvious for PSC samples tested, *Eg14-3-3.1* and *Eg14-3-3.3* were found here to be overrepresented among the *Eg14-3-3* isoforms that were expressed in the germinal layer. Although *Eg14-3-3.1-4* isoforms have been identified in ES products of *in vitro*-cultured *E. granulosus* PSC,⁹ we were not able to detect any of these isoforms in *E. granulosus* HCF samples. Such differences could be explained by the higher sensitivity of proteomic methods, and by possible qualitative and quantitative differences between proteins secreted *in vitro* and *in vivo* by PSC. Moreover, differences in *Eg14-3-3* isoform expression and secretion may be related to physiological variations in cyst conditions and host response during infection.

We also performed immunofluorescence assays (whole-mount and sections) to determine the *Eg14-3-3* spatial expression profile in *E. granulosus* metacestode (Figures 3 and 4). These experiments revealed the presence of the four *Eg14-3-3* isoforms that are widely distributed in all cell types of PSC (Figure 3 and Figure S5), which agrees with the reported wide distribution of 14-3-3 proteins in eukaryotic cells.¹⁶ *Eg14-3-3* proteins were also detected on the tegument surface of PSC in both whole-mount and section samples. In whole-mount PSC samples, it was possible to observe *Eg14-3-3.2* and *Eg14-3-3.4* staining in nerve cords and their co-localization with actin (the arrows in Figure 3E). The four *Eg14-3-3* isoforms were also detected in the parasite germinal layer (Figure 4), with the *Eg14-3-3.4* isoform also found associated with the laminar layer.

The presence of *Eg14-3-3* isoforms in components that represent host-parasite interfaces, such as the CW, PSC and tegument, is suggestive of possible roles for these proteins in host-interaction molecular mechanisms as well as their active presentation to host immune system. The participation of *Eg14-3-3* proteins in the evasion of the host cellular immune response during parasite infection by inhibiting nitric oxide production by macrophages has been described.⁴⁶ There is also accumulating evidence that 14-3-3 proteins are potential antigens for vaccine and diagnostic tests against hydatid disease.¹⁶ The presence of two *Eg14-3-3*

isoforms in nerve cords is suggestive of both isoform functional specialization and the involvement of 14-3-3 proteins with neural development in *E. granulosus*. The expression of 14-3-3 in the nervous system has been reported in mammals, where these proteins regulate the subcellular localization of target proteins and may play protective roles against neurodegeneration.⁴⁷

Identification of protein ligands for Eg14-3-3.1-4 isoforms

To gain insight into the cellular functions that are regulated by 14-3-3 proteins in *E. granulosus*, we investigated the repertoire of protein ligands of each of the four major Eg14-3-3 isoforms that are expressed during the parasite larval stage (Eg14-3-3.1-4). The recombinant Eg14-3-3.1-4 isoforms were used in three distinct and complementary interaction assays (2D gel overlay, cross linking and affinity chromatography) to detect or isolate their protein ligands among *E. granulosus* PSC proteins. The Eg14-3-3-binding proteins that were detected or recovered in these assays were subsequently identified by mass spectrometry (Figure 5 and Tables S4-S6).

Control experiments using the GST protein were performed for all of the interaction assays in order to demonstrate the specificity of our experimental approaches. Additional control experiments were performed for 2D gel overlay using Eg14-3-3 recombinant isoforms that were preincubated with the R18 peptide (Figure S6). In this control assay, a signal reduction was observed due to the peptide competition for 14-3-3 binding, which also highlighted the specificity of the protein-protein interactions that were identified by this method.

As shown in Table 1, 2D gel overlay, cross linking and affinity chromatography assays using Eg14-3-3 recombinant proteins recovered 27, 58 and 18 non-redundant binding partners from PSC extracts, respectively. Overall, the use of these three different experimental approaches permitted the identification of 95 non-redundant Eg14-3-3-interacting proteins, with little overlapping between the ligand protein sets that were identified by the used methods.

This result is likely due to the distinct types of protein-protein interactions that are targeted by each technique. 2D gel overlay detects only more abundant

and soluble proteins⁴⁸ and direct protein-protein interactions,³⁷ thus restricting the number of cellular proteins and interactions that can be assayed by this method. In addition, affinity chromatography using a specific competitor (R18 peptide) is especially useful in identifying *bona fide* Eg14-3-3 targets and indirect protein-protein interactions as well.³⁷ Cross linking assays, in turn, permit the identification of transient protein-protein interactions because the use of the Sulfo-SBED reagent covalently stabilizes protein interactions. This stabilization agrees with the higher number of Eg14-3-3-binding proteins that were identified by this experimental approach compared to the other two.

A KOG functional annotation of the whole set of non-redundant Eg14-3-3 ligands (Table 1, data summarized in Figure 6A) revealed that these ligands are related to a wide range of biological functions, with most of them belonging to Z (cytoskeleton 16%), O (post-translational modification, protein turnover, and chaperones 15%), C (energy production and conversion 12%), G (carbohydrate transport and metabolism 9%), J (translation 7%), and U (intracellular trafficking and secretion 6%). Other classes were represented by less than 6% of the identified proteins. Our results indicate that Eg14-3-3.1-4 isoforms are involved in multiple cellular processes in *E. granulosus*. The overall repertoire of Eg14-3-3-target proteins is similar to that reported for 14-3-3 proteins from different organisms,^{37,49-51} with the cytoskeleton, metabolism and chaperones representing the most abundant functional categories.

The Venn diagram in Figure 6B shows that 21% (20 out of 95) of the overall repertoire of the identified Eg14-3-3 ligands is shared by the 4 isoforms. The other 25% (24 out of 95) is shared between 2 or 3 isoforms. These overlaps in ligand repertoires suggest some degree of functional redundancy, as previously shown in other organisms with 14-3-3 isoforms with overlapping ligand profiles.⁵² Thus, some functions could be carried out by more than one 14-3-3 isoform.

In addition, 54% (51 out of 95) of the Eg14-3-3-binding proteins were exclusive from a single isoform in our experimental conditions, suggesting certain degree of functional specialization. Previous studies with other eukaryotic organisms strongly suggest that there is indeed functional specialization for 14-3-3 isoforms that is associated to their differential expression and ability to bind

different ligands.^{52,53} Therefore, it is likely that *E. granulosus* 14-3-3 isoforms have some overlapping functions, whereas other functions may be exclusively performed by a given isoform.

The Eg14-3-3.2 and Eg14-3-3.3 isoforms showed the highest numbers of exclusive binding partners among the identified proteins, with 15 and 26 exclusive ligands, respectively. Regarding Eg14-3-3.3, it presents a shorter C-terminal unstructured end (Figure 1, Figure S2), which may be associated to a less restrictive structure for ligand binding. Therefore, this could explain, at least in part, the larger repertoire of ligands identified for this protein in comparison to the other Eg14-3-3 isoforms.

For further analysis, the KOG terms that were assigned to Eg14-3-3 ligands were arbitrarily divided into two groups: one of more general functions, as represented by basic metabolism, transport and structural functions, and another of more specialized functions, including transcription, RNA processing and modification, signal transduction and other functions (Figure 7). The repertoire of binding proteins that is shared by 4, 3 or 2 Eg14-3-3 isoforms is mostly represented by proteins that are involved in general functions (Figure 7A), such as carbohydrate transport and metabolism (G), cytoskeleton (Z) and post-translational modification, protein turnover, and chaperones (O). In addition, a higher number of Eg14-3-3-binding proteins that are involved in more specialized functions were found in the set of proteins that exclusively interact with a single Eg14-3-3 isoform compared to that of the repertoire of ligands that are shared by the Eg14-3-3 isoforms (Figure 7B-E). These isoform-specific ligands are related to functions such as transcription (K), extracellular structures (W), unknown function (S), translation (J), intracellular trafficking and secretion (U).

Among the set of functions, proteins that interact exclusively with the Eg14-3-3.3 isoform (Figure 7D) represent the largest number of functional categories (9 KOG terms) compared to the repertoires of exclusive ligands from the other assessed Eg14-3-3 isoforms (Figures 7B-C, E). This result suggests the participation of this protein isoform in the regulation of molecular processes as diverse as transcription and intracellular trafficking and secretion, indicating a higher degree of multifunctionality.

Eg14-3-3 proteins were found among the protein ligands that were recovered in our interaction assays, which is in line with the well-documented dimerization of 14-3-3 proteins.⁵⁴ Through distinct approaches, we observed that Eg14-3-3.1-4 isoforms are able to form both homo- and heterodimers. Relative protein quantification by spectral counting (Tables S5-S6) suggested a preference for the homodimeric protein configuration.

Our results indicate that Eg14-3-3 proteins are involved in the regulation of *E. granulosus* central metabolic pathways. In different species, numerous proteins that participate in essential metabolic pathways have been identified as 14-3-3 binding partners.⁵⁵ We found several enzymes that are involved in glycolysis among Eg14-3-3 ligands, including phosphofructokinase, phosphoglycerate mutase, enolase, phosphoglycerate kinase, fructose-1,6-bisphosphate aldolase, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Glycolysis is a very important pathway for parasite metabolism, as glucose is the main source of fuel for tissues and is also the major respiratory substrate.⁵⁶ In addition, interactions between Eg14-3-3 proteins and glycolytic enzymes may have additional functions, as many of them exhibit various non-glycolytic activities known as moonlighting. In *E. granulosus*, fructose-bisphosphate aldolase and enolase are described as moonlighting proteins, and these enzymes are found in host-interacting parasite components.³⁴

We also observed that Eg14-3-3 proteins interact with several stress-related proteins, such as heat shock proteins (HSPs). There is evidence supporting the cooperation between these two families of proteins for eukaryotic cell survival to stress. In humans, these interactions increase HSP chaperone activity.⁵⁷ In *E. granulosus*, the transcription levels of the genes encoding HSP70, HSP60 and 14-3-3 proteins increased after the treatment of protoscoleces with an anti-helminthic.⁵⁸ In helminth parasites, such as *E. granulosus*, which survive in hostile environments that are subjected to various stress situations as promoted by the host defense system, the development of strategies for robust defense is critical. Thus, the interaction between HSPs and 14-3-3 protein families is likely of great importance for *E. granulosus* survival under stressful conditions.

Another group of Eg14-3-3-binding proteins that is well represented in this study is cytoskeletal proteins, which include actin, tubulin, filamin, F-actin capping, dynein, fimbrin, kinesin and actin filament-fragmenting protein. Eg14-3-3 and actin co-located in immunofluorescence experiments with whole-mount PSC (the white arrows in Figure 3), which corroborates our interaction data. The role of 14-3-3 proteins in the maintenance of cell shape has been described, with an abnormal morphology in mammalian cells after blocking the binding of 14-3-3 proteins to their targets⁵⁹ *E. granulosus* actin filament-fragmenting protein (EgAFFP) is involved in the dynamic rearrangements of the cytoskeleton.⁶⁰ Overall, our results suggest that Eg14-3-3 proteins could regulate cytoskeleton dynamic rearrangements, which are required for several *E. granulosus* key cellular and developmental processes, such as motility, cytokinesis and cytoplasmic organization.⁶¹

Several proteins that are involved in transcription, RNA processing and translation were found as partners of Eg14-3-3 isoforms. In previous studies, 14-3-3 proteins have been functionally implicated in signal transduction cascades and gene expression.^{10,11,13,62} The suggested involvement of Eg14-3-3 in the regulation of transcription, RNA processing and translation deserves future investigation to elucidate the role of these proteins in *E. granulosus* survival, development and adaptability.

Our results also suggest Eg14-3-3 participation in membrane protein delivery to the cell surface, as proteins that are involved in intracellular trafficking were found among Eg14-3-3-binding partners. Proteins that are targeted to membrane/extracellular exposure by Eg14-3-3 could represent important players in host-parasite cross talk, mediating processes such as cell signaling or even immunomodulation. The modulation of the cell-surface targeting of key membrane proteins by 14-3-3 proteins is a physiologically important regulatory mechanism.⁶³

The G1Y162 protein and tetraspanin could represent potential targets for membrane/extracellular exposure by the Eg14-3-3.3 isoform. Once in the membrane/extracellular space, these proteins may contribute to immunoregulatory events at the host-parasite interface during infection and represent valuable vaccine and drug target candidates.^{56,64,65} This contribution is especially

interesting for the G1Y162 protein, as this protein is only similar to proteins from parasites such as *Echinococcus* spp. and *Taenia* spp. Moreover, tetraspanins are protein markers of extracellular vesicles, such as exosomes. Because extracellular vesicles are emerging as novel mechanisms of intercellular communication, being involved in antigen presentation, immunity, and pathogen transmission,⁶⁶ it is interesting to speculate a possible role for the Eg14-3-3.3-tetraspanin interaction in this context.

Although Eg14-3-3.1-4 have all been previously detected among PSC ES products,⁹ proteins from extracellular structures were mainly found among Eg14-3-3.3 isoform-binding targets. Since eukaryotic 14-3-3 proteins are involved in the regulation of cell-matrix interactions, motility and migration,⁶⁷ our results suggest that the Eg14-3-3.3 isoform could participate in matrix-mediated cell adhesion and signaling events at the *E. granulosus* host-parasite interface. The standardized methods for the assessment of *Echinococcus* protein-protein interactions also paved the way for the investigation of interactions between Eg14-3-3 and host proteins found in the HCF.

CONCLUDING REMARKS

Despite the enormous advances that have been made in the field of 14-3-3 biochemistry, additional studies are necessary to understand the biological implications of 14-3-3 protein interactions. Global studies, such as ours, are useful for a better understanding of the 14-3-3 interactome. Moreover, the study of a parasitic organism allowed us to investigate the 14-3-3-specific interactions that may be relevant for parasite biology, including host-parasite interactions. Eg14-3-3.1-4 isoforms expression patterns were established for *E. granulosus* metacestode components, including those that interact directly with the host (CW and PSC tegument), suggesting possible roles for these proteins in the molecular mechanisms of host-parasite cross-talk, such as immunomodulation. A set of 95 Eg14-3-3 protein ligands was identified with a wide range of biological functions, indicating that Eg14-3-3 proteins are involved in multiple molecular pathways in *E. granulosus*. Among the Eg14-3-3-binding partners, some were previously described for 14-3-3 proteins of other organisms, but new 14-3-3 protein

interactions were also reported that could represent parasite-specific protein interactions. Our results revealed that Eg14-3-3 isoforms have shared partners, indicating some overlapping functions, but that they also bind exclusive proteins, suggesting specialized functions. Moreover, the protein ligands that are shared by Eg14-3-3 isoforms were mostly involved in general functions, while isoform-specific binding partners were additionally implicated in more specialized functions, such as RNA processing and intracellular trafficking and secretion. In this scenario, the Eg14-3-3.3 isoform is noteworthy, with its binding partners representing the widest range of functional categories. The characterization of the Eg14-3-3 expression pattern and ligand set indicate important roles for these proteins and their relevance for parasite development and host interactions.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* Henrique B. Ferreira, Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Caixa Postal 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 7768; fax: +55 51 3308 7309. E-mail: henrique@cbiot.ufrgs.br.

**Author Contributions: These authors contributed equally to this work.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Magdalena Zarowiecki (Parasite Genomics Group, Wellcome Trust Sanger Institute) for *Echinococcus* genomic and transcriptomic data, Dr. Sarah Meek for helpful discussions about the 14-3-3 gel overlay experiments and Dr. Claudia Elizabeth Thompson for help with phylogenetic analyses and 3D-modeling. We also thank the Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio, Campinas, Brazil) (under proposals MAS-13423 and MAS-16458) and Uniprote-MS (Cbiot/UFRGS) for LC-MS/MS analyses and the Centro de Microscopia Eletrônica (UFRGS) for technical support with confocal microscopy. This work was supported by CAPES (AUX-PE-PARASITOLOGIA-1278/2011) and CNPq (Proj. 490923/2008-9) in Brazil and by CONICYT and FONDECYT (1130113 and 1130717) in Chile. A.T. was a recipient of a CAPES PhD fellowship, D.M.V. was a recipient of a CAPES M.Sc fellowship, K.M.M. was a recipient of a

PRODOC/CAPES postdoctoral fellowship, B.V.M. was a recipient of a FAPERGS graduate fellowship, and C.S.D. was a recipient of a FAPERGS graduate fellowship.

The authors have declared no conflicts of interest.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information Available

Supplementary tables and figures. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Table S1. Diagrammatic representation of the exon-intron structures of *E. granulosus* 14-3-3 genes (*Eg14-3-3.1–6*).

Table S2. Identity/similarity levels (%) between Eg14-3-3 proteins and 14-3-3 proteins from selected organisms.

Table S3. Quality data models of Eg14-3-3 structural modeling.

Table S4. Protoscolex proteins that were identified by 2-DE/MALDI-Q-TOF MS/MS.

Table S5. MS data from Sulfo-SBED cross linking assays.

Table S6. MS data from Eg14-3-3-affinity chromatography.

Figure S1. Diagrammatic representation of the exon-intron structures of *E. granulosus* (*Eg14-3-3.1–Eg14-3-3.6*) genes.

Figure S2. Multiple alignment of the Eg14-3-3 amino acid sequences.

Figure S3. Phylogenetic analysis of the Eg14-3-3 proteins.

Figure S4. Specificity analysis of anti-Eg14-3-3 antibodies by immunoblot using recombinant proteins.

Figure S5. Analysis of the spatial expression pattern of Eg14-3-3 isoforms by immunofluorescence in *E. granulosus* protoscolex sections.

Figure S6. One-dimensional gel overlay analysis of the R18 peptide effect on Eg14-3-3 recombinant binding to protoscolex proteins.

REFERENCES

1. Nakao, M.; Lavikainen, A.; Yanagida, T.; Ito, A., Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Int J Parasitol* 2013, 43, (12-13), 1017-29.
2. Balbinotti, H.; Santos, G. B.; Badaraco, J.; Arend, A. C.; Graichen, D.; Haag, K. L.; Zaha, A., *Echinococcus orteppi* (G5) and *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Vet Parasitol* 2012, 188, (3-4), 255-60.
3. Alvarez Rojas, C. A.; Romig, T.; Lightowers, M. W., *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes infecting humans--review of current knowledge. *Int J Parasitol* 2014, 44, (1), 9-18.
4. de la Rue, M. L.; Takano, K.; Brochado, J. F.; Costa, C. V.; Soares, A. G.; Yamano, K.; Yagi, K.; Katoh, Y.; Takahashi, K., Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. orteppi* in Southern Brazil. *Vet Parasitol* 2011, 177, (1-2), 97-103.
5. Díaz, A.; Casaravilla, C.; Irigoín, F.; Lin, G.; Previato, J. O.; Ferreira, F., Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol* 2011, 27, (5), 204-13.
6. Siracusano, A.; Riganò, R.; Ortona, E.; Profumo, E.; Margutti, P.; Buttari, B.; Delunardo, F.; Teggi, A., Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. *Exp Parasitol* 2008, 119, (4), 483-9.
7. Monteiro, K.; de Carvalho, M.; Zaha, A.; Ferreira, H., Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics* 2010, 10, (10), 1985-1999.
8. Aziz, A.; Zhang, W.; Li, J.; Loukas, A.; McManus, D. P.; Mulvenna, J., Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J Proteomics* 2011, 74, (9), 1560-72.
9. Virginio, V. G.; Monteiro, K. M.; Drumond, F.; de Carvalho, M. O.; Vargas, D. M.; Zaha, A.; Ferreira, H. B., Excretory/secretory products from *in vitro*-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Mol Biochem Parasitol* 2012, 183, (1), 15-22.
10. Pozuelo Rubio, M.; Geraghty, K. M.; Wong, B. H.; Wood, N. T.; Campbell, D. G.; Morrice, N.; Mackintosh, C., 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J* 2004, 379, (Pt 2), 395-408.
11. Kjarland, E.; Keen, T. J.; Kleppe, R., Does isoform diversity explain functional differences in the 14-3-3 protein family? *Curr Pharm Biotechnol* 2006, 7, (3), 217-23.
12. Lalle, M.; Camerini, S.; Cecchetti, S.; Sayadi, A.; Crescenzi, M.; Pozio, E., Interaction network of the 14-3-3 protein in the ancient protozoan parasite *Giardia duodenalis*. *J Proteome Res* 2012, 11, (5), 2666-83.

13. Bridges, D.; Moorhead, G., 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE* 2005, 2005, (296), re10.
14. Victor, B.; Kanobana, K.; Gabriël, S.; Polman, K.; Deckers, N.; Dorny, P.; Deelder, A. M.; Palmblad, M., Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion-secretion proteins. *Proteomics* 2012, 12, (11), 1860-9.
15. Zheng, H.; Zhang, W.; Zhang, L.; Zhang, Z.; Li, J.; Lu, G.; Zhu, Y.; Wang, Y.; Huang, Y.; Liu, J.; Kang, H.; Chen, J.; Wang, L.; Chen, A.; Yu, S.; Gao, Z.; Jin, L.; Gu, W.; Wang, Z.; Zhao, L.; Shi, B.; Wen, H.; Lin, R.; Jones, M. K.; Brejova, B.; Vinar, T.; Zhao, G.; McManus, D. P.; Chen, Z.; Zhou, Y.; Wang, S., The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat Genet* 2013, 45, (10), 1168-75.
16. Siles-Lucas, M.; Merli, M.; Gottstein, B., 14-3-3 proteins in *Echinococcus*: their role and potential as protective antigens. *Exp Parasitol* 2008, 119, (4), 516-23.
17. Salazar-Anton, F.; Lindh, J., *Taenia solium*: a two-dimensional Western blotting method combined with the use of an EST-library for the identification of immunogenic proteins recognized by sera from neurocysticercosis patients. *Exp Parasitol* 2011, 128, (4), 371-6.
18. Tsai, I. J.; Zarowiecki, M.; Holroyd, N.; Garcarrubio, A.; Sanchez-Flores, A.; Brooks, K. L.; Tracey, A.; Bobes, R. J.; Fragoso, G.; Scitutto, E.; Aslett, M.; Beasley, H.; Bennett, H. M.; Cai, J.; Camicia, F.; Clark, R.; Cucher, M.; De Silva, N.; Day, T. A.; Deplazes, P.; Estrada, K.; Fernández, C.; Holland, P. W.; Hou, J.; Hu, S.; Huckvale, T.; Hung, S. S.; Kamenetzky, L.; Keane, J. A.; Kiss, F.; Koziol, U.; Lambert, O.; Liu, K.; Luo, X.; Luo, Y.; Macchiaroli, N.; Nichol, S.; Paps, J.; Parkinson, J.; Pouchkina-Stantcheva, N.; Riddiford, N.; Rosenzvit, M.; Salinas, G.; Wasmuth, J. D.; Zamanian, M.; Zheng, Y.; Cai, X.; Soberón, X.; Olson, P. D.; Lacleste, J. P.; Brehm, K.; Berriman, M.; Consortium, T. s. G., The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 2013, 496, (7443), 57-63.
19. Fernández, C.; Gregory, W.; Loke, P.; Maizels, R., Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Mol Biochem Parasitol* 2002, 122, (2), 171-80.
20. Siles-Lucas, M.; Nunes, C.; Zaha, A.; Breijo, M., The 14-3-3 protein is secreted by the adult worm of *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunol* 2000, 22, (10), 521-8.
21. Besemer, J.; Borodovsky, M., GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses. *Nucleic Acids Res* 2005, 33, (Web Server issue), W451-4.
22. Salamov, A. A.; Solovyev, V. V., Ab initio gene finding in *Drosophila* genomic DNA. *Genome Res* 2000, 10, (4), 516-22.
23. Burge, C. B.; Karlin, S., Finding the genes in genomic DNA. *Curr Opin Struct Biol* 1998, 8, (3), 346-54.

24. Saitou, N.; Nei, M., The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987, 4, (4), 406-25.
25. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipinski, A.; Kumar, S., MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013, 30, (12), 2725-9.
26. da Fonsêca, M. M.; Zaha, A.; Caffarena, E. R.; Vasconcelos, A. T., Structure-based functional inference of hypothetical proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Mol Model* 2012, 18, (5), 1917-25.
27. Yang, X.; Lee, W.; Sobott, F.; Papagrigoriou, E.; Robinson, C.; Grossmann, J.; Sundström, M.; Doyle, D.; Elkins, J., Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103, (46), 17237-42.
28. Würtele, M.; Jelich-Ottmann, C.; Wittinghofer, A.; Oecking, C., Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex. *EMBO J* 2003, 22, (5), 987-94.
29. Takala, H.; Nurminen, E.; Nurmi, S. M.; Aatonen, M.; Strandin, T.; Takatalo, M.; Kiema, T.; Gahmberg, C. G.; Ylännä, J.; Fagerholm, S. C., Beta2 integrin phosphorylation on Thr758 acts as a molecular switch to regulate 14-3-3 and filamin binding. *Blood* 2008, 112, (5), 1853-62.
30. Liu, D.; Bienkowska, J.; Petosa, C.; Collier, R. J.; Fu, H.; Liddington, R., Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* 1995, 376, (6536), 191-4.
31. Molzan, M.; Weyand, M.; Rose, R.; Ottmann, C., Structural insights of the MLF1/14-3-3 interaction. *FEBS J* 2012, 279, (4), 563-71.
32. Brokx, S. J.; Wernimont, A. K.; Dong, A.; Wasney, G. A.; Lin, Y. H.; Lew, J.; Vedadi, M.; Lee, W. H.; Hui, R., Characterization of 14-3-3 proteins from *Cryptosporidium parvum*. *PLoS One* 2011, 6, (8), e14827.
33. Eswar, N.; Webb, B.; Marti-Renom, M. A.; Madhusudhan, M. S.; Eramian, D.; Shen, M. Y.; Pieper, U.; Sali, A., Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci* 2007, Chapter 2, Unit 2.9.
34. Lorenzatto, K. R.; Monteiro, K. M.; Paredes, R.; Paludo, G. P.; da Fonsêca, M. M.; Galanti, N.; Zaha, A.; Ferreira, H. B., Fructose-bisphosphate aldolase and enolase from *Echinococcus granulosus*: genes, expression patterns and protein interactions of two potential moonlighting proteins. *Gene* 2012, 506, (1), 76-84.
35. Paredes, R.; Jiménez, V.; Cabrera, G.; Iragüen, D.; Galanti, N., Apoptosis as a possible mechanism of infertility in *Echinococcus granulosus* hydatid cysts. *J Cell Biochem* 2007, 100, (5), 1200-9.
36. Koziol, U.; Krohne, G.; Brehm, K., Anatomy and development of the larval nervous system in *Echinococcus multilocularis*. *Front Zool* 2013, 10, (1), 24.
37. Meek, S.; Lane, W.; Piwnica-Worms, H., Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. *J Biol Chem* 2004, 279, (31), 32046-54.

38. Keller, A.; Nesvizhskii, A. I.; Kolker, E.; Aebersold, R., Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 2002, 74, (20), 5383-92.
39. Nesvizhskii, A. I.; Keller, A.; Kolker, E.; Aebersold, R., A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2003, 75, (17), 4646-58.
40. Tatusov, R. L.; Fedorova, N. D.; Jackson, J. D.; Jacobs, A. R.; Kiryutin, B.; Koonin, E. V.; Krylov, D. M.; Mazumder, R.; Mekhedov, S. L.; Nikolskaya, A. N.; Rao, B. S.; Smirnov, S.; Sverdlov, A. V.; Vasudevan, S.; Wolf, Y. I.; Yin, J. J.; Natale, D. A., The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 2003, 4, 41.
41. Powell, S.; Forslund, K.; Szklarczyk, D.; Trachana, K.; Roth, A.; Huerta-Cepas, J.; Gabaldón, T.; Rattei, T.; Creevey, C.; Kuhn, M.; Jensen, L. J.; von Mering, C.; Bork, P., eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. *Nucleic Acids Res* 2014, 42, (Database issue), D231-9.
42. Ferl, R. J.; Manak, M. S.; Reyes, M. F., The 14-3-3s. *Genome Biol* 2002, 3, (7), REVIEWS3010.
43. Benzinger, A.; Popowicz, G.; Joy, J.; Majumdar, S.; Holak, T.; Hermeking, H., The crystal structure of the non-liganded 14-3-3sigma protein: insights into determinants of isoform specific ligand binding and dimerization. *Cell Res* 2005, 15, (4), 219-27.
44. Gardino, A.; Smerdon, S.; Yaffe, M., Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Semin Cancer Biol* 2006, 16, (3), 173-82.
45. Obsil, T.; Obsilova, V., Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol* 2011, 22, (7), 663-72.
46. Andrade, M.; Siles-Lucas, M.; Espinoza, E.; Pérez Arellano, J.; Gottstein, B.; Muro, A., *Echinococcus multilocularis* laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages *in vitro*. *Nitric Oxide* 2004, 10, (3), 150-5.
47. Shimada, T.; Fournier, A. E.; Yamagata, K., Neuroprotective function of 14-3-3 proteins in neurodegeneration. *Biomed Res Int* 2013, 2013, 564534.
48. Gygi, S. P.; Corthals, G. L.; Zhang, Y.; Rochon, Y.; Aebersold, R., Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97, (17), 9390-5.
49. Chang, I. F.; Curran, A.; Woolsey, R.; Quilici, D.; Cushman, J. C.; Mittler, R.; Harmon, A.; Harper, J. F., Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* 2009, 9, (11), 2967-85.
50. Pauly, B.; Lasi, M.; MacKintosh, C.; Morrice, N.; Imhof, A.; Regula, J.; Rudd, S.; David, C. N.; Böttger, A., Proteomic screen in the simple metazoan *Hydra* identifies 14-3-3 binding proteins implicated in cellular metabolism, cytoskeletal organisation and Ca²⁺ signalling. *BMC Cell Biol* 2007, 8, 31.

51. Alexander, R. D.; Morris, P. C., A proteomic analysis of 14-3-3 binding proteins from developing barley grains. *Proteomics* 2006, 6, (6), 1886-96.
52. Paul, A. L.; Denison, F. C.; Schultz, E. R.; Zupanska, A. K.; Ferl, R. J., 14-3-3 phosphoprotein interaction networks - does isoform diversity present functional interaction specification? *Front Plant Sci* 2012, 3, 190.
53. Uhart, M.; Bustos, D. M., Protein intrinsic disorder and network connectivity. The case of 14-3-3 proteins. *Front Genet* 2014, 5, 10.
54. Swatek, K. N.; Graham, K.; Agrawal, G. K.; Thelen, J. J., The 14-3-3 isoforms chi and epsilon differentially bind client proteins from developing *Arabidopsis* seed. *J Proteome Res* 2011, 10, (9), 4076-87.
55. Kleppe, R.; Martinez, A.; Døskeland, S. O.; Haavik, J., The 14-3-3 proteins in regulation of cellular metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 2011, 22, (7), 713-9.
56. Parkinson, J.; Wasmuth, J. D.; Salinas, G.; Bizarro, C. V.; Sanford, C.; Berriman, M.; Ferreira, H. B.; Zaha, A.; Blaxter, M. L.; Maizels, R. M.; Fernández, C., A transcriptomic analysis of *Echinococcus granulosus* larval stages: implications for parasite biology and host adaptation. *PLoS Negl Trop Dis* 2012, 6, (11), e1897.
57. Chernik, I. S.; Seit-Nebi, A. S.; Marston, S. B.; Gusev, N. B., Small heat shock protein Hsp20 (HspB6) as a partner of 14-3-3gamma. *Mol Cell Biochem* 2007, 295, (1-2), 9-17.
58. Pan, D.; Das, S.; Bera, A. K.; Bandyopadhyay, S.; De, S.; Rana, T.; Das, S. K.; Suryanaryana, V. V.; Deb, J.; Bhattacharya, D., Molecular and biochemical mining of heat-shock and 14-3-3 proteins in drug-induced protoscolices of *Echinococcus granulosus* and the detection of a candidate gene for anthelmintic resistance. *J Helminthol* 2011, 85, (2), 196-203.
59. Jin, J.; Smith, F. D.; Stark, C.; Wells, C. D.; Fawcett, J. P.; Kulkarni, S.; Metalnikov, P.; O'Donnell, P.; Taylor, P.; Taylor, L.; Zougman, A.; Woodgett, J. R.; Langeberg, L. K.; Scott, J. D.; Pawson, T., Proteomic, functional, and domain-based analysis of *in vivo* 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol* 2004, 14, (16), 1436-50.
60. Grimm, E.; Portugal, R.; de Oliveira Neto, M.; Martins, N.; Polikarpov, I.; Zaha, A.; Ferreira, H., Structural analysis of an *Echinococcus granulosus* actin-fragmenting protein by small-angle x-ray scattering studies and molecular modeling. *Biophys J* 2006, 90, (9), 3216-23.
61. Zhou, Q.; Kee, Y. S.; Poirier, C. C.; Jelinek, C.; Osborne, J.; Divi, S.; Surcel, A.; Will, M. E.; Eggert, U. S.; Müller-Taubenberger, A.; Iglesias, P. A.; Cotter, R. J.; Robinson, D. N., 14-3-3 coordinates microtubules, Rac, and myosin II to control cell mechanics and cytokinesis. *Curr Biol* 2010, 20, (21), 1881-9.
62. Gardino, A. K.; Yaffe, M. B., 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* 2011, 22, (7), 688-95.
63. Smith, A. J.; Daut, J.; Schwappach, B., Membrane proteins as 14-3-3 clients in functional regulation and intracellular transport. *Physiology (Bethesda)* 2011, 26, (3), 181-91.

64. Dang, Z.; Yagi, K.; Oku, Y.; Kouguchi, H.; Kajino, K.; Watanabe, J.; Matsumoto, J.; Nakao, R.; Wakaguri, H.; Toyoda, A.; Sugimoto, C., Evaluation of *Echinococcus multilocularis* tetraspanins as vaccine candidates against primary alveolar echinococcosis. *Vaccine* 2009, 27, (52), 7339-45.
65. Katoh, Y.; Kouguchi, H.; Matsumoto, J.; Goto, A.; Suzuki, T.; Oku, Y.; Yagi, K., Characterization of emY162 encoding an immunogenic protein cloned from an adult worm-specific cDNA library of *Echinococcus multilocularis*. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1780, (1), 1-6.
66. Perez-Hernandez, D.; Gutiérrez-Vázquez, C.; Jorge, I.; López-Martín, S.; Ursa, A.; Sánchez-Madrid, F.; Vázquez, J.; Yáñez-Mó, M., The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem* 2013, 288, (17), 11649-61.
67. Goc, A.; Abdalla, M.; Al-Azayzih, A.; Somanath, P. R., Rac1 activation driven by 14-3-3 ζ dimerization promotes prostate cancer cell-matrix interactions, motility and transendothelial migration. *PLoS One* 2012, 7, (7), e40594.

Table 1: Eg14-3-3 protein ligands that were identified in PSC extracts from *E. granulosus*

Protein name	Protein accession numbers ^a	Functional classification ^b	Eg14-3-3 isoform ^c			
			Eg14-3-3.1	Eg14-3-3.2	Eg14-3-3.3	Eg14-3-3.4
Exclusive Eg14-3-3.1-binding proteins						
heat shock protein 70	EgrG_001065400	O	c			
sco cytochrome oxidase deficient protein 1	EgrG_000228900	C	c			
dynein light chain	EgrG_000940500	Z	c			
inosine 5' monophosphate dehydrogenase 2	EgrG_000120200	F	c			
ras protein Rab 27A	EgrG_000347300	U	c			
rho gdp dissociation inhibitor	EgrG_001152900	T	c			
ribosomal protein L11	EgrG_000177700	J	c			
Exclusive Eg14-3-3.2-binding proteins						
glycerol 3 phosphate dehydrogenase	EgrG_000964600	C		c		
succinyl coenzyme A synthetase alpha subunit	EgrG_001199000	C		c		
synaptic vesicle membrane protein VAT 1	EgrG_000935200	C		a		
actin protein 2B	EgrG_000801400	Z		c		
actin protein 3B	EgrG_000292600	Z		c		
profilin	EgrG_000122100	Z		c		
tubulin beta 2C chain	EgrG_000672200	Z		a		
hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase	EgrG_000758800	F		c		
dehydrogenase:reductase SDR family	EgrG_000410100	Q		c		
transmembrane emp24 domain containing protein	EgrG_000574700	U		c		
threonyl tRNA synthetase C	EgrG_000375800	J		c		
protease inhibitor serine	EgrG_001193100	V		c		
atlastin 2	EgrG_000707700	R		a		
ras protein Rap 1b	EgrG_000859400	R		c		
programmed cell death 6 interacting protein	EgrG_000997530	R		c		
Exclusive Eg14-3-3.3-binding proteins						
dolichyl diphosphooligosaccharide protein	EgrG_000996800	O			c	
heat shock 10 kDa protein 1	EgrG_000320800	O			c	
heat shock protein 90 alpha	EgrG_000008700	O			a	
acetyl coenzyme A hydrolase transferase	EgrG_001087900	C			c	
aldehyde dehydrogenase mitochondrial	EgrG_000389100	C			c	
lactate dehydrogenase a	EgrG_000660800	C			c	
NADP dependent malic enzyme	EgrG_000645800	C			c	
dynein heavy chain	EgrG_000832000	Z			c	

fascin 2	EgrG_000181100	Z				<i>c</i>
GTP binding protein SAR1b	EgrG_000100200	U				<i>c</i>
ras protein Rab 2A	EgrG_000430800	U				<i>c</i>
abnormal embryogenesis family member emb 9	EgrG_000144400	W				<i>a</i>
collagen alpha 1V chain	EgrG_000144300	W				<i>a</i>
G1Y162 protein	EgrG_000515900	W				<i>c</i>
integrin beta 2	EgrG_000528400	W				<i>c</i>
basement membrane specific heparan sulfate	EgrG_000701800	T				<i>a</i>
40s ribosomal protein S16	EgrG_000821300	J				<i>c</i>
arginyl tRNA synthetase cytoplasmic	EgrG_000348100	J				<i>c</i>
elongation factor 1 alpha	EgrG_000982200	J				<i>a</i>
PUR alpha protein	EgrG_000780600	K				<i>c</i>
zinc finger protein 26	EgrG_000920300	K				<i>c</i>
pre mRNA processing factor 39	EgrG_000379000	A				<i>c</i>
expressed conserved protein	EgrG_000470500	S				<i>c</i>
tetraspanin	EgrG_000355700	S				<i>c</i>
protein memo1	EgrG_000237250	R				<i>c</i>
major vault protein	EgrG_000142500	No KOG				<i>a</i>
Exclusive Eg14-3-3.4-binding proteins						
carbonyl reductase 1	EgrG_000115200	Q				<i>c</i>
seryl tRNA Synthetase	EgrG_001197300	J				<i>t</i>
splicing factor 3b subunit 3	EgrG_000633300	A				<i>c</i>
Complete sharing by four Eg14-3-3 isoforms						
6 phosphofruktokinase	EgrG_001128600	G	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
enolase	EgrG_000514200	G	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
fructose 1,6 bisphosphate aldolase	EgrG_000905600	G	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
glucose 6 phosphate isomerase	EgrG_000626300	G	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	EgrG_000254600	G	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
phosphoglycerate mutase	EgrG_000799500	G	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t/c</i>	<i>t</i>
heat shock 70 kDa protein 4	EgrG_001085400	O	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>a</i>	<i>t/a</i>
Eg14-3-3.1	EgrG_001192500	O	<i>t/a</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
protein disulfide isomerase A3	EgrG_001022300	O	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
citrate synthase	EgrG_001028500	C	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
cytosolic malate dehydrogenase	EgrG_000417100	C	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
phosphoenolpyruvate carboxykinase	EgrG_000292700	C	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t/a</i>	<i>t</i>
F actin capping protein subunit beta	EgrG_000772300	Z	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>

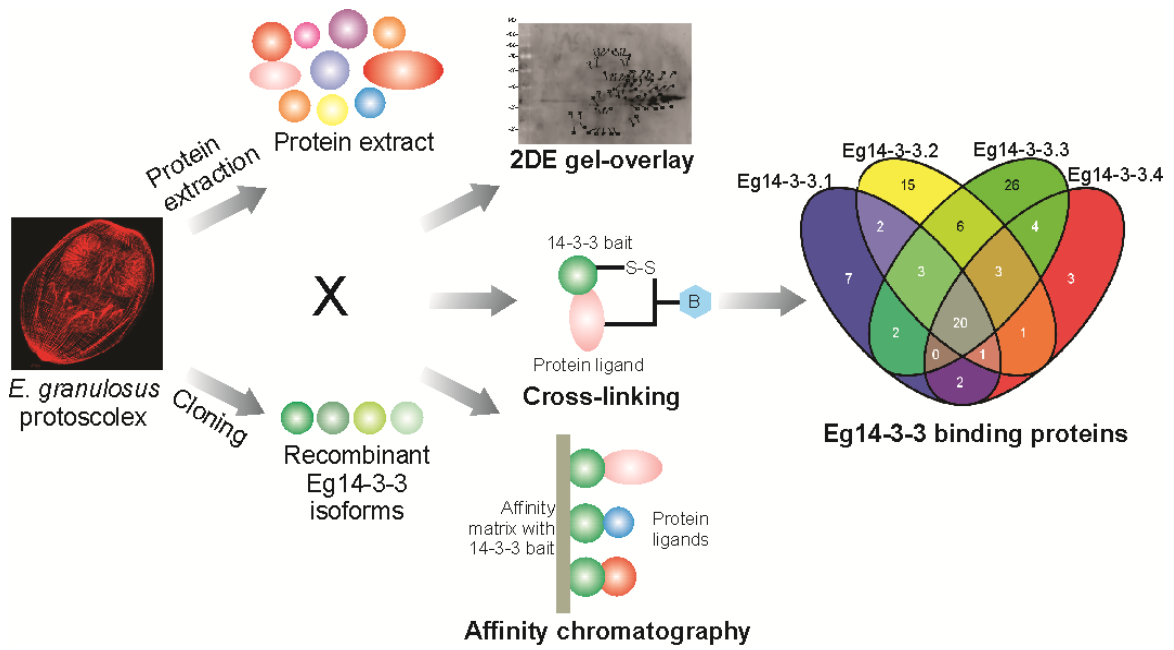
gelsolin	EgrG_000882300	Z	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
methylthioadenosine phosphorylase	EgrG_000622900	F	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
aspartate aminotransferase mitochondrial	EgrG_001134100	E	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
UDP glucose 4 epimerase	EgrG_000984800	M	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
annexin	EgrG_000244000	U	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
cAMP dependent protein kinase regulatory	EgrG_000775600	T	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
major egg antigen p40	EgrG_000212700	No KOG	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t/a</i>	<i>t</i>
Partial sharing by two or three Eg14-3-3 isoforms						
alpha N acetylgalactosaminidase	EgrG_000340500	G	<i>c</i>	<i>c</i>		
phosphoglycerate kinase 1	EgrG_001043100	G	<i>t</i>	<i>t</i>		<i>t</i>
UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase	EgrG_000843500	G		<i>c</i>	<i>c</i>	
Eg14-3-3.2	EgrG_000231300	O		<i>t/a</i>	<i>t</i>	
Eg14-3-3.3	EgrG_000364000	O		<i>t</i>	<i>t/a</i>	<i>t</i>
Eg14-3-3.4	EgrG_001060100	O		<i>t</i>		<i>t/c/a</i>
heat shock protein 60	EgrG_001190900	O	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	
ubiquitin carboxyl terminal hydrolase 7	EgrG_000875300	O			<i>c</i>	<i>c</i>
ubiquitin modifier activating enzyme 1	EgrG_000711500	O		<i>c</i>	<i>c</i>	
polyubiquitin	EgrG_000516500	O			<i>c</i>	<i>c</i>
actin	EgrG_000061200	Z	<i>t</i>			<i>t</i>
actin cytoplasmic type 5	EgrG_000190400	Z			<i>a</i>	<i>a</i>
fimbrin	EgrG_000786800	Z	<i>c</i>		<i>c</i>	
filamin	EgrG_000859700	Z			<i>c</i>	<i>c</i>
kinesin heavy chain	EgrG_001025000	Z	<i>c</i>			<i>c</i>
tubulin alpha chain	EgrG_000886400	Z	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	
3 oxoacyl acyl carrier protein reductase	EgrG_000792800	Q	<i>c</i>		<i>c</i>	
glutamine: fructose 6 phosphate aminotransferase	EgrG_000097800	M		<i>c</i>	<i>c</i>	
annexin	EgrG_000193700	U		<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
collagen alpha 1(IV) chain	EgrG_000144350	W		<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
endophilin B1	EgrG_000550800	T		<i>t</i>	<i>t</i>	
expressed conserved protein	EgrG_000213800	J	<i>c</i>	<i>c</i>		
dipeptidyl peptidase 3	EgrG_001028100	R		<i>c</i>	<i>c</i>	
ETHE1 protein	EgrG_001090400	R	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>	

^aProtein accession numbers according to GeneDB (www.genedb.org).

^bFunctional classification was determined using Eukaryotic Orthologous Group (KOG).

^cEg14-3-3 isoform(s) to which the protein binds. The method(s) that was used to demonstrate binding is indicated as follows: (*t*) two-dimensional gel overlay, (*c*) cross linking assays and (*a*) affinity chromatography.

Abstract Graphic



Figures

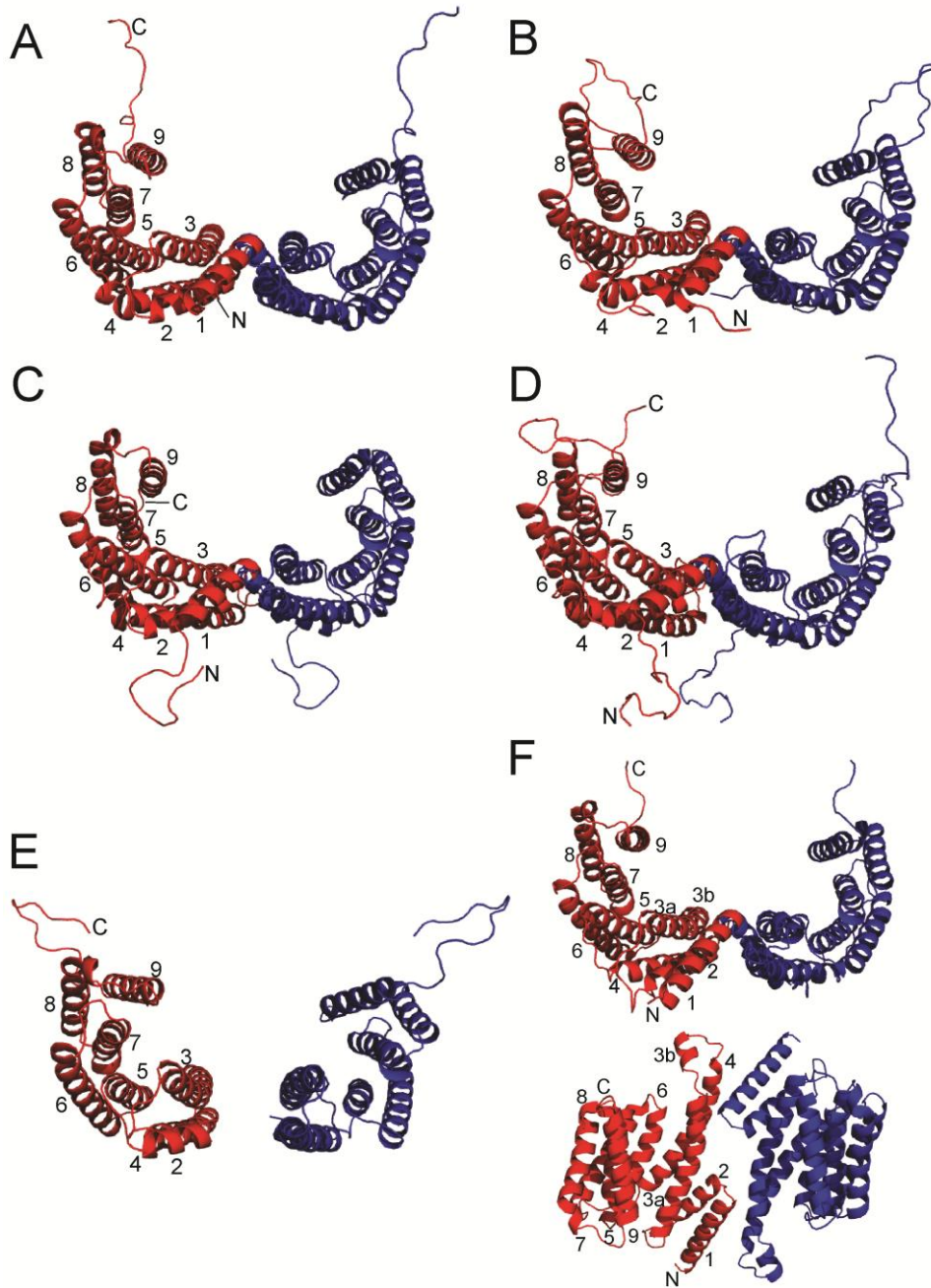


Figure 1. Modeled 3D structures of homodimers from **(A)** Eg14-3-3.1, **(B)** Eg14-3-3.2, **(C)** Eg14-3-3.3, **(D)** Eg14-3-3.4, **(E)** Eg14-3-3.5 and **(F)** Eg14-3-3.6 (in two views: the top one parallel to the helices axis, and the bottom one perpendicular to this axis). The monomers are represented by different colors (red and blue) and the α -helices are indicated by numbers, according to the text.

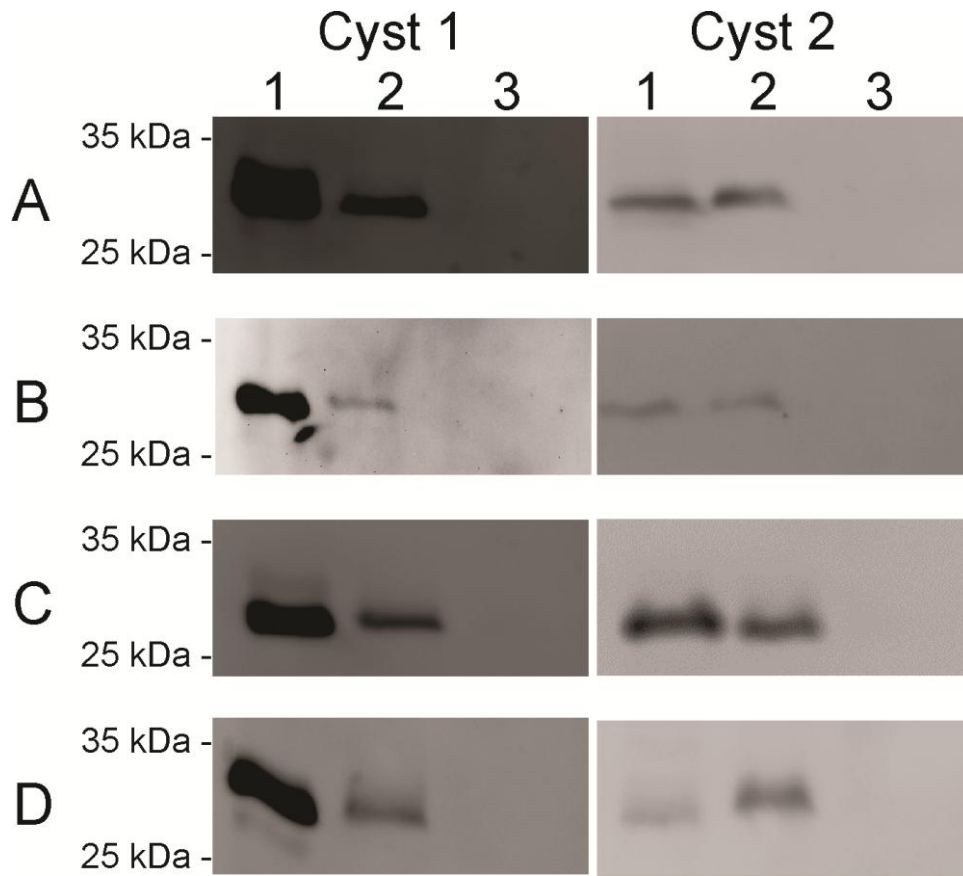


Figure 2. Analysis of the Eg14-3-3 protein expression pattern in *E. granulosus* metacestodes. Proteins from PSCs (1), GL (2) and HCF (3) were analyzed by immunoblot with isoform-specific antisera against **(A)** Eg14-3-3.1, **(B)** Eg14-3-3.2, **(C)** Eg14-3-3.3, and **(D)** Eg14-3-3.4 in individual *E. granulosus* (1 and 2) cysts.

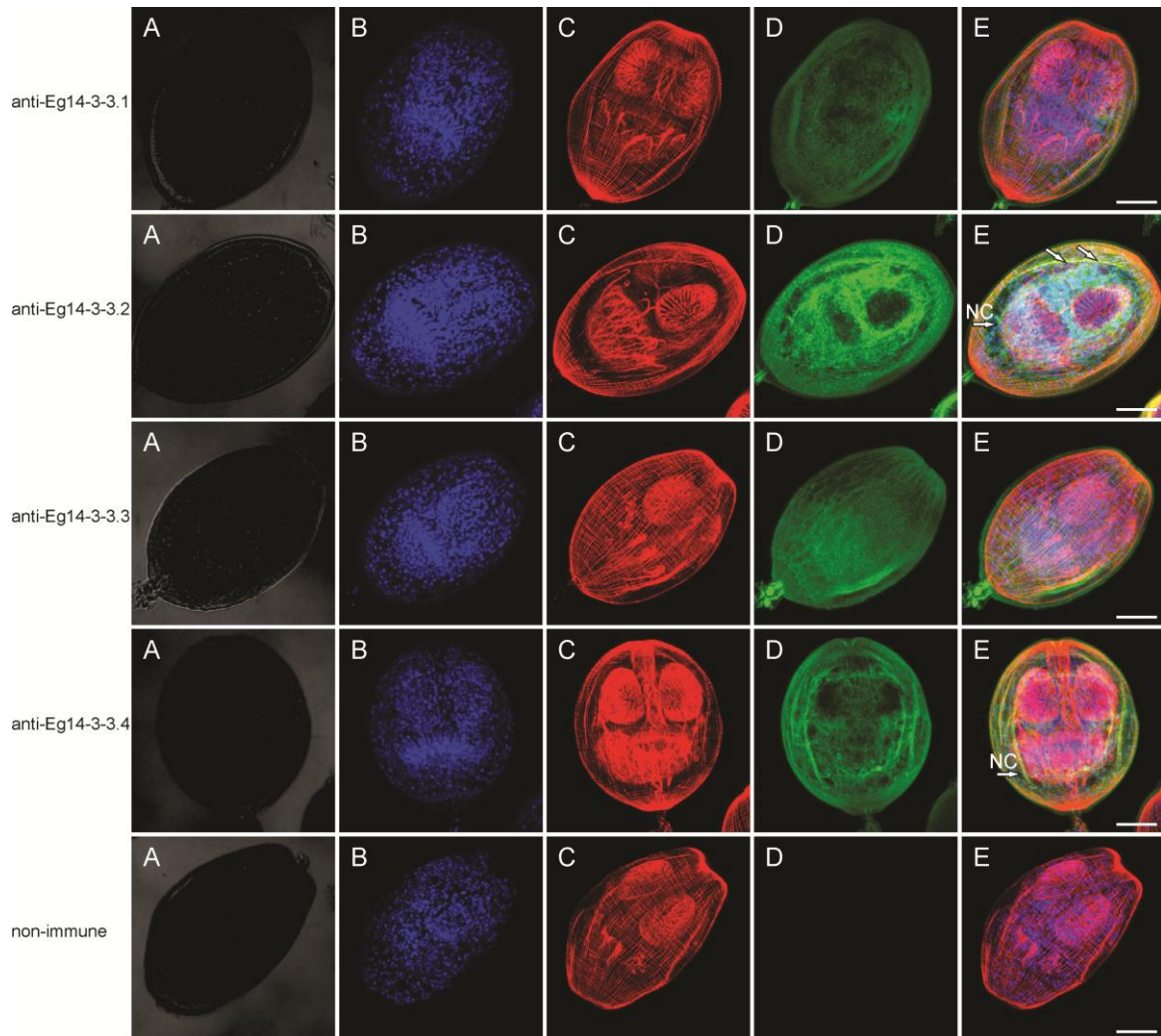


Figure 3. Analysis of the spatial expression pattern of Eg14-3-3 isoforms in *E. granulosus* whole-mount PSC by immunofluorescence. **(A)** Bright field; **(B)** DAPI nuclei staining; **(C)** phalloidin staining; **(D)** antibody staining (purified isoform-specific anti-Eg14-3-3 or non-immune IgG); **(E)** merge. Recognition of immune complexes was achieved using Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG. In the merged images, white arrows indicate co-localization of antibody staining with phalloidin staining, NC represent nerve cords; scale bars: 30 μ m.

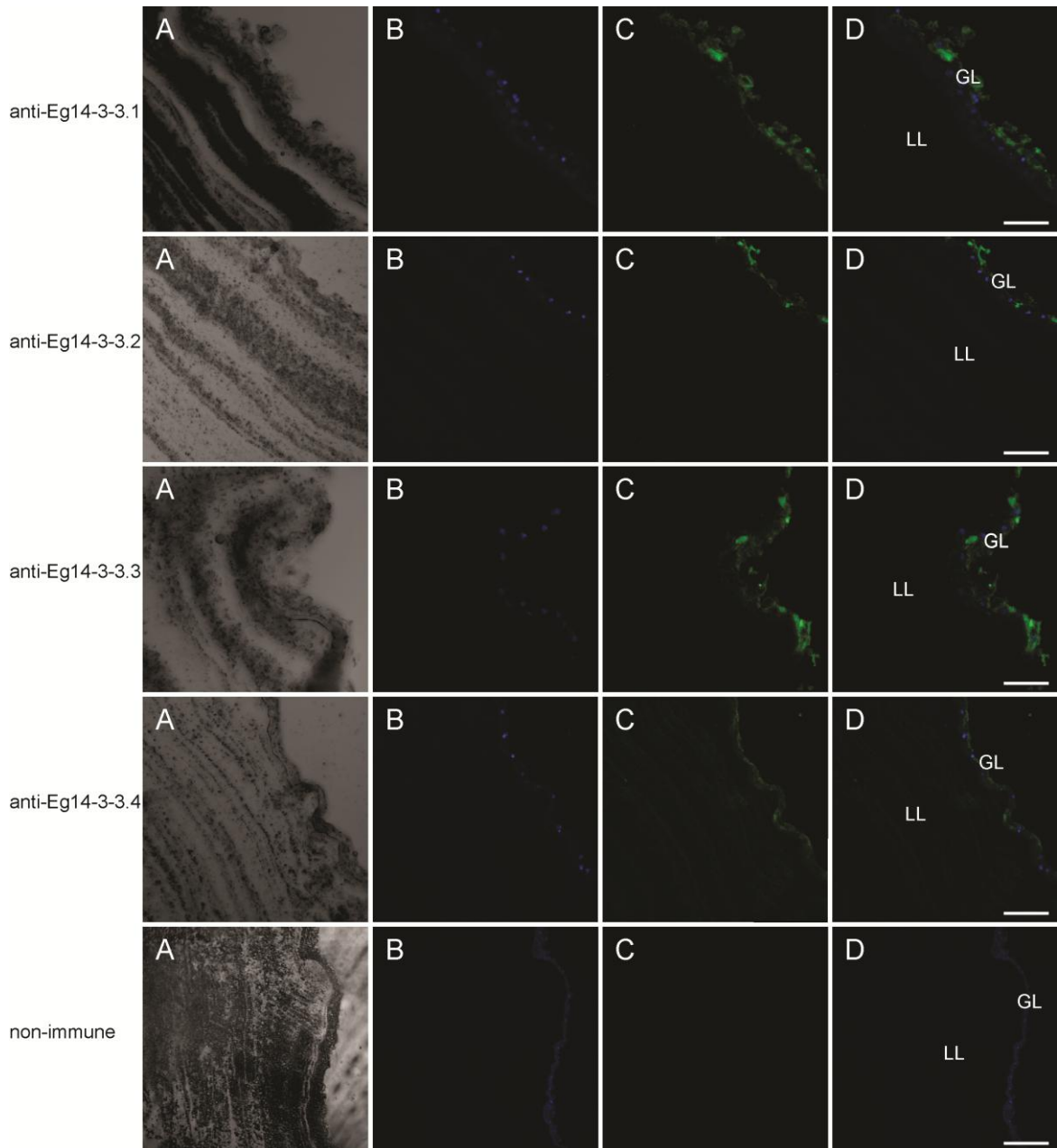


Figure 4. Analysis of Eg14-3-3 expression pattern in *E. granulosus* CW sections (5 μ m) by immunofluorescence. **(A)** bright field; **(B)** DAPI nuclei staining; **(C)** antibody staining (purified isoform-specific anti-Eg14-3-3 or non-immune IgG); **(D)** merge. Detection of immune complexes was achieved using Alexa 488-conjugated anti-rabbit secondary antibodies; scale bars: 30 μ m.

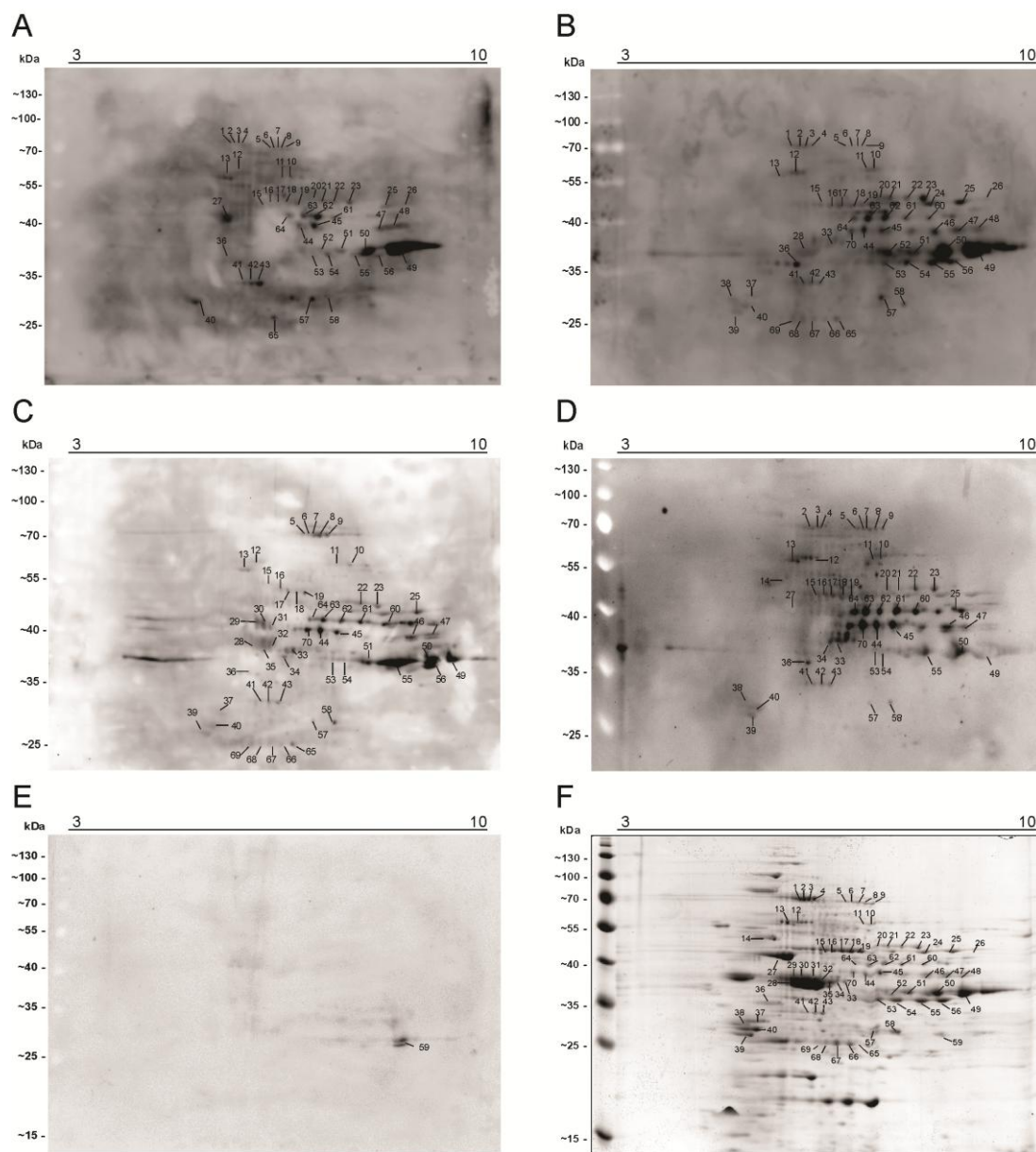


Figure 5. Detection of Eg14-3-3-binding proteins in *E. granulosus* protoscolex extract by two-dimensional gel-overlay assay. Protoscolex proteins were separated on a linear pH range of 3–10 in the first dimension and in 12% SDS-PAGE in the second dimension. The membranes were incubated with recombinant proteins (A) Eg14-3-3.1, (B) Eg14-3-3.2, (C) Eg14-3-3.3, (D) Eg14-3-3.4 or (E) GST tagged with biotin. Protein-protein interactions were detected with streptavidin-peroxidase conjugate. (F) 2-DE of *E. granulosus* protoscolex proteins showing the spots corresponding to detected Eg14-3-3-binding proteins. Spots were numbered and their MS data are shown in Supplementary Table 5. Molecular weight markers are shown on the left.

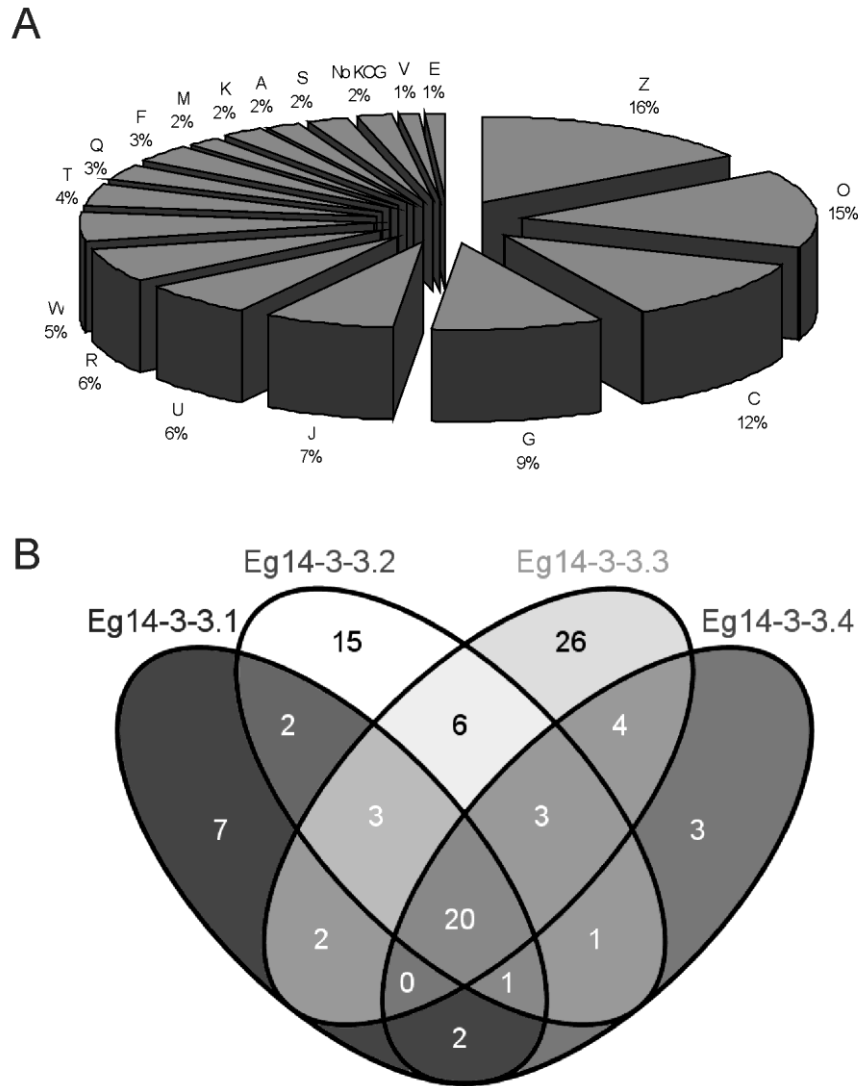


Figure 6. Functional and comparative analysis of Eg14-3-3-binding proteins. **(A)** Distribution of KOG functional categories of total identified Eg14-3-3-binding proteins. Percentages of proteins identified in each functional category are indicated in the sectors of circle. (Z) Cytoskeleton; (O) Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; (C) Energy production and conversion; (G) Carbohydrate transport and metabolism; (J) Translation; (U) Intracellular trafficking and secretion; (R) General function prediction; (W) Extracellular structures; (T) Signal transduction; (Q) Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; (F) Nucleotide metabolism and transport; (M) Cell wall/membrane/envelope biogenesis; (K) Transcription; (A) RNA processing and modification; (V) Defense mechanisms; (E) Amino acid metabolism and transport; (S) Function unknown and (No KOG) proteins were no KOG related. **(B)** Venn diagram showing the distribution of protein ligands of each Eg14-3-3 isoform.

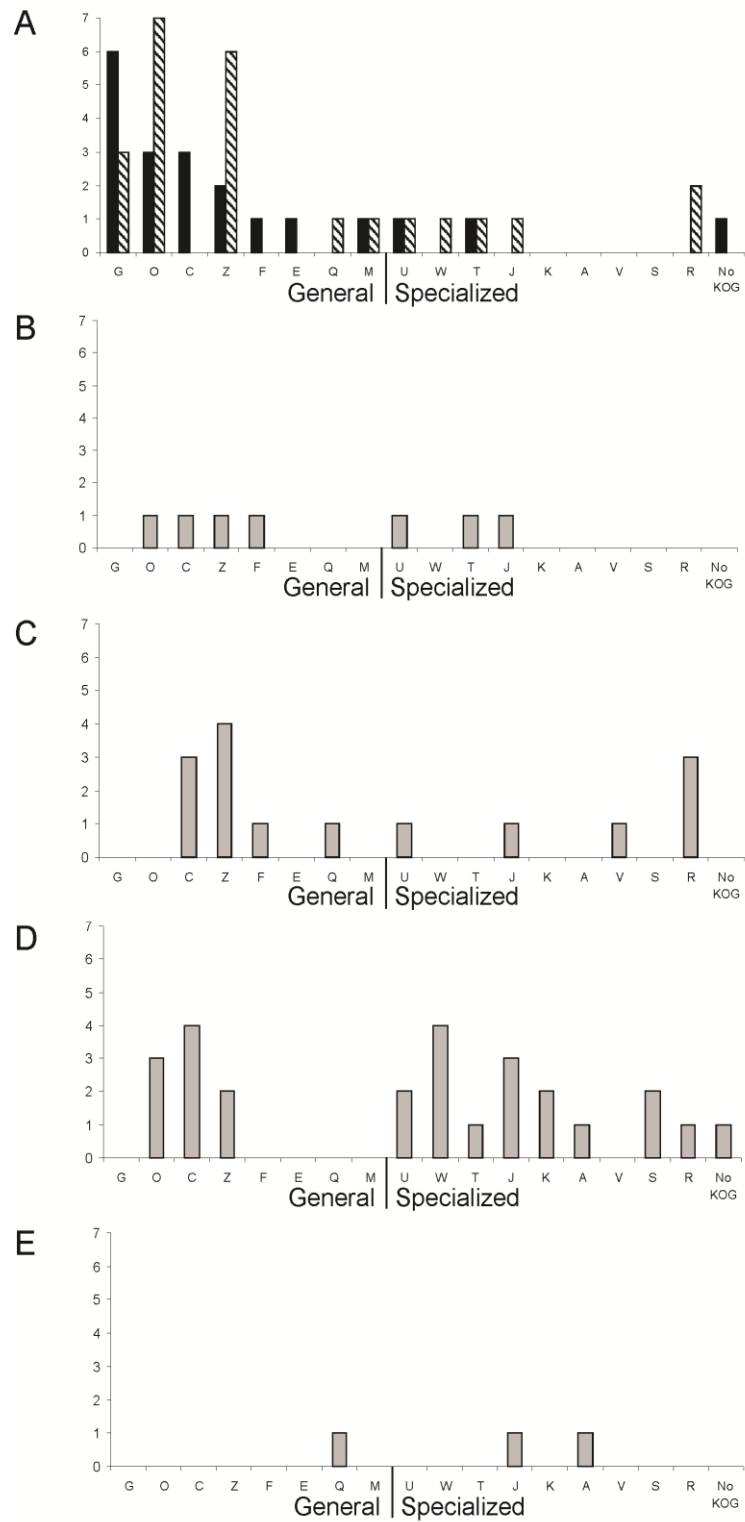


Figure 7. Functional distribution of Eg14-3-3-binding proteins shared or exclusive for each isoform according to KOG functional categories. **(A)** Eg14-3-3-binding proteins shared by all isoforms (black bars) and by 2 or 3 isoforms (cross hatched bars). Proteins bound exclusively by **(B)** Eg14-3-3.1, **(C)** Eg14-3-3.2, **(D)** Eg14-3-3.3 and **(E)** Eg14-3-3.4 isoform.

Supplementary Material

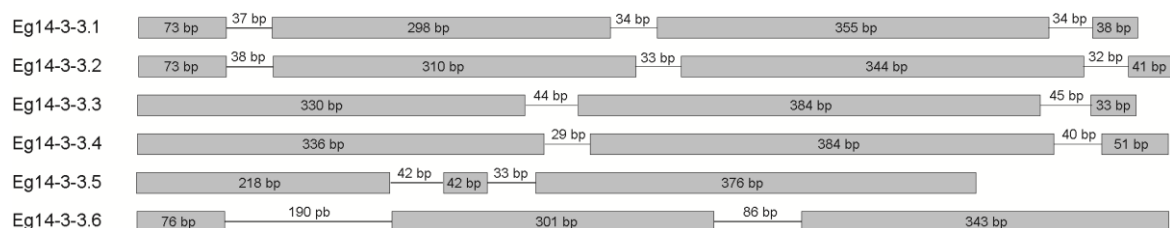


Figure S1. Diagrammatic representation of the exon-intron structures of *E. granulosus* 14-3-3 genes (Eg14-3-3.1-6). Boxes represent exons and lines represent introns. Length, in bp, of each segment is indicated.

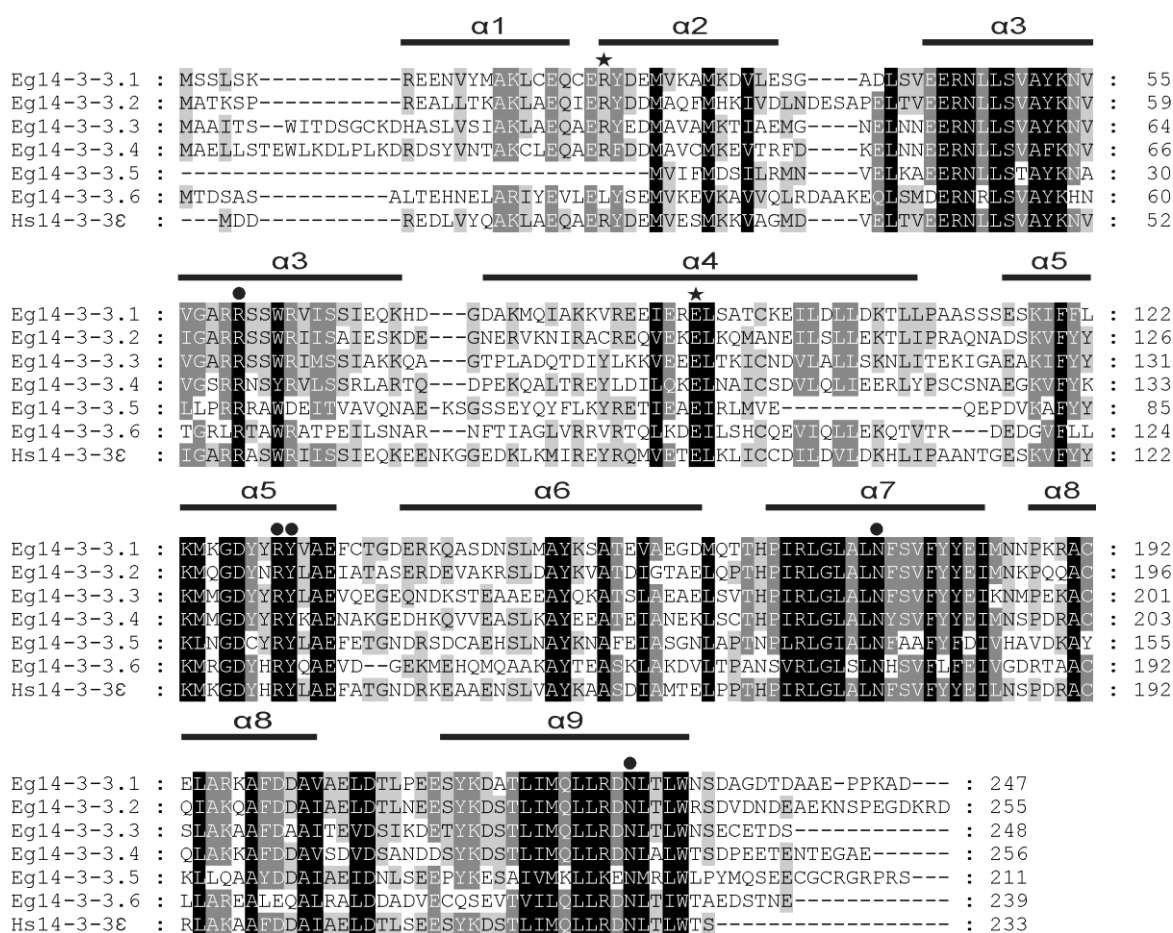


Figure S2. Multiple alignment of the Eg14-3-3 amino acid sequences. Identical residues are printed in white on a black background and similar residues are printed in black or white on gray background. Black bars above the alignment indicate the α -helices. Residues involved in dimerization are indicated by stars. Residues in the 14-3-3 dimer groove involved with target binding are indicated by circles. The amino acid sequence of human 14-3-3 ϵ (Hs14-3-3 ϵ) was included as reference.

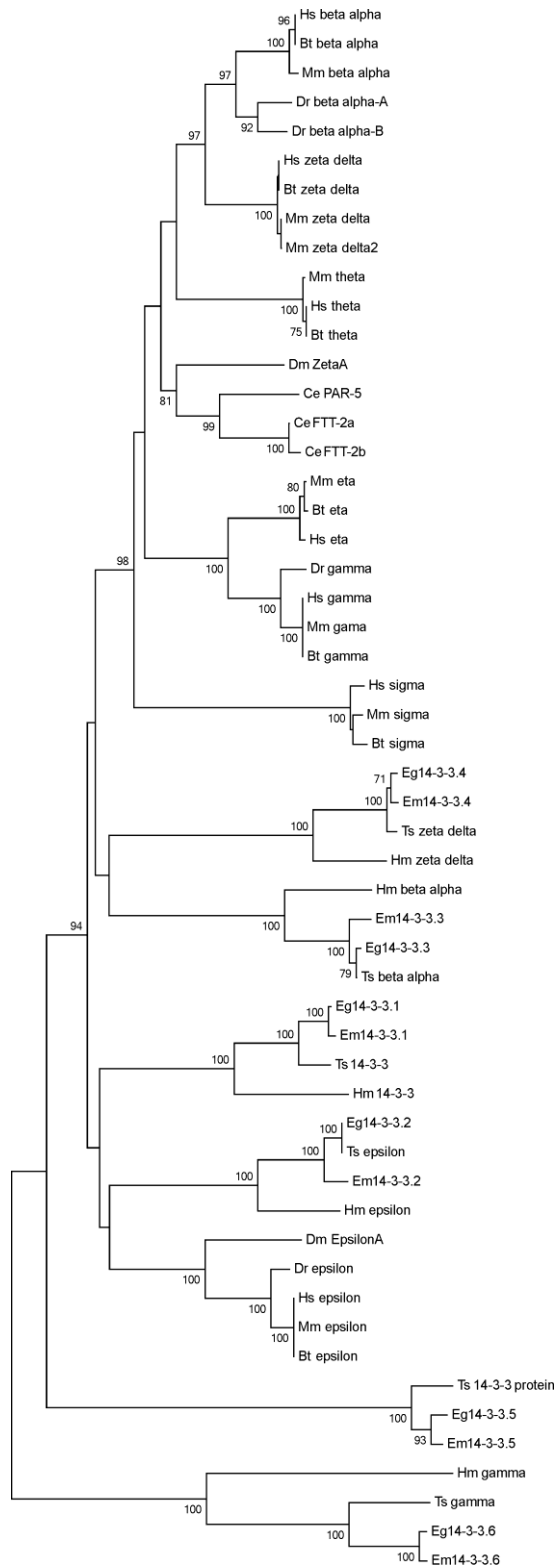


Figure S3. Phylogenetic analysis of the Eg14-3-3 proteins. Phylogenetic tree was generated using Neighbor joining. The deduced amino acid sequence of the 14-3-3 protein from *E. granulosus* (Eg14-3-3) and orthologous 14-3-3 proteins from *Bos taurus* (Bt), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Danio rerio* (Dr), *Drosophila melanogaster* (Dm), *E. multilocularis* (Em) *Homo sapiens* (Hs), *Hymenolepis microstoma* (Hm), *Mus musculus* (Mm) and *Taenia solium* (Ts). Values under 70 are not shown.

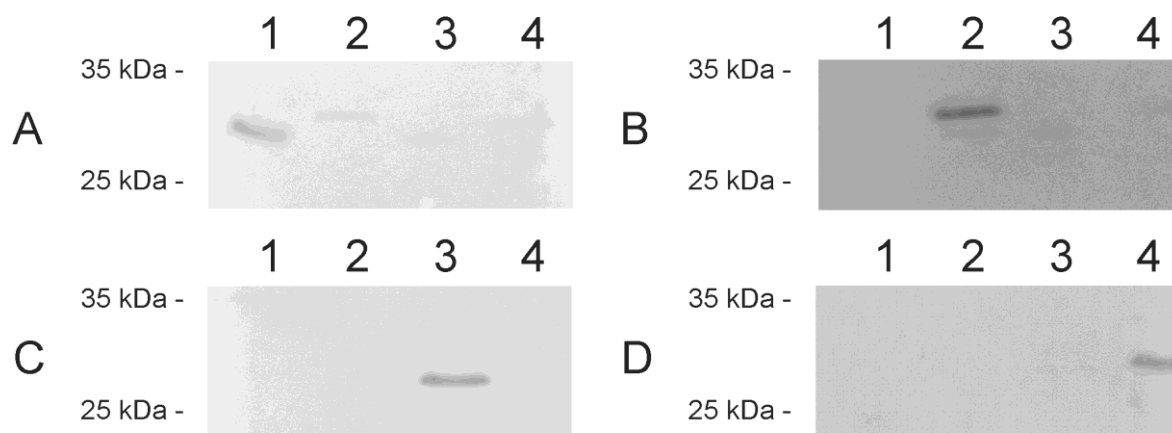


Figure S4. Specificity analysis of anti-Eg14-3-3 antibodies by immunoblot using recombinant proteins. Lanes 1-4, Eg14-3-3.1, Eg14-3-3.2, Eg14-3-3.3, and Eg14-3-3.4 respectively. **(A)** Anti-Eg14-3-3.1; **(B)** anti-Eg14-3-3.2; **(C)** anti-Eg14-3-3.3; **(D)** anti-Eg14-3-3.4.

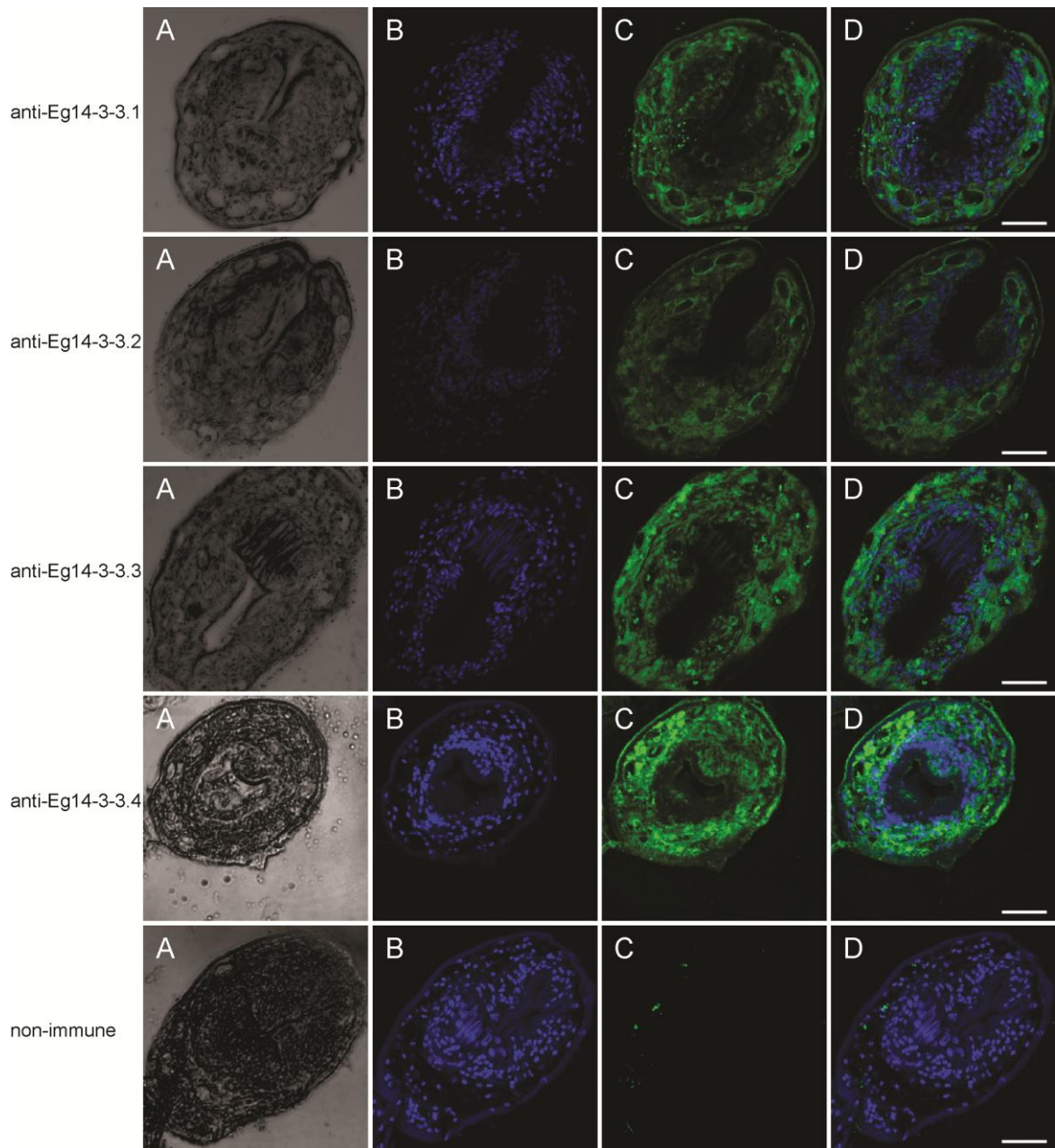


Figure S5. Analysis of the spatial expression pattern of Eg14-3-3 isoforms by immunofluorescence in *E. granulosus* protoscolex sections (5 μ m). **(A)** bright field; **(B)** DAPI nuclei staining; **(C)** antibody staining; **(D)** merge; Recognition of immune complexes was achieved using Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG; scale bars: 30 μ m.

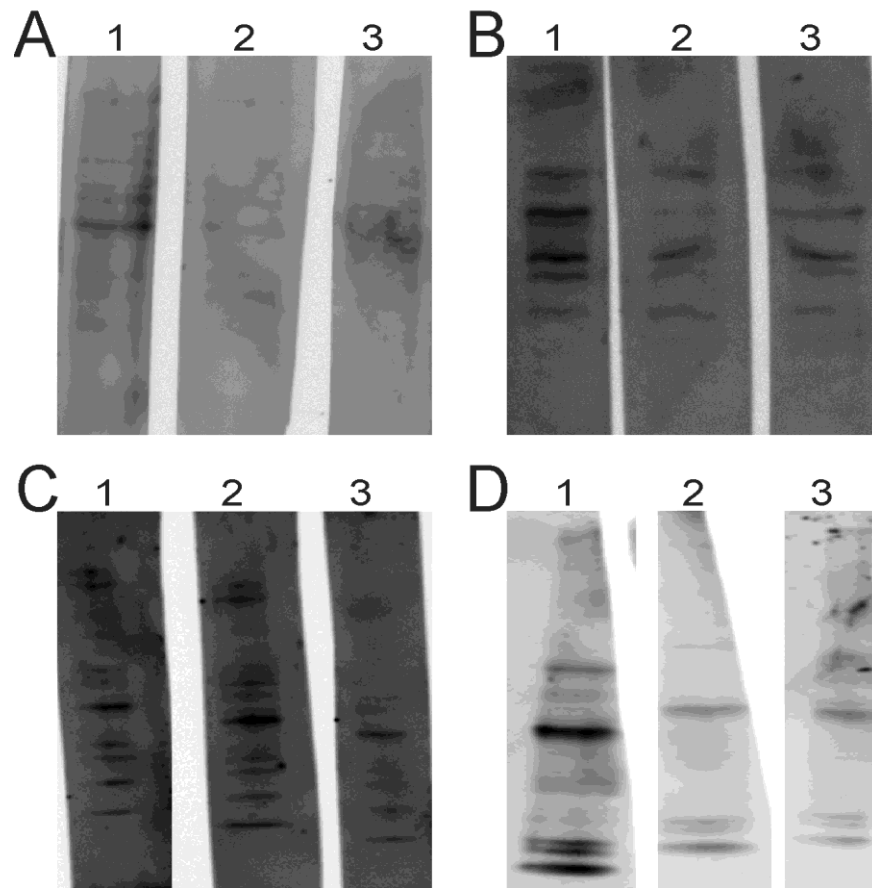


Figure S6. One-dimensional gel overlay analysis of the R18 peptide effect on Eg14-3-3 recombinant binding to protoscolex proteins. **(A)** Eg14-3-3.1, **(B)** Eg14-3-3.2, **(C)** Eg14-3-3.3, **(D)** Eg14-3-3.4. Biotinylated Eg14-3-3 recombinant isoforms were directly incubated with the membrane (1) or preincubated with 0.016 mM (2) or 0.1 mM R18 peptide (3) prior experiment.

Table S1. Structure and transcription profiles of *E. granulosus* 14-3-3 genes, and characteristics of the predicted proteins.

Isoform	Accession number ^a	Gene length (bp) ^b	CDS ^c	Exon/intron organization						Encoded protein			FPKM ^e	RPKM ^f				
				E1	I1	E2	I2	E3	I3	E4	Protein length (aa) ^d	Mass (Da)	pI	PSC	adult	onc	PSC	met
<i>Eg14-3-3.1</i>	EgrG_001192500	849	744	73	37	298	34	335	34	38	247	27945.6	4.89	1390	3453	6895	1565	2755
<i>Eg14-3-3.2</i>	EgrG_000231300	871	768	73	38	310	33	344	32	41	255	29217.9	4.97	1259	1075	142	708	546
<i>Eg14-3-3.3</i>	EgrG_000364000	836	747	330	44	384	45	33	-	-	248	27777.5	4.80	3267	2833	4237	1107	2551
<i>Eg14-3-3.4</i>	EgrG_001060100	840	771	336	29	384	40	51	-	-	256	29412.0	4.77	1178	440	3143	466	1394
<i>Eg14-3-3.5</i>	EgrG_000789700	711	636	218	42	42	33	376	-	-	211	24374.7	5.07	0	75	0	0	9
<i>Eg14-3-3.6</i>	EgrG_000314100	996	720	76	190	301	86	343	-	-	255	27132.7	5.27	10	46	0	0	21

^a GeneDB (www.genedb.org) accession number (as of 12/12/2013).

^b sum of exons (E) and introns (I).

^c sum of exons.

^d length of the predicted amino acid sequence.

^e FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) of protoscolex (PSC), according to Tsai et al. 2013.

^f RPKM (Reads per Kilobase Per Million reads) of adult, oncosphere (onc), protoscolex (PSC), metacestode (met), according to Zheng et al. 2013.

Table S2: Identity/similarity levels (%) between Eg14-3-3 proteins and 14-3-3 proteins from selected organisms.

Identities are shown in gray lines and similarities are shown in white lines.

protein/protein ^a	Eg14-3-3.1	Em14-3-3.1	Eg14-3-3.2	Em14-3-3.2	Eg14-3-3.3	Em14-3-3.3	Eg14-3-3.4	Em14-3-3.4	Eg14-3-3.5	Em14-3-3.5
Eg14-3-3.1		98%	54%	47%	47%	46%	46%	47%	33%	33%
		98%	72%	61%	63%	62%	64%	64%	52%	53%
Eg14-3-3.2				82%	49%	47%	45%	45%	33%	34%
				83%	64%	63%	64%	63%	50%	51%
Eg14-3-3.3						96%	53%	53%	28%	29%
						96%	68%	68%	45%	45%
Eg14-3-3.4								98%	27%	27%
								100%	47%	47%
Eg14-3-3.5										97%
										98%
Eg14-3-3.6										

^a14-3-3 protein names according to sheet B.

Eg14-3-3.6	Em14-3-3.6	Dm_ZetaA	Ce_FTT-2a	Ce_FTT-2b	Ce_PAR-5	Hs_zeta_delta	Bt_zeta_delta	Mm_zeta_delta	Mm_zeta_delta2	Hs_beta_alpha
33%	33%	61%	61%	47%	59%	60%	60%	60%	55%	59%
54%	54%	73%	75%	60%	74%	73%	73%	73%	67%	73%
32%	32%	60%	57%	43%	56%	57%	57%	57%	52%	55%
53%	53%	71%	73%	58%	72%	71%	71%	70%	64%	59%
31%	31%	53%	54%	45%	54%	55%	55%	55%	50%	55%
50%	50%	67%	67%	56%	64%	67%	67%	66%	61%	67%
29%	29%	54%	53%	43%	54%	54%	54%	54%	49%	51%
50%	50%	68%	69%	56%	68%	70%	70%	70%	64%	69%
21%	21%	35%	34%	26%	33%	35%	35%	35%	38%	33%
38%	38%	52%	52%	39%	50%	52%	52%	52%	57%	51%
	98%	34%	33%	28%	33%	34%	34%	34%	32%	33%
	99%	52%	54%	43%	53%	51%	51%	51%	48%	52%

Bt_beta_alpha	Mm_beta_alpha	Dr_beta_alpha-A	Dr_beta_alpha-B	Hs_theta	Bt_theta	Mm_theta	Mm_sigma	Bt_sigma	Hs_sigma	Hs_gamma
59%	58%	58%	58%	60%	60%	59%	50%	50%	50%	57%
73%	73%	73%	72%	74%	74%	74%	68%	68%	68%	70%
55%	55%	56%	55%	55%	55%	55%	50%	50%	50%	56%
59%	59%	70%	69%	69%	69%	69%	67%	67%	67%	70%
55%	56%	55%	55%	51%	51%	52%	48%	49%	49%	52%
67%	67%	67%	67%	64%	64%	64%	64%	64%	64%	66%
51%	51%	53%	53%	50%	50%	50%	46%	46%	46%	54%
69%	69%	69%	68%	67%	67%	67%	63%	63%	63%	70%
33%	33%	34%	34%	34%	34%	34%	31%	31%	31%	34%
51%	51%	52%	53%	51%	51%	51%	51%	51%	51%	50%
33%	33%	33%	34%	34%	34%	34%	32%	32%	33%	33%
52%	52%	52%	52%	53%	53%	53%	49%	49%	49%	54%

Mm_gama	Bt_gamma	Dr_gamma	Mm_eta	Bt_eta	Hs_eta	Dm_EpsilonA	Hs_epsilon	Mm_epsilon	Bt_epsilon	Dr_epsilon
57%	57%	56%	56%	56%	56%	57%	58%	58%	58%	59%
70%	70%	70%	69%	69%	69%	72%	75%	75%	75%	75%
56%	56%	56%	56%	56%	57%	57%	60%	60%	60%	60%
70%	70%	70%	73%	73%	73%	71%	72%	72%	72%	73%
52%	52%	52%	53%	53%	53%	48%	50%	50%	50%	50%
66%	66%	66%	68%	68%	68%	61%	62%	62%	62%	62%
54%	54%	54%	52%	52%	52%	47%	48%	48%	48%	48%
70%	70%	69%	70%	70%	70%	62%	64%	64%	64%	64%
34%	34%	34%	34%	34%	34%	38%	38%	38%	38%	38%
50%	50%	50%	50%	50%	50%	53%	55%	55%	55%	56%
33%	33%	34%	34%	34%	34%	30%	31%	31%	31%	31%
54%	54%	54%	53%	53%	53%	47%	48%	48%	48%	49%

Hm_14-3-3	Ts_14-3-3	Ts_beta_alpha	Hm_beta_alpha	Ts_epsilon	Hm_epsilon	Hm_zeta_delta	Ts_zeta_delta	Ts_14-3-3_protein	Hm_gamma	Ts_gamma
81%	94%	48%	48%	55%	57%	48%	47%	36%	31%	32%
89%	97%	65%	66%	73%	73%	65%	66%	58%	52%	52%
55%	56%	49%	48%	100%	84%	46%	45%	36%	28%	30%
71%	73%	64%	62%	100%	93%	62%	64%	57%	50%	48%
49%	49%	99%	85%	49%	51%	51%	53%	32%	30%	30%
63%	65%	99%	92%	64%	65%	67%	68%	51%	49%	48%
46%	48%	53%	51%	45%	44%	85%	98%	30%	28%	29%
63%	66%	68%	67%	64%	64%	93%	100%	52%	50%	49%
31%	32%	29%	29%	34%	34%	27%	26%	76%	19%	20%
49%	50%	46%	45%	50%	50%	46%	47%	78%	37%	38%
32%	33%	30%	29%	31%	32%	29%	29%	22%	59%	86%
52%	53%	48%	47%	49%	50%	49%	51%	43%	73%	89%

Sheet B

Ortholog 14-3-3 proteins used in the amino acid sequence alignments and in the phylogenetic analyses.

Species	Protein name	Access number
<i>Bos Taurus</i>	<i>Bt_zeta_delta</i>	NP_777239
<i>Bos Taurus</i>	<i>Bt_gamma</i>	NP_777218
<i>Bos Taurus</i>	<i>Bt_beta_alpha</i>	NP_777219
<i>Bos Taurus</i>	<i>Bt_theta</i>	NP_001071595
<i>Bos Taurus</i>	<i>Bt_eta</i>	NP_776917
<i>Bos Taurus</i>	<i>Bt_epsilon</i>	NP_776916
<i>Bos Taurus</i>	<i>Bt_sigma</i>	NP_001069380
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Ce_FTT-2a</i>	NP_509939
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Ce_PAR-5</i>	NP_502235
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Ce_FTT-2b</i>	NP_509938
<i>Danio rerio</i>	<i>Dr_beta_alpha-A</i>	NP_001076267
<i>Danio rerio</i>	<i>Dr_gamma</i>	NP_998187
<i>Danio rerio</i>	<i>Dr_beta_alpha-B</i>	NP_998310
<i>Danio rerio</i>	<i>Dr_epsilon</i>	NP_997770
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Dm_ZetaA</i>	NP_724885
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Dm_EpsilonA</i>	NP_732309
<i>Echinococcus granulosus</i> *	<i>Eg14-3-3.1</i>	EgrG_001192500
<i>Echinococcus granulosus</i> *	<i>Eg14-3-3.2</i>	EgrG_000231300
<i>Echinococcus granulosus</i> *	<i>Eg14-3-3.3</i>	EgrG_000364000
<i>Echinococcus granulosus</i> *	<i>Eg14-3-3.4</i>	EgrG_001060100
<i>Echinococcus granulosus</i> *	<i>Eg14-3-3.5</i>	EgrG_000789700
<i>Echinococcus granulosus</i> *	<i>Eg14-3-3.6</i>	EgrG_000314100
<i>Echinococcus multilocularis</i> *	<i>Em14-3-3.1</i>	EmW_001192500
<i>Echinococcus multilocularis</i> *	<i>Em14-3-3.2</i>	EmW_000231300
<i>Echinococcus multilocularis</i> *	<i>Em14-3-3.3</i>	EmW_000364000
<i>Echinococcus multilocularis</i> *	<i>Em14-3-3.4</i>	EmW_001060100
<i>Echinococcus multilocularis</i> *	<i>Em14-3-3.5</i>	EmW_000789700
<i>Echinococcus multilocularis</i> *	<i>Em14-3-3.6</i>	EmW_000314100
<i>Homo sapiens</i>	<i>Hs_zeta_delta</i>	NP_003397
<i>Homo sapiens</i>	<i>Hs_gamma</i>	NP_036611
<i>Homo sapiens</i>	<i>Hs_beta_alpha</i>	NP_003395
<i>Homo sapiens</i>	<i>Hs_theta</i>	NP_006817
<i>Homo sapiens</i>	<i>Hs_eta</i>	NP_003396
<i>Homo sapiens</i>	<i>Hs_epsilon</i>	NP_006752
<i>Homo sapiens</i>	<i>Hs_sigma</i>	NP_006133
<i>Hymenolepis microstoma</i> *	<i>Hm14-3-3_epsilon</i>	HmN_000209900
<i>Hymenolepis microstoma</i> *	<i>Hm14-3-3_gamma</i>	HmN_000341500
<i>Hymenolepis microstoma</i> *	<i>Hm14-3-3_zeta_delta</i>	HmN_000379400
<i>Hymenolepis microstoma</i> *	<i>Hm14-3-3_beta_alpha</i>	HmN_000659700
<i>Hymenolepis microstoma</i> *	<i>Hm_14-3-3_protein</i>	HmN_000070500
<i>Mus musculus</i>	<i>Mm_zeta_delta</i>	NP_035870
<i>Mus musculus</i>	<i>Mm_gama</i>	NP_061359
<i>Mus musculus</i>	<i>Mm_beta_alpha</i>	NP_061223
<i>Mus musculus</i>	<i>Mm_theta</i>	NP_035869

<i>Mus musculus</i>	<i>Mm_eta</i>	NP_035868
<i>Mus musculus</i>	<i>Mm_zeta_delta2</i>	NP_001240736
<i>Mus musculus</i>	<i>Mm_epsilon</i>	NP_033562
<i>Mus musculus</i>	<i>Mm_sigma</i>	NP_061224
<i>Taenia solium</i> *	<i>Ts_14-3-3</i>	TsM_000719200
<i>Taenia solium</i> *	<i>Ts_14-3-3_zeta_delta</i>	TsM_000804900
<i>Taenia solium</i> *	<i>Ts_14-3-3_beta_alpha</i>	TsM_000747500
<i>Taenia solium</i> *	<i>Ts_14-3-3_epsilon</i>	TsM_000569000
<i>Taenia solium</i> *	<i>Ts_14-3-3_gamma</i>	TsM_001162700
<i>Taenia solium</i> *	<i>Ts_14-3-3_protein</i>	TsM_000260000

* sequences were obtained from the GeneDB Database (www.genedb.org) the others sequences were obtained from the (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Table S3: Quality data models of Eg14-3-3 structural modeling.

	Identity	Similarity	z-score ^a	Ramachandran ^b	TM score ^c	RMS ^d	QMEAN ^e	z-score QMEAN ^e	z-score C β interaction ^e	z-score torsion energy ^e
<i>Eg14-3-3.1</i>	65%	77%	-7.58	97.0%	0.7976	0.33	0.655	-1.23	-0.49	-1.71
<i>Eg14-3-3.2</i>	64%	72%	-7.24	92.9%	0.5442	0.77	0.662	-1.14	-0.53	-2.65
<i>Eg14-3-3.3</i>	62%	67%	-6.77	93.6%	0.2189	0.98	0.612	-1.68	0.11	-2.98
<i>Eg14-3-3.4</i>	60%	71%	-5.94	90.9%	0.1922	0.86	0.574	-2.09	-0.57	-3.74
<i>Eg14-3-3.5</i>	48%	54%	-6.24	95.9%	0.1836	3.51	0.629	-1.53	-0.91	-3.19
<i>Eg14-3-3.6</i>	40%	57%	-5.88	93.9%	0.2742	1.34	0.683	-0.93	-1.88	-3.25

^aProSA-web was used to test the overall model quality and provided z-score.

^b Values of most favoured regions obtained from Ramachandran Plot using PROCHECK.

^c TM-score was used to verified model quality.

^d RMS deviation calculations were performed using Swiss-pdb Viewer.

^e QMEAN, z-score, C β interaction and torsion energy were performed using QMEAN server.

Table S4: Protoscolex proteins that were identified by 2-DE/MALDI-Q-TOF MS/MS.

Spot ^a	Protein	Accession numbers	<i>M_w</i> (kDa) (theoretical) ^b	pI (theoretical) ^b	Sequence coverage (%)	MASCOT score ^c	Number of matched peptides	Peptide sequence ^d
1	HSP70	EgrG_001085400	71.324	5.65	10	258	5	K.LLQDFNGR.E K.FELSGIPPAPR.G R.TTPSYVAFTDTER.L K.STAGDTHLGGEDFDSR.L K.VSDAVVTVPAYFNDSQR.Q
2	HSP70	EgrG_001085400	71.324	5.65	9	162	5	K.LLQDFNGR.E K.FELSGIPPAPR.G R.TTPSYVAFTDTER.L R.ARFEELCSDLFR.S K.VSDAVVTVPAYFNDSQR.Q
3	HSP70	EgrG_001085400	71.324	5.65	10	209	5	K.LLQDFNGR.E K.FELSGIPPAPR.G R.TTPSYVAFTDTER.L K.STAGDTHLGGEDFDSR.L K.VSDAVVTVPAYFNDSQR.Q
4	HSP70	EgrG_001085400	71.324	5.65	6	96	3	K.FELSGIPPAPR.G R.TTPSYVAFTDTER.L K.VSDAVVTVPAYFNDSQR.Q
5	phosphoenolpyruvate carboxykinase	EgrG_000292700	72.386	6.93	5	102	3	R.FQTVPHVAEGVK.G R.RPEGIPLVYEAR.T K.VLDYIEEQNTFVR.C
6	phosphoenolpyruvate carboxykinase	EgrG_000292700	72.386	6.93	8	148	4	K.TIISHIPDDR.L R.RPEGIPLVYEAR.T K.VLDYIEEQNTFVR.C R.AINPEAGFFGVAPGTNHK.T
7	phosphoenolpyruvate carboxykinase	EgrG_000292700	72.386	6.93	8	182	4	R.FQTVPHVAEGVK.G R.RPEGIPLVYEAR.T R.RPEGIPLVYEAR.T R.AINPEAGFFGVAPGTNHK.T
8	phosphoenolpyruvate carboxykinase	EgrG_000292700	72.386	6.93	7	104	4	K.TIISHIPDDR.L R.FQTVPHVAEGVK.G R.RPEGIPLVYEAR.T K.VLDYIEEQNTFVR.C
9	phosphoenolpyruvate carboxykinase	EgrG_000292700	72.386	6.93	1	26	1	R.RPEGIPLVYEAR.T
10	glucose 6 phosphate isomerase	EgrG_000626300	61.680	6.48	4	82	2	K.ALFDADSQR.F

11	glucose 6 phosphate isomerase	EgrG_000626300	61.680	6.48	4	75	2	K.AVANHFVALSTNTR.A K.ALFDADSQR.F K.AVANHFVALSTNTR.A
12	protein disulfide isomerase A3	EgrG_001022300	81.983	7.86	2	45	1	K.VYNYGEYAEFFDEGR.T
13	protein disulfide isomerase A3	EgrG_001022300	81.983	7.86	2	33	1	K.VYNYGEYAEFFDEGR.T
14	seryl tRNA Synthetase	EgrG_001197300	64.050	5.68	6	127	3	R.ILVALLAAQR.H K.IPFVHTAPIDQQK.G K.YLIATSEQPIAAYHR.G
15	enolase	EgrG_000514200	46.817	6.48	14	174	4	K.AVYAGEHFR.N R.AAVPSGASTGVHEAVELR.D R.SGETEDSTIADIVVGLR.T K.AGIQIVGDDLTVTNPER.V
16	enolase	EgrG_000514200	46.817	6.48	14	242	4	K.AVYAGEHFR.N R.AAVPSGASTGVHEAVELR.D R.SGETEDSTIADIVVGLR.T K.AGIQIVGDDLTVTNPER.V
17	enolase	EgrG_000514200	46.817	6.48	14	213	4	K.AVYAGEHFR.N R.AAVPSGASTGVHEAVELR.D R.SGETEDSTIADIVVGLR.T K.AGIQIVGDDLTVTNPER.V
18	enolase	EgrG_000514200	46.817	6.48	13	210	4	K.AVYAGEHFR.N K.LAMQEFMILPTGAK.S + 2 Oxidation (M) R.SGETEDSTIADIVVGLR.T K.AGIQIVGDDLTVTNPER.V
19	enolase	EgrG_000514200	46.817	6.48	14	211	4	K.AVYAGEHFR.N R.AAVPSGASTGVHEAVELR.D R.SGETEDSTIADIVVGLR.T K.AGIQIVGDDLTVTNPER.V
20	phosphoglycerate kinase 1	EgrG_001043100	47.138	9.10	11	142	3	K.DPTPGTVFLEENLR.F K.ALESPTRPFLAILGGAK.V K.SLTALGDIYVNDAFGTAHR.A K.SLTALGDIYVNDAFGTAHR.A
21	citrate synthase	EgrG_001028500	51.801	8.26	5	81	2	R.VVPGYGHAVLR.K K.LPTVAATIYNSFR.D
22	citrate synthase	EgrG_001028500	51.801	8.26	10	200	4	K.DPLFVELLR.L R.VVPGYGHAVLR.K K.LPTVAATIYNSFR.D
23	citrate synthase	EgrG_001028500	51.801	8.26	11	176	4	K.EMSFYTVLFGVSR.A + Oxidation (M) R.VVPGYGHAVLR.K

									K.LPTVAATIYNSSFR.D R.DFALTHMPDDPLIK.I + Oxidation (M) K.GLVTETSVLDPDEGIR.F
24	aspartate aminotransferase mitochondrial	EgrG_001134100	48.142	8.93	2	49	1		R.DSGIAVQYYR.Y
25	aspartate aminotransferase mitochondrial	EgrG_001134100	48.142	8.93	8	94	3		K.TLFLAQSFAN R.DSGIAVQYYR.Y R.NATVQCLSGTGSLR.I
26	aspartate aminotransferase mitochondrial	EgrG_001134100	48.142	8.93	9	127	3		R.DSGIAVQYYR.Y R.NATVQCLSGTGSLR.I K.NVAYVAQAIHAVTK.- R.AVFPSIVGRPR.H K.SYELPDGQVITIGNER.F R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A
27	actin	EgrG_000061200	42.003	5.30	11	170	3		R.SIPLPPSVDR.N K.TENASHSEHR.E K.GLAIQPTEAQR.Q
28	major egg antigen p40	EgrG_000212700	35.825	5.81	10	106	3		R.SIPLPPSVDR.N K.TENASHSEHR.E K.GLAIQPTEAQR.Q
29	major egg antigen p40	EgrG_000212700	35.825	5.81	14	134	4		R.SIPLPPSVDR.N K.TENASHSEHR.E K.GLAIQPTEAQR.Q R.QSLHDDVTNMHR.N + Oxidation (M)
30	major egg antigen p40	EgrG_000212700	35.825	5.81	18	150	4		R.SIPLPPSVDR.N K.GLAIQPTEAQR.Q K.TQAEMVNGHMMVEAPLKF.- + 2 Oxidation (M) R.EFHPELEYTQPGELDFLK.D
31	major egg antigen p40	EgrG_000212700	35.825	5.81	16	111	3		K.TENASHSEHR.E K.GLAIQPTEAQR.Q R.QSLHDDVTNMHR.N + Oxidation (M) R.EFHPELEYTQPGELDFLK.D
32	major egg antigen p40	EgrG_000212700	35.825	5.81	18	169	4		K.TENASHSEHR.E K.GLAIQPTEAQR.Q K.TQAEMVNGHMMVEAPLKF.- + 2 Oxidation (M) R.EFHPELEYTQPGELDFLK.D
33	major egg antigen p40	EgrG_000212700	35.825	5.81	7	76	2		K.TENASHSEHR.E K.GLAIQPTEAQR.Q
34	major egg antigen p40	EgrG_000212700	35.825	5.81	12	107	3		K.TENASHSEHR.E K.GLAIQPTEAQR.Q R.EFHPELEYTQPGELDFLK.D
35	major egg antigen p40	EgrG_000212700	35.825	5.81	18	149	4		K.TENASHSEHR.E K.GLAIQPTEAQR.Q

36	annexin	EgrG_000244000	36.887	5.17	13	173	3	K.TQAEMVNGHMVVEAPLFK.- + 2 Oxidation (M) R.EFHPELEYTQPGELDFLK.D K.GVGTHDENLVR.M K.GLGTDEDAIIDVLSHR.S R.SLEQDVIHDVSGDFER.V
36	cAMP dependent protein kinase regulatory	EgrG_000775600	41.838	5.19	6	66	2	K.LALLDVGSFER.L K.SVFGSLDNVPELR.H
37	Eg14-3-3.2	EgrG_000231300	29.314	4.99	21	188	4	R.YLAEIATASER.D R.YDDMAQFMHK.I + 2 Oxidation (M) K.VATDIGTAELQPTHPIR.L K.IVDLNDESAPELTVEER.N
38	Eg14-3-3.4	EgrG_001060100	29.736	4.79	3	49	1	R.FDKELNNEER.N
39	Eg14-3-3.3	EgrG_000364000	27.988	4.80	17	142	3	R.YLAEVQEGEQNDK.S K.TIAEMGNELNNEER.N + Oxidation (M) K.ATSLAEAEELSVTHPIR.L
40	Eg14-3-3.1	EgrG_001192500	28.213	4.91	24	254	5	K.REENVYMAK.L + Oxidation (M) K.DATLIMQLLR.D + Oxidation (M) R.YVAEFCTGDER.K K.DVLESGADLSVEER.N K.SATEVAEGDMQTTTHPIR.L + Oxidation (M)
41	methylthioadenosine phosphorylase	EgrG_000622900	32.884	5.64	17	104	3	K.HSIMPGNVNF.R.A + Oxidation (M) K.FMPNTYIPGEARPEHDVPR.L + Oxidation (M) K.VGIIGGSGGLDDPEIFENQHEVR.V
42	methylthioadenosine phosphorylase	EgrG_000622900	32.724	5.64	17	138	3	K.HSIMPGNVNF.R.A + Oxidation (M) K.FMPNTYIPGEARPEHDVPR.L + Oxidation (M) K.VGIIGGSGGLDDPEIFENQHEVR.V
43	methylthioadenosine phosphorylase	EgrG_000622900	32.724	5.64	11	84	2	K.HSIMPGNVNF.R.A + Oxidation (M) K.VGIIGGSGGLDDPEIFENQHEVR.V
44	UDP glucose 4 epimerase	EgrG_000984800	39.195	7.05	2	39	1	R.YFNVPVGAHK.S
45	UDP glucose 4 epimerase	EgrG_000984800	39.195	7.05	2	31	1	R.YFNVPVGAHK.S
46	fructose 1,6 bisphosphate aldolase	EgrG_000905600	40.098	8.31	12	160	4	K.DGKPFVELLR.E R.FAAINLENTEENR.R K.RFAAINLENTEENR.R R.TVPVAVPGIVFLSGGQSELDATR.N
47	fructose 1,6 bisphosphate aldolase	EgrG_000905600	40.098	8.31	12	153	4	K.DGKPFVELLR.E R.FAAINLENTEENR.R R.FAAINLENTEENRR.A R.TVPVAVPGIVFLSGGQSELDATR.N
48	fructose 1,6 bisphosphate aldolase	EgrG_000905600	40.098	8.31	9	150	4	K.DGKPFVELLR.E

49	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	EgrG_000254600	38.114	8.54	10	86	3	R.ELLFTTDPEFAK.H R.FAAINLENTEENR.R R.FAAINLENTEENRR.A K.LSKPATYDQIK.A -.MKPQVGINGFGR.I + Oxidation (M) R.VPTPNVSVVTLTCK.L
50	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	EgrG_000254600	38.114	8.54	13	163	3	-.MKPQVGINGFGR.I + Oxidation (M) K.LIAWYDNEFGYSCR.G K.VIISAPSADAPMFVGVNHEK.Y + Oxidation (M)
51	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	EgrG_000254600	38.114	8.54	9	130	2	-.MKPQVGINGFGR.I + Oxidation (M) K.VIISAPSADAPMFVGVNHEK.Y + Oxidation (M)
52	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	EgrG_000254600	38.114	8.54	12	109	3	R.AGIALNDTFVK.L -.MKPQVGINGFGR.I + Oxidation (M) K.VIISAPSADAPMFVGVNHEK.Y + Oxidation (M)
53	cytosolic malate dehydrogenase	EgrG_000417100	36.889	7.62	15	163	4	K.EVFTPCVQNR.G K.DIYFSFPVTIK.D R.SLFNLSADELVDER.E K.DQQIILHLLDIPEAK.T
54	cytosolic malate dehydrogenase	EgrG_000417100	36.889	7.62	10	116	3	K.EVFTPCVQNR.G K.VVDGLSMDEWSR.S + Oxidation (M) R.SLFNLSADELVDER.E
55	cytosolic malate dehydrogenase	EgrG_000417100	36.889	7.62	7	82	2	K.EVFTPCVQNR.G R.SLFNLSADELVDER.E
56	cytosolic malate dehydrogenase	EgrG_000417100	36.889	7.62	14	122	4	K.EVFTPCVQNR.G K.QFPDLSHAVVTK.D K.VVDGLSMDEWSR.S + Oxidation (M) R.SLFNLSADELVDER.E
57	phosphoglycerate mutase	EgrG_000799500	33.855	8.88	15	182	4	R.MYGGLQGLNK.S + Oxidation (M) R.VLITAHGNSLR.A R.HGESVYNQENR.F R.AYDISPPPLEVSDKR.W
58	phosphoglycerate mutase	EgrG_000799500	33.855	8.88	12	147	3	R.VLITAHGNSLR.A R.HGESVYNQENR.F R.AYDISPPPLEVSDKR.W
59	glutathione S transferase	EgrG_000685900	24.354	8.26	13	53	3	K.REEIITFR.V K.LILEHQNFY R.CLGQQYNLLGR.N R.EVGFEFESPR.F R.IEVTEVPISR.H
60	gelsolin	EgrG_000882300	42.226	7.63	12	162	4	

61	gelsolin	EgrG_000882300	42.226	7.63	14	175	4	K.LGNAAVPPRPMR.L + Oxidation (M) R.HSLNSNDVFIFDEGTR.M R.EVGEFESPR.F K.LGNAAVPPRPMR.L + Oxidation (M) K.VAQVMALLNDNLVIHR.E + Oxidation (M) R.HSLNSNDVFIFDEGTR.M
62	gelsolin	EgrG_000882300	42.226	7.63	10	124	3	R.EVGEFESPR.F K.LGNAAVPPRPMR.L + Oxidation (M) R.HSLNSNDVFIFDEGTR.M
63	gelsolin	EgrG_000882300	42.226	7.63	7	87	2	K.LGNAAVPPRPMR.L + Oxidation (M) R.HSLNSNDVFIFDEGTR.M
64	major egg antigen p40	EgrG_000212700	35.825	5.81	14	163	4	R.SIPLPPSVDR.N K.TENASHSEHR.E K.GLAIQPTEAQR.Q R.QSLHDDVTNMHR.N + Oxidation (M)
65	ETHE1 protein	EgrG_001090400	30.472	6.15	19	152	4	R.AAFTGDALLIR.G R.AVLIDPVLETVQR.D K.FVDIMQNLNLSYPK.Q + Oxidation (M) K.AGEVLDCGNIQLECR.S
66	ETHE1 protein	EgrG_001090400	30.472	6.15	4	44	1	R.AVLIDPVLETVQR.D
67	endophilin B1	EgrG_000550800	28.953	5.83	26	139	5	R.VHQESLTIFEK.T K.NFLNTTLSEAQK.A K.EFDGLSVQLLDLIR.A K.IITATEEFVDINIASK.V K.NFNSEVNTTFIEDLK.N
68	endophilin B1	EgrG_000550800	28.953	5.83	15	97	3	K.MLTEASDVHQR.M + Oxidation (M) R.VHQESLTIFEK.T K.IITATEEFVDINIASK.V
69	endophilin B1	EgrG_000550800	28.953	5.83	14	67	3	R.VHQESLTIFEK.T K.NFLNTTLSEAQK.A K.EFDGLSVQLLDLIR.A
70	annexin	EgrG_000193700	39.460	6.05	16	121	4	R.GGDIMVNQNEVTR.A + Oxidation (M) K.NSTSALLLSAFQHK.N K.GDNPDPPTPEQLQTIK.Q R.ELAHDLDGDLSGHFR.D

^aSpots identification according to the 2-DE gel show in Figure 9. ^bTheoretical molecular weight (Mw) and isoelectric point (pI) for each identification. ^cMASCOT score is $-10 \times \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. ^dIndividual peptide sequences, including any modification.

Table S5: MS data from Sulfo-SBED cross linking assays. Eg14-3-3.1 – binding protein.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Total spectrum count	Percentage sequence coverage	Peptide sequence	Previous amino acid	Next amino acid
fimbrin	EgrG_000786800	68.673,10	2	5,83%	MINVAVPNTIDDR	K	T
					QASGVGSNAPIEDSDILTWVNDR	K	L
dynein light chain	EgrG_000940500	10.310,80	2	20,20%	DIAAHLK	K	K
					NADMPESMQQR	K	A
3 oxoacyl acyl carrier protein reductase	EgrG_000792800	34.834,50	3	11,70%	DSVENFDPVAYER	R	L
					LGAGVSLVGR	K	N
					TAGFSDSEYASFLMR	R	A
6 phosphofructokinase	EgrG_001128600	89.134,90	4	6,39%	EATWADVSGIMQLGGTVIGSAR	R	C
					LMVDELGLDTR	K	I
					SIAVLSSGGDAQGMNSAIR	K	A
ras protein Rab 27A	EgrG_000347300	35.095,00	2	8,68%	LAQELQVPYIETSALSGK	R	N
					VISTSDAQR	R	L
heat shock protein 60	EgrG_001190900	60.613,80	4	10,90%	AAMLVGVDVLADAVAVTMGPK	R	G
					LVQDVANNANEEAGDGTATVLR	K	A
					VLAMEPNGGYDAMNDR	K	Y
tubulin alpha chain	EgrG_000886400	56.987,10	2	4,90%	AVFVDLEPTVVDEVK	R	C
					DVNAAIATIK	K	T
alpha N acetylgalactosaminidase	EgrG_000340500	47.644,40	2	6,31%	EILQAPLVIR	K	V
					MLDDVQDSWASVLSIMR	R	D
expressed conserved protein	EgrG_000213800	22.237,60	2	19,70%	EVTTTTTIYPDGR	R	Q
					TETSEGVITDSPLVLMSPEDIFKR	R	D
kinesin heavy chain	EgrG_001025000	112.821,10	2	3,20%	HVSVTNMNEHSSR	R	S
					TYTMEGVLGSDLQGIIPR	K	I
ribosomal protein L11	EgrG_000177700	24.190,30	2	10,20%	VKEYELPK	K	S
					VLEQLTDQQPVFSK	K	A
F actin capping protein subunit beta	EgrG_000772300	31.201,20	3	19,00%	ALEIEANNAFDQYR	R	E
					QHISNIGSMVEELESQMR	R	S
					SPWTVNYDPPPLDDGVLPSER	R	L
rho gdp dissociation inhibitor	EgrG_001152900	24.188,70	2	12,10%	SEDEEVQSGALFR	R	G

inosine 5' monophosphate dehydrogenase 2	EgrG_000120200	55.865,00	2	5,97%	SVDKVMLGSYAPR	R	A
					VAQGVSGAIMDR	K	G
					VGMGSGSICITQEITAVGR	R	S
Sco cytochrome oxidase deficient protein 1	EgrG_000228900	28.759,00	2	11,30%	DQTGMEVTLADFK	R	G
					ISSNFGQIAIGGDFR	K	L
heat shock protein 70	EgrG_001065400	70.445,60	3	5,24%	SQVFSTAADGQTQVEIK	K	V
					VSNVITVPAYFNDSQR	K	Q
				8,48%	EGYQGLVDGGK	K	N
				8,48%	MGAEAVLALMDADKNPDLPSCVITLVGNQAVR	R	L
				8,48%	SIAVLSSGGDAQGMNSAIR	K	A

Table S5: MS data from Sulfo-SBED cross linking assays. Eg14-3-3.2 – binding protein.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Total spectrum count	Percentage sequence coverage	Peptide sequence	Previous amino acid	Next amino acid
actin protein 2 B	EgrG_000801400	44.261,90	2	8,08%	SMLELSYPMENGIVK	R	N
				8,08%	YIVLSGGSTMYPLPSR	K	L
threonyl tRNA synthetase C	EgrG_000375800	82.844,70	2	3,19%	GFQEVIPTNIYDSK	R	L
				3,19%	LCNSIINEK	K	Q
succinyl coenzyme A synthetase alpha subunit	EgrG_001199000	34.374,20	2	12,80%	AIDEAMEAEMPLIVCITEGIPQHDMIR	R	V
				12,80%	QGTFFHSQQTLAYGTK	K	L
tubulin alpha chain	EgrG_000886400	56.987,10	6	13,30%	AVFVDLEPTVVDEVK	R	C
				13,30%	GHYTIGK	R	E
				13,30%	LIGQIVSSITASLR	R	F
				13,30%	NLDIERPTYTNLNR	R	L
				13,30%	VGINYQPPTVVPGGDLAK	K	V
ubiquitin modifier activating enzyme 1	EgrG_000711500	120.824,00	2	2,32%	GNELTADILR	K	E
				2,32%	ILITGLSGLGLEIAK	K	N
Profilin	EgrG_000122100	13.361,50	2	23,80%	CGDNELSATGNDYAVDVR	K	V
				23,80%	TMVIITGNSKPK	K	D
Glutamine:fructose 6 phosphate aminotransferase	EgrG_000097800	78.877,40	2	3,82%	EIFEQPDSILNTMR	K	G
				3,82%	ELDGSFALACKSR	R	Y
6 phosphofructokinase	EgrG_001128600	89.134,90	5	8,85%	DIFWDDVR	R	G
				8,85%	MTVLGHIQQGGEPSPFDR	R	I
				8,85%	STVAFPGMEGK	R	Y
				8,85%	VAVVNVGAPAGGVNAAMR	R	S
				8,85%	VIEAADAIVTTAQSHQR	R	C
heat shock protein 60	EgrG_001190900	60.613,80	5	16,50%	AAMLVGVDVLADAVAVTMGPK	R	G
				16,50%	AAVEEGIVPGGGAALLR	R	C
				16,50%	DMAIATGGVVFVGDDEADMYKLEDAQLQDLGR	R	V
				16,50%	VGNDGTITVK	R	D
				16,50%	VLAMEPNGGYDAMNDR	K	Y
hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase	EgrG_000758800	31.990,10	2	5,30%	DILIVEDIVDSGK	K	T
				5,30%	GKDILIVEDIVDSGK	K	T

glycerol 3 phosphate dehydrogenase	EgrG_000964600	89.067,90	2	3,78%	LATSPEPTDDDDVQFILSEIK	K	S
				3,78%	QDFASGTSSR	K	S
alpha N acetylgalactosaminidase	EgrG_000340500	47.644,40	2	5,61%	EILQAPLVIR	K	V
				5,61%	INPSGIVMLIVQPL	R	-
actin protein 3B	EgrG_000292600	50.896,40	2	7,27%	DITSFIQQLLR	R	E
				7,27%	DYTESISTVVDGVIQNSPIDAR	R	R
protease inhibitor serine	EgrG_001193100	40.023,20	2	12,10%	IRETYTSAVSK	R	H
				12,10%	SLAVSDVYHQAVIDVDEEGAEAAAATAMPMMVR	R	C
transmembrane emp24 domain containing protein	EgrG_000574700	22.647,40	2	15,60%	ESSGHYSFTANTEGK	K	Y
				15,60%	LIDMVNELSNAVLNAK	K	H
programmed cell death 6 interacting protein	EgrG_000997530	89.828,60	3	2,58%	LIESYCDLLESLEQR	R	I
				2,58%	QLEQIK	K	L
dehydrogenase:reductase SDR family	EgrG_000410100	44.868,10	3	13,20%	GGVAIPVAVDHADDSQVTNLFSR	R	I
				13,20%	MTADMAEELR	R	S
				13,20%	NESSDGATGSLEETAAEITAR	K	G
expressed conserved protein	EgrG_000213800	22.237,60	2	20,20%	IFQDIFGDQFPFPR	R	D
				20,20%	TETSEGVIITDSPLVLMSPEDIFKR	R	D
Ras protein Rap 1b	EgrG_000859400	20.819,70	3	20,80%	INVNEVFFDLVR	K	Q
				20,80%	SALTVQFVQSIFVEK	K	Y
				20,80%	YDPTIEDSYRK	K	Q
dipeptidyl peptidase 3	EgrG_001028100	82.558,50	2	4,62%	GEFETFVAVVDKDVSTK	R	F
				4,62%	KEEVIHEAFLPNNAVFK	K	A
F actin capping protein subunit beta	EgrG_000772300	31.201,20	2	13,20%	GSWDSVHIVEVQEHSTAK	R	S
				13,20%	QHISNIGSMVEELESQMR	R	S
UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase	EgrG_000843500	57.085,40	2	7,50%	NELTFLDLTIQQIENLNK	R	S
				7,50%	TLDSGINIIQLEEAAGAAIR	K	N
				8,48%	EGYQGLVDGGK	K	N
				8,48%	MGAEAVLALMDADKNPDLPSCVITLVGNQAVR	R	L
				8,48%	SIAVLSSGGDAQGMNSAIR	K	A

Table S5: MS data from Sulfo-SBED cross linking assays. Eg14-3-3.3 – binding protein.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Total spectrum count	Percentage sequence coverage	Peptide sequence	Previous amino acid	Next amino acid
protein memo1	EgrG_000237250	33.458,10	2	8,14%	ATYTHGPAR	K	A
				8,14%	GMELIENLDASGFNK	K	Y
phosphoglycerate mutase	EgrG_000799500	33.648,80	2	9,76%	HGESVYNQENR	R	F
				9,76%	TLNHVLEVNDLHWIPVYK	K	S
fimbrin	EgrG_000786800	68.673,10	2	6,80%	NMLTDDNFANAVYALSSCR	R	K
				6,80%	QASGVGSNAPIEDSDILTWVNDR	K	L
heat shock 10 kDa protein 1	EgrG_000320800	14.081,90	2	18,30%	FEATSTTK	R	G
				18,30%	GKVLEATVVAAGPGR	K	I
ubiquitin carboxyl terminal hydrolase 7	EgrG_000875300	144.627,60	2	3,35%	AVFQMPTESDEISTSVPLALQR	K	T
				3,35%	ELDECKLNEAIASFLQWPLQK	R	I
lactate dehydrogenase a	EgrG_000660800	35.331,80	2	7,62%	AVVDSAYEIIR	K	M
				7,62%	LSGFQHR	K	V
				7,62%	NVDIFK	R	K
dynein heavy chain	EgrG_000832000	535.208,60	4	1,06%	DYVAVDQEALR	K	E
				1,06%	FGTPLLVQDVESYDPILNPVLNR	R	E
				1,06%	ITLASYLGYAVAEALQK	R	L
fascin 2	EgrG_000181100	76.053,90	2	4,76%	GDSSLVDSIEEASLFAMSFKPGR	R	S
				4,76%	IGLIHSPSGR	R	L
dolichyl diphosphooligosaccharide protein	EgrG_000996800	69.394,10	2	5,24%	FNYENGSPFLAVTNLER	R	L
				5,24%	GEVLYTSDIQPVHK	R	T
tetraspanin	EgrG_000355700	30.511,60	2	11,60%	FLNEASQEQADEIAQFLK	K	Y
				11,60%	TLAYYDPSTPEGK	K	G
PUR alpha protein	EgrG_000780600	35.259,20	2	18,00%	SLATDGLIESEAIAR	K	D
				18,00%	VQIALPADGLSDMCNGIAELINDYCRDEDLIATSELPEAK	R	V
ras protein Rab 2A	EgrG_000430800	23.436,70	2	11,80%	DTFLHLTSWLEDAK	R	Q
				11,80%	SCLLLQFTDKR	K	F
40s ribosomal protein S16	EgrG_000821300	58.178,90	2	3,12%	EYVQVFGFR	R	K
				3,12%	VAQVYAIR	R	Q
filamin	EgrG_000859700	249.505,20	3	2,25%	ACGPGLEETGNTVNSIAR	R	F

				2,25%	AGNAMLLAGMMGTVHPCER	K	F
				2,25%	GFVGKENQFFVDASK	R	A
aldehyde dehydrogenase mitochondrial	EgrG_000389100	52.238,60	2	10,50%	LADALADNIDYLSQLEAMDAGKPLASAR	R	G
				10,50%	REPVGVVGAIPWNYPLDLIASK	R	V
pre mRNA processing factor 39	EgrG_000379000	112.882,90	2	3,22%	NVGNLIPPEGLPVWQLLLLK	R	S
				3,22%	SITPLEILTQLEER	K	L
NADP dependent malic enzyme	EgrG_000645800	65.186,80	3	9,26%	ILGLGDLGAYGMGIPVGK	R	L
				9,26%	LSDDTYLFGVAGEAASGIAHLLK	R	T
				9,26%	LSLYSALAGVNPR	K	H
zinc finger protein 26	EgrG_000920300	188.319,50	2	0,88%	AVAVLPDLVFNNLR	K	S
				0,88%	KAVAVLPDLVFNNLR	R	S
Acetyl coenzyme A hydrolase transferase	EgrG_001087900	55.094,20	2	6,13%	IYSGFGGQVDFLR	R	G
				6,13%	TVHIHTEGEFPVNDSEVK	K	H
tubulin alpha chain	EgrG_000886400	56.987,10	7	21,60%	AFVHWYVGEEMEEGFSEAR	R	E
				21,60%	AVFVDLEPTVVDEVR	R	C
				21,60%	FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR	R	I
				21,60%	GHYTIGK	R	E
				21,60%	IHFPLATYAPVISA EK	R	A
				21,60%	TIQFVDWCPTGFK	R	V
				21,60%	VGINYQPPTVVPGGDLAK	K	V
heat shock protein 60	EgrG_001190900	60.613,80	2	8,10%	AAMLVGVLDLADAVAVTMGPK	R	G
				8,10%	LVQDVANNANEEAGDGTTTATVLAR	K	A
dipeptidyl peptidase 3	EgrG_001028100	82.558,50	2	4,48%	DIITGGDITHWYESGETWDSK	R	F
				4,48%	FSGIASAFE ECR	K	A
F actin capping protein subunit beta	EgrG_000772300	31.201,20	2	13,20%	GSWDSVHIVEVQEHS TAK	R	S
				13,20%	QHISNIGSMVEELESQMR	R	S
ubiquitin modifier activating enzyme 1	EgrG_000711500	120.824,00	3	5,94%	AVNKDVNETAAHVEQINEPLAK	K	I
				5,94%	MDFLELAEAYKNPNFLISDFAK	R	L
				5,94%	NTFLNLSLPFFGSSEPLPPK	K	S
GTP binding protein SAR1b	EgrG_000100200	22.213,30	3	17,10%	FTTYDLGGHEQAR	K	K
				17,10%	ILNYLGLYQK	K	S
				17,10%	LVFLGLDNAGK	K	T
glutamine:fructose 6 phosphate aminotransferase	EgrG_000097800	78.877,40	2	4,95%	ELVEELTELPVMVELASDFLDR	R	L
				4,95%	GYHYATCLEGALK	R	L

arginyl tRNA synthetase cytoplasmic	EgrG_000348100	73.074,60	2	3,43%	LIDLLNEGVDK	K	V
				3,43%	MIGLVEYLDER	R	G
3 oxoacyl acyl carrier protein reductase	EgrG_000792800	34.834,50	2	7,06%	AAIEQFTR	K	N
				7,06%	TAGFSDSEYASFLMR	R	A
G1Y162 protein	EgrG_000515900	16.990,80	2	21,60%	LTANLYTTYVTFK	K	Y
				21,60%	LTLEGLKPSTFYEVVVQAFK	K	G
UTP glucose 1 phosphate uridylyltransferase	EgrG_000843500	57.085,40	5	16,00%	ATDSAIKQLNK	K	L
				16,00%	GAIGINVPR	K	S
				16,00%	LLEIAQVPPEHVDEFTSVR	R	K
				16,00%	TTSLLLLMSNLYTLDNGTIIMSPK	K	R
				16,00%	VNVEIETFVQSMYPR	K	L
polyubiquitin	EgrG_000516500	14.586,40	2	16,90%	IQDKEGIPDQQR	K	L
				16,90%	TLSDYNIQK	R	E
6 phosphofructokinase	EgrG_001128600	89.134,90	10	12,00%	EATWADVSGIMQLGGTVIGSAR	R	C
				12,00%	EGYQGLVDGGK	K	N
				12,00%	LMVDELGLDTR	K	I
				12,00%	LYSEEGQGIFDCR	K	M
				12,00%	MSMHDYSSHDAAYK	K	S
				12,00%	RDFEQAVFLR	K	G
				12,00%	VIEAADAIVTTAQSHQR	R	C
integrin beta 2	EgrG_000528400	98.881,60	2	5,56%	LA AFLPSAAVGLTDSSTNIVNLLR	K	E
				5,56%	TILSRPSGNLDSPEGGLDALLQVAR	K	C
expressed conserved protein	EgrG_000470500	82.389,00	2	5,03%	GFVDAVMQVFHSLEDMDTLR	R	S
				5,03%	VELAEYLTSLEYPAFASK	R	M
				8,48%	EGYQGLVDGGK	K	N
				8,48%	MGAEAVLALMDADKNPDLPCVITLVGNQAVR	R	L
				8,48%	SI AVLSSGGDAQGMNSAIR	K	A

Table S5: MS data from Sulfo-SBED cross linking assays. Eg14-3-3.4 – binding protein.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Total spectrum count	Percentage sequence coverage	Peptide sequence	Previous amino acid	Next amino acid
splicing factor 3b subunit 3	EgrG_000633300	134.913,90	2	1,98%	HGLEVTEMAK	R	S
				1,98%	VVLDPVTGELSDTR	R	T
Eg14-3-3.4	EgrG_001060100	29.412,90	4	14,50%	CLEQAERFDDMAVCMK	K	E
				14,50%	DSYVNTAK	R	C
				14,50%	GEDHKQVVEASLK	K	A
				2,70%	LYLVDLAGSEK	K	V
kinesin heavy chain	EgrG_001025000	112.821,10	2	2,70%	TGAEGSTLTEAMNINK	K	S
				2,70%	ANYVDGIDILVNNAGIAYK	R	L
carbonyl reductase 1	EgrG_000115200	31.266,50	2	10,90%	FHQLDITDADSR	K	H
				10,90%	ACGPGLEETGNTVNSIAR	R	F
filamin	EgrG_000859700	249.505,20	2	1,77%	GVHVPGSPFQLTVGQPVEGGPSK	R	V
				1,77%	DAIEMNYGNSDDPLFR	K	A
ubiquitin carboxyl terminal hydrolase 7	EgrG_000875300	144.627,60	4	4,75%	FQYDFQSGTNVK	R	I
				4,75%	IQVEADAPHGTEWDSK	R	K
				4,75%	NITTFPSDSVLTTLWAR	R	R
				4,75%	QHISNIGSMVEELESQMR	R	S
F actin capping protein subunit beta	EgrG_000772300	31.201,20	4	18,30%	SFLNDVYFGSSK	R	A
				18,30%	SPWTVNYDPPLDDGVLPSER	R	L
				18,30%	IQDKEGIPPDQQR	K	L
polyubiquitin	EgrG_000516500	14.586,40	2	16,90%	TLSDYNIQK	R	E
				16,90%	AALNMVK	K	H
6 phosphofructokinase	EgrG_001128600	89.134,90	4	8,48%	EGYQGLVDGGK	K	N
				8,48%	MGAEAVLALMDADKNPDLPSCVITLVGNQAVR	R	L
				8,48%	SIAVLSSGGDAQGMNSAIR	K	A
				8,48%			

Table S6: MS data from Eg14-3-3-affinity chromatography. Eg14-3-3.1 – binding protein.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Total spectrum count	Percentage sequence coverage	Peptide sequence	Previous amino acid	Next amino acid
Eg14-3-3.1	EgrG_001192500	27.946,70	6	21,90%	AMKDVLESGADLSVEER	K	N
					KQASDNSLMAYK	R	S
					QASDNSLMAYK	K	S
					SATEVAEGDMQTTHPIR	K	L
					VISSIEQK	R	H

Table S6: MS data from Eg14-3-3-affinity chromatography. Eg14-3-3.2– binding protein.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Total spectrum count	Percentage sequence coverage	Peptide sequence	Previous amino acid	Next amino acid
collagen alpha 1(IV) chain	EgrG_000144350	172.458,80	2	1,67%	GEAGEKGPEGLEGPVGER	R	G
					GPQGPPGPTSR	R	A
synaptic vesicle membrane protein VAT 1	EgrG_000935200	46.991,30	2	5,48%	ALQQLLVEGK	K	I
					YIVYGNSSFVTGER	R	K
tubulin beta 2C chain	EgrG_000672200	49.872,80	2	6,52%	AILVDLEPGTMDSVR	R	A
					LHFFMPGFAPLTSR	R	G
Eg14-3-3.2	EgrG_000231300	29.219,20	5	22,40%	IISAIESKDEGNER	R	V
					VATDIGTAEALQPTHPIR	K	L
					YDDMAQFMHK	R	I
					YLAEIATASER	R	D
					YLAEIATASERDEVAK	R	R
atlastin 2	EgrG_000707700	58.733,50	2	1,54%	TIGVSPR	K	-
					TIGVSPRI	K	-

Table S6: MS data from Eg14-3-3-affinity chromatography. Eg14-3-3.3 – binding protein.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Total spectrum count	Percentage sequence coverage	Peptide sequence	Previous amino acid	Next amino acid
collagen alpha 1(IV) chain	EgrG_000144350	172.458,80	8	6,98%	AGPRGEEPEGEPGDAGEIGIR	R	G
					GEAGEKGPEGLEGPVGER	R	G
					GERGPQGPK	K	G
					GGPGEPGKPGEPDGPDPGK	R	E
					GPFGDQMGMDVGEKEGEPGPPGER	R	G
					GPPGPAGPAGDRGPR	R	G
					GPQGPPTSR	R	A
					MDAVDYSEK	K	R
elongation factor 1 alpha	EgrG_000982200	49.687,30	2	4,18%	STSTGHLYK	K	C
					Eg14-3-3.3	EgrG_000364000	27.778,70
collagen alpha 1V chain	EgrG_000144300	176.068,50	5	5,38%	LAEQAERYEDMAVAMK	K	T
					QAGTPLADQTDIYLK	K	K
					STEAEEAYQK	K	A
					YEDMAVAMK	R	T
					YLAEVQEGEQNDKSTEAEEAYQK	R	A
					GLEGEQGPVPSGDPGFEGPPGR	R	C
					GPAGLIGDTGPDPIGSGIR	R	G
					GPPGADGIPGEPGERGPPGDFGPPGR	R	H
major egg antigen p40	EgrG_000212700	35.847,70	2	7,64%	GSPGPQGPVGFDR	R	R
					QGIQPPGDDGR	K	R
actin cytoplasmic type 5	EgrG_000190400	40.216,00	3	5,00%	EGLEIVTADDGSK	K	K
					GDASMSSESVGR	R	S
heat shock 70 kDa protein 4	EgrG_001085400	71.085,00	4	6,45%	AGFAGDDAPR	K	A
					DLTDYLMK	R	I
					IINEPTAAAIAVGLDK	R	K
					IINEPTAAAIAVGLDKK	R	V
basement membrane specific heparan sulfate	EgrG_000701800	96.032,40	2	3,29%	LLQDFFNDR	K	E
					STAGDTHLGGEDFDSR	K	L
					ITDAPDGAIVSGSVIR	R	I

phosphoenolpyruvate carboxykinase	EgrG_000292700	71.236,60	5	9,45%	QIAVEYYGPTQPR	K	D
					FNDKGELR	R	A
					FQTVPHVAEGVK	R	G
					VINNWPCNPEK	K	T
					VMCVGDDIAWMR	K	F
major vault protein	EgrG_000142500	97.061,80	4	4,95%	VSGEDIAVDSPIGLLPK	R	K
					DHESIVQMPAK	K	M
					HIACAGVER	R	D
					LFSLPDFIGDFCK	K	A
abnormal embryogenesis family member emb 9	EgrG_000144400	167.894,60	2	1,77%	VQAIGSENLR	R	H
					DGPQGEAGDPGEMGPVGPGR	K	Q
					GNTGFLFAK	R	H
heat shock protein heat shock protein 90 alpha	EgrG_000008700	73.878,30	2	4,20%	ADLVNNLGTIAR	K	S
					NPEDISQEEYGEFYK	R	S

Table S6: MS data from Eg14-3-3-affinity chromatography. Eg14-3-3.4 – binding protein.

Protein name	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Total spectrum count	Percentage sequence coverage	Peptide sequence	Previous amino acid	Next amino acid
collagen alpha 1(IV) chain	EgrG_000144350	172.458,80	2	1,27%	GEVGLIGIYGR	R	S
					GPQGPPGPTSR	R	A
actin cytoplasmic type 5	EgrG_000190400	40.216,00	2	8,06%	EITALAPSTMK	K	I
					VAPEEHPVLLTEAPLNPK	R	A
heat shock 70 kDa protein 4	EgrG_001085400	71.085,00	2	3,69%	TTPSYVAFTDTER	R	L
					VEIANDQGNR	K	T
Eg14-3-3.4	EgrG_001060100	29.412,90	2	9,77%	FDKELNNEER	R	N
					LSCTHPIR	K	L
					MMGDYYR	K	Y

4. Capítulo II – Análise das isoformas 14-3-3 das espécies de *E. multilocularis* e *E. ortleppi*

Este capítulo inclui materiais & métodos e resultados adicionais referentes análise da estrutura dos genes de 14-3-3 de *E. multilocularis* e a análise da expressão das proteínas 14-3-3 em componentes do metacestódeo de *E. ortleppi*.

4.1 Materiais & Métodos

4.1.1 Análise das sequências de isoformas 14-3-3 de *E. multilocularis*

As sequências de 14-3-3 de *E. multilocularis* foram obtidos a partir do GeneDB (www.genedb.org). Os seis genes anotados de 14-3-3 de *E. multilocularis* (EmuJ_001192500, EmuJ_000231300, EmuJ_000364000, EmuJ_001060100, EmuJ_000789700, EmuJ_000314100) aqui referidos como *Em14-3-3.1-6*, respectivamente, foram submetidos aos programas de predição de genes, GeneMark-E (Besemer & Borodovsky 2005), Fgenesh (Salamov & Solovyev 2000) e GeneScan (Burge & Karlin 1998) para confirmar as estruturas éxon-íntron e as sequências de DNA codificadoras (CDS). A tradução das sequências de DNA e as predições de massa molecular e ponto isoelétrico foram realizadas utilizando ferramentas disponíveis no portal ExPASy (<http://expasy.org/>). As sequências de aminoácidos deduzidas foram alinhadas utilizando ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

4.1.2 Imunoblots

Amostras de PSC e camada germinativa de *E. ortleppi* foram homogeneizadas com homogeneizador de vidro em PBS contendo 1 mM de PMSF e 1% de Triton X-100. Os homogeneizados foram centrifugados a 20.000 g durante 30 min a 4 ° C para remoção da fração insolúvel. O líquido hidático foi aspirado do metacestódeo de *E. ortleppi* e concentrado 10 vezes por liofilização. As proteínas foram quantificados utilizando um fluorómetro QubitTM (Invitrogen). As amostras proteicas foram resolvidas por 12% SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF (HybondTM, GE Healthcare). As membranas foram bloqueadas durante 16 h com 5% de leite em pó desnatado em PBS-T (PBS contendo 0,1% de Tween-20) e, em seguida, incubadas com anticorpos policlonais de coelho anti-14-3-3 numa diluição de 1: 20.000 (v/v) durante 1 h e 30 min. Depois de quatro lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas com

anticorpos anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Sigma-aldrich) numa diluição de 1: 9.000 (v/v) durante 1 h. As reações antígeno-anticorpo foram detectadas com o kit ECL Plus (GE Healthcare) e visualizadas utilizando o sistema de imagem VersaDoc (Bio-Rad).

4.2 Resultados

4.2.1 Análise estrutural *in silico* de genes e proteínas 14-3-3 de *E. multilocularis*

Os seis genes de 14-3-3 de *E. multilocularis* (*Em14-3-3*) foram comparados em relação as suas sequências e as estruturas éxon-íntron. Estes genes apresentaram de 3 a 4 éxons que variam de tamanho de 33 a 388 pb, separados por íntrons que variam de tamanho de 29 a 190 pb (Figura 6). As proteínas Em14-3-3 apresentaram de 211 a 295 aminoácidos e massas moleculares de 25,1 a 33,8 kDa (Tabela 1). O alinhamento das sequências de Em14-3-3 mostra a presença de regiões conservadas com alguns resíduos idênticos. A Em14-3-3.5 é a isoforma menor entre as proteínas, devido à sua extensão N-terminal mais curta que as das outras isoformas (Figura 7).

Os dados publicados de RNA-Seq (Tabela 1) demonstraram que os genes *Em14-3-3.1-4* codificam as isoformas mais expressas em *E. multilocularis*, em todas as fases de vida analisadas, desde o metacestódeo até o adulto. As isoformas 14-3-3.1 e 14-3-3.3 são descritas como tendo os maiores níveis de expressão tanto em *E. multilocularis* como em *E. granulosus* (Tsai *et al.*, 2013).

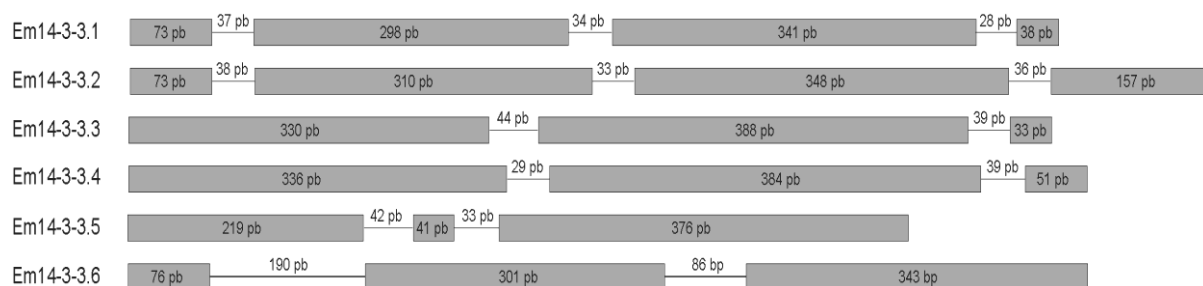


Figura 6: Representação das estruturas éxon-íntron das regiões codificadoras dos genes de 14-3-3 de *E. multilocularis* (Em14-3-3). Retângulos representam os éxons e linhas representam os íntrons. O tamanho de cada segmento é indicado em pb.

```

Em14-3-3.1 : MSSLSK-----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80
Em14-3-3.2 : MAAKSP-----REENVYMAKLCCEQCERYDEMVKAMKDVLE---ESGADLISVBERNLLSVAYKNVVGARRSSWRV : 65
Em14-3-3.3 : MAAITS--WITDSGCKDHASLVSIARLAEQAEREDMMAVAMKTIIA---EMGNELNNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRV : 74
Em14-3-3.4 : MSELLSTEWLKDLPKDRDSYVNTAKCLEQAEREDMMAVCMKEVTV---REFEELNNEERNLLSVAFKNNVGSRRNSYRV : 76
Em14-3-3.5 : -----MVIIFMDSITL---RMNVFLKAEERNLLSTAYKKNLPLRRRAWDE : 40
Em14-3-3.6 : MTDSAS-----ALTEHNELARLYEVLLELSEMVREVKAVVQLRDAAKEQLSMDERNLLSVAYKHNHTCRIRTAWRA : 70

Em14-3-3.1 : *-----100-----*-----120-----*-----140-----*-----160
Em14-3-3.2 : ISSTEQKHD--GDAKMQIAKKVREETIRELNATCKEITGLDKTLLPAASSSESRTFELKMKGDYRYVAEFTCTDERKQ : 143
Em14-3-3.3 : ISATIESKDE--GNERVKNIACREQVVEKELKQMANEITSLLEKTLIPRAQNADSKVFFYKMGDYNRYLAELIATASERDE : 147
Em14-3-3.4 : MSSTIAKKQA--GTPLADQTDIYLKVVVEELTKICNDVLAELSKNLI TEKIGAEAKIFYYKMGDYRYLAEVQEGEQNDK : 152
Em14-3-3.5 : LSSRLARTQ--DPEKQALTKEYLDILOKELNAICSDVLOLIEERLYPSCSNAEGKVFYKMGDYRYKAEENARGEDHKQ : 154
Em14-3-3.6 : LTVAVQNAEKSGSSEYQYFLKYRETIIEAIRLMEV-----QEPDVNAFYYKLNDCYRYLAEFETGNDRSQ : 106

Em14-3-3.1 : *-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240
Em14-3-3.2 : VAKRSLDAYKVATDGTABLQPTHEPIRLGLALNFSVFFYEIMNKPPQACQIARQAFDDAIAEALDTLNEESYKDSILIMQL : 227
Em14-3-3.3 : STEAAEAYQKATSEAEALSVTHEPIRLGLALNFSVFFYEIMNMPKACSLAKAAFAAIAITVDSIKDETYKDSILIMQL : 232
Em14-3-3.4 : VVEASLKAYEBATEIANEKISCTHEPIRLGLALNFSVFFYEIMNSPDRACQLAKAFDDAVSDVDSANDDSYKDSILIMQL : 234
Em14-3-3.5 : CAEHSLNAYKNAFEIASGNLAPISPLRLGLALNFAVFFEDIHVAVDKAYKILQAAAYDDAIAEIDNLSEEPYKESAIVMKL : 186
Em14-3-3.6 : HQMQAAKAYTEASTLAKDVLTPANSVRLGLSLNHSVFFFEIIVGDRTAACLARBALEQALRALDDADVEQCSEVIVILQL : 223

Em14-3-3.1 : *-----260-----*-----280-----*-----300
Em14-3-3.2 : LRNLTLWNSDAG-----ECDLDAEPPKAD----- : 249
Em14-3-3.3 : LRNLTLWRSVDNDGKKIPPRVTSGRFISVILTNHSLFVARLLPWFKFDTHFLYTVKVVLTSLPR : 295
Em14-3-3.4 : LRNLTLVALELRV-----ETENTEGAE----- : 245
Em14-3-3.5 : LRNLTLWTSDFE-----SEESGSCGRPRS----- : 256
Em14-3-3.6 : LRNLTLWTAEDS-----LNE----- : 239

```

Figura 7: Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos preditas das proteínas 14-3-3 de *E. multilocularis* (Em14-3-3). Os resíduos idênticos são impressos em letras brancas com um fundo preto e resíduos similares são impressos em letras pretas ou brancas com um fundo cinza.

Os alinhamentos das sequências deduzidas de aminoácidos de Em14-3-3 mostram identidades de 21% a 33% e similaridades de 38% a 54% entre os parálogos (Tabela 2). As isoformas parálogas mais divergentes entre si em termos de identidade/similaridade de 21%/38%, respectivamente, foram a Em14-3-3.5 e a Em14-3-3.6.

A comparação das sequências deduzidas de aminoácidos das espécies de *E. multilocularis* e *E. granulosus* mostra valores de identidades de 82% a 98% e similaridades de 83% a 100% entre os pares de ortólogos. As isoformas ortólogas mais divergentes entre si foram as isoformas Eg14-3-3.2 e Em14-3-3.2, com identidade/similaridade de 82%/83%, respectivamente. A comparação entre as espécies de *E. granulosus* e *E. multilocularis* demonstra valores mais elevados de identidade/similaridade entre os pares de ortólogos do que entre os parálogos.

Tabela 1: Estrutura e perfil de transcrição dos genes de 14-3-3 de *E. multilocularis*, e característica das proteínas preditas.

Isoforma	Número de acesso ^a	Gene (pb) ^b	CDS ^c (pb)	Organização éxon/intron (pb)							Proteína codificadora			FPKM ^e		
				E1	I1	E2	I2	E3	I3	E4	Proteína (aa) ^d	Massa (Da)	pl	met	pré-grávido	grávido
<i>Em14-3-3.1</i>	EmW_001192500	849	750	73	37	298	34	341	28	38	249	28146.8	4.90	1509	2643	1449
<i>Em14-3-3.2</i>	EmW_000231300	995	888	73	38	310	33	348	36	157	295	33837.8	6.48	615	430	451
<i>Em14-3-3.3</i>	EmW_000364000	821	738	330	44	388	39	20	-	-	245	28259.3	5.05	1794	786	773
<i>Em14-3-3.4</i>	EmW_001060100	839	771	336	29	384	39	51	-	-	256	30280.1	4.83	590	490	550
<i>Em14-3-3.5</i>	EmW_000789700	711	636	219	42	41	33	376	-	-	211	25156.6	5.07	0	17	8
<i>Em14-3-3.6</i>	EmW_000314100	996	720	76	190	301	86	343	-	-	239	27981.7	5.27	3	9	8

^a número de acesso no GeneDB (www.genedb.org) (em 12/12/2013);

^b soma dos éxons e íntrons;

^c soma dos éxons;

^d comprimento das sequências de aminoácidos preditas;

^e FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) de met (metacestódeo), pré-grávido e grávido, de acordo com Tsai *et al.*, 2013.

Tabela 2: Níveis de identidade/similaridade (%) entre as proteínas Eg14-3-3 e Em14-3-3. As identidades são mostradas nas linhas cinzas e similaridade estão apresentadas em linhas brancas.

	Em14-3-3.1	Em14-3-3.2	Em14-3-3.3	Em14-3-3.4	Em14-3-3.5	Em14-3-3.6
Eg14-3-3.1	98%	47%	46%	47%	33%	33%
	98%	61%	62%	64%	53%	54%
Em14-3-3.1		47%	46%	48%	33%	33%
		61%	62%	65%	53%	54%
Eg14-3-3.2		82%	47%	45%	34%	32%
		83%	63%	63%	51%	53%
Em14-3-3.2			41%	38%	29%	27%
			54%	54%	43%	45%
Eg14-3-3.3			96%	53%	29%	31%
			96%	68%	45%	50%
Em14-3-3.3				51%	28%	30%
				67%	44%	48%
Eg14-3-3.4				98%	27%	29%
				100%	47%	50%
Em14-3-3.4					27%	29%
					47%	50%
Eg14-3-3.5					97%	21%
					98%	38%
Em14-3-3.5						21%
						38%
Eg14-3-3.6						98%
						99%
Em14-3-3.6						

4.2.2 Análise da expressão de proteínas 14-3-3 em componentes de cistos hidáticos de *E. orteleppi*

Para avaliação do padrão de expressão das isoformas 14-3-3 em cistos individuais de *E. orteleppi* (Eo14-3-3), espécie também presente no sul do Brasil (Balbinotti *et al.*, 2012), foram utilizados os anticorpos produzidos contra as isoformas de Eg14-3-3 (capítulo I). Em todas as amostras de PSC analisadas, foi observada a expressão das isoformas Eo14-3-3.1-4. Nas amostras de camada germinativa e líquido hidático, apenas as isoformas Eo14-3-3.1 e Eo14-3-3.3 foram detectadas (Figura 8).

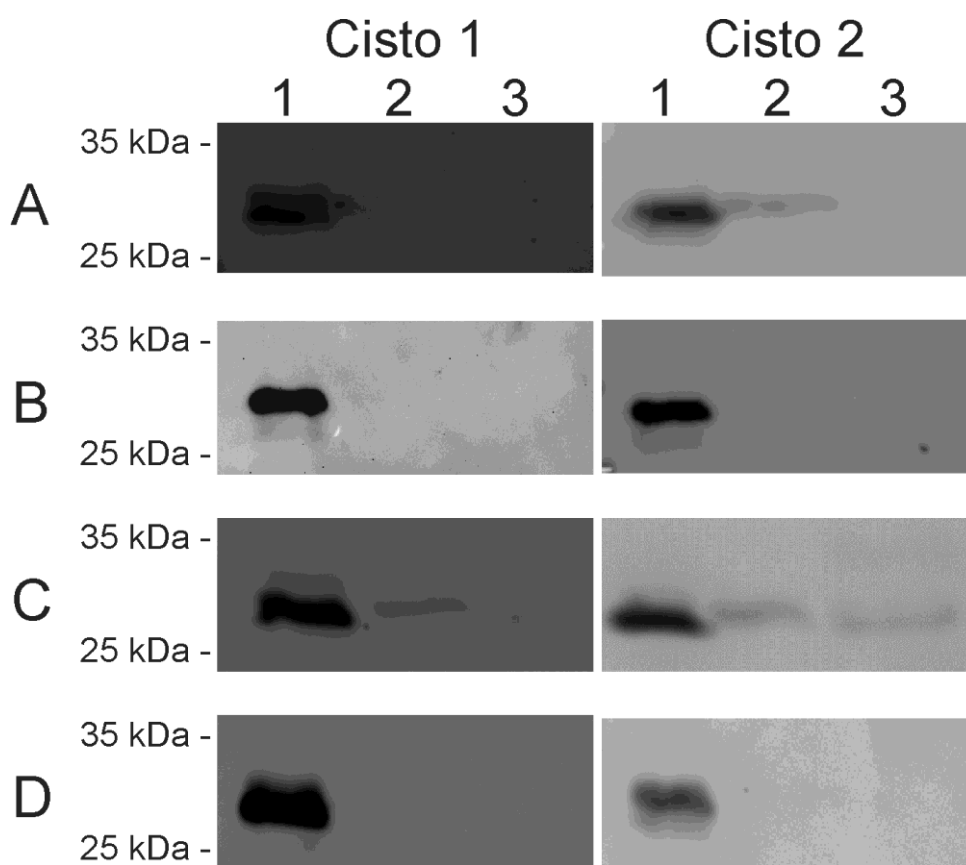


Figura 8: Análise do padrão de expressão de proteínas 14-3-3 em componentes do metacéstódeo de *E. orteleppi*. Proteínas de PSC (1), camada germinativa (2) e líquido hidático (3) foram analisadas por imunoblot com anticorpos contra as isoformas (A) Eo14-3-3.1, (B) Eo14-3-3.2, (C) Eo14-3-3.3, e (D) Eo14-3-3.4 em cistos individuais (1 e 2).

5. Discussão, conclusões e perspectivas

No presente estudo, foram utilizadas diversas abordagens para a caracterização das diferentes isoformas de proteínas 14-3-3 do gênero *Echinococcus*. Essa caracterização permitiu verificar a expressão de quatro isoformas de proteínas 14-3-3 em componentes de metacestódeos e evidenciou possíveis papéis desempenhados por estas proteínas no metacestódeo e na sua interface com o hospedeiro.

O estudo da família dos genes codificadores de proteínas 14-3-3 em *E. granulosus* e *E. multilocularis* (*Eg14-3-3.1-6* e *Em14-3-3.1-6*, respectivamente) foi realizado pela análise comparativa das sequências completas dos genomas dessas espécies e dados transcritômicos já publicados (Parkinson *et al.*, 2012, Tsai *et al.*, 2013, Zheng *et al.*, 2013). A comparação entre as espécies de *E. granulosus* e *E. multilocularis* demonstrou que a estrutura éxon-ínton destes genes e as sequências das proteínas demonstraram maior semelhança entre os ortólogos do que entre os parálogos. O alinhamento entre as proteínas *Em14-3-3* e *Eg14-3-3* revelou que as identidades com valores mais elevados foram entre os seus respectivos pares de ortólogos. Assim como observado neste estudo, em mamíferos já foi descrito que há uma maior semelhança entre os ortólogos do que entre os parálogos de proteínas 14-3-3 (Wang & Shakes 1996).

A maior semelhança entre proteínas 14-3-3 ortólogas do que entre parálogas também foi evidenciada pela filogenia. As isoformas 14-3-3.1-6 de *E. multilocularis* e de *E. granulosus* formaram seis grupos monofiléticos juntamente com seus respectivos ortólogos bem como de organismos relacionados, como *T. solium* e *H. microstoma*. Isso indica que a configuração dos seis parálogos da família 14-3-3 de *E. multilocularis* de *E. granulosus* foi estabelecida antes dos eventos de especiação que separaram essas duas espécies.

A avaliação do padrão de expressão das isoformas 14-3-3 foi realizada utilizando materiais parasitários das espécies *E. granulosus* e *E. ortleppi* sendo essas são as espécies mais prevalentes do complexo *E. granulosus* s.l. no Brasil, e hiperendêmicas no Cone Sul da América do Sul (Balbinotti *et al.*, 2012, Alvarez Rojas *et al.*, 2014). Estes resultados do padrão de expressão das isoformas 14-3-3.1-4 estão de acordo com estudos prévios de transcrição (Tsai *et al.*, 2013,

Zheng *et al.*, 2013) que relataram a expressão de Eg14-3-3.1-4 na fase larval patogênica de *E. granulosus*, sendo que as isoformas Eg14-3-3.1 e Eg14-3-3.3 são descritas como tendo os maiores níveis de expressão no parasito e neste estudo foram as únicas duas isoformas detectadas em camada germinativa e líquido hidático de *E. orteppi*. A presença de Eg14-3-3.1-4 em protoescolices é corroborada pelo estudo proteômico de protoescolices onde as quatro isoformas foram identificadas (Monteiro *et al.*, 2010). Neste mesmo estudo proteômico foi também identificada a presença de das isoformas Eg14-3-3.1 e Eg14-3-3.2 em camada germinativa. A presença da proteína 14-3-3.1 em líquido hidático já foi previamente relatada (Aziz *et al.*, 2011), visto que o líquido hidático representa uma interface entre o parasito e o hospedeiro, a presença de proteínas intracelulares no líquido hidático é sugestivo da participação destas proteínas na modulação da resposta imune do hospedeiro.

Em nossos resultados, observamos diferenças de expressão entre as isoformas 14-3-3 nos diferentes componentes do cisto hidático, entre cistos individuais e também entre as espécies *E. granulosus* e *E. orteppi*. Estudos prévios, com outros organismos, também sugerem que a especialização funcional das isoformas de 14-3-3 pode estar associada à sua expressão diferencial (Paul *et al.*, 2012, Uhart & Bustos 2014). As diferenças observadas na expressão das isoformas 14-3-3 entre cistos individuais podem estar relacionadas com a condição fisiológica do parasito, a qual pode estar associada ao tempo de infecção bem como a uma resposta adaptativa na relação com o hospedeiro.

As proteínas 14-3-3 são conhecidas por interagirem com uma ampla gama de proteínas (Obsilova *et al.*, 2014). Essas interações entre 14-3-3 e suas proteínas-alvo podem regular funções biológicas e essa regulação depende do ligante-alvo e da isoforma de 14-3-3. A ligação a uma proteína 14-3-3 pode afetar a função dos seus interagentes de várias maneiras, incluindo modulação da atividade de enzimas, alterações de localização subcelular, a estrutura ou estabilidade das proteínas, ou modulação de interações moleculares com outras proteínas.

Para investigar as funções possivelmente desempenhadas pelas isoformas 14-3-3 em *E. granulosus*, nós realizamos a identificação das proteínas de interação

de cada uma das quatro isoformas de 14-3-3 expressas na fase larval patogênica do parasito. Neste trabalho, fizemos a opção de usar três ensaios de interação distintos e complementares para detecção dos ligantes de proteínas Eg14-3-3, os quais permitiram a identificação de diferentes tipos de interação. O 2D *gel overlay* detecta proteínas mais abundantes e solúveis (Gygi *et al.*, 2000) e interações diretas e indiretas de proteína-proteína (Meek *et al.*, 2004). Para demonstrar a especificidade deste ensaio nos utilizamos um competidor específico o peptídeo R18. Na cromatografia de afinidade também foi utilizado o peptídeo R18 o que é especialmente útil para identificar interações específicas e possivelmente interações indiretas de proteína-proteína (Meek *et al.*, 2004). Já os ensaios de *cross linking* permitem também identificar interações proteína-proteína transitórias, uma vez que o reagente (Sulfo-SBED) utilizado permite a estabilização das interações proteicas. O uso destes três ensaios de interação distintos e complementares nos permitiu ampliar o número de ligantes proteicos identificados para cada uma das quatro proteínas 14-3-3 de *E. granulosus* investigadas.

Devido à necessidade de grande quantidade de material parasitário para realização dos experimentos com as quatro isoformas, alguns ensaios não puderam ser realizados com réplicas técnicas e biológicas, considerando também que o fornecimento de material biológico é limitado. No entanto, os resultados descritos foram obtidos com *pools* de protoescólices provenientes de diferentes indivíduos (cistos hidáticos) sendo considerado representativo das variações biológicas. O número de cistos em cada *pool* foi determinado pela quantidade de protoescólices (70 µl de PSCs ~ 1 mg de extrato proteico) necessários para fornecer a quantidade de extrato proteico para cada ensaio. Os ensaios de *gel overlay* foram os que necessitavam menor quantidade de extrato proteico (2 mg) e, portanto, foram realizados com réplicas biológicas, com cada uma dessas réplicas corresponde a um *pool* de protoescólices obtidos de diferentes cistos. Os ensaios de *cross linking* e cromatografia de afinidade necessitavam de quantidades bem maiores de material parasitário (de 5 a 20 mg). O uso de *pools* de protoescólices provenientes de vários cistos, contudo, torna a amostra representativa de

possíveis variações biológicas (Monteiro *et al.*, 2010), mas, réplicas técnicas não puderam ser realizadas.

Mesmo que nossas condições *in vitro* não representem exatamente as naturais, elas viabilizaram interações entre proteínas Eg14-3-3 e outras proteínas ligantes. Possivelmente, tais interações correspondem àquelas que ocorrem *in vivo*, como demonstrado em outros trabalhos utilizando métodos semelhantes. Por exemplo, utilizando cromatografia de afinidade e *gel overlay* Meek *et al.*, (2004), identificaram proteínas de interação com as 14-3-3 humanas que posteriormente foram confirmadas por abordagem *in vivo*, entre elas a dineína, a tubulina e a proteína de ancoramento à quinase (AKAP) (Jin *et al.*, 2004). Além disso, nossos ensaios efetivamente foram capazes de evidenciar interações das proteínas Eg14-3-3 que são descritas classicamente como proteínas interagentes de 14-3-3 e estes resultados são semelhantes aos relatados em outros estudos com diferentes organismos (Meek *et al.*, 2004, Alexander & Morris 2006, Pauly *et al.*, 2007, Chang *et al.*, 2009). Dentre as proteínas identificadas há, por exemplo, diversas proteínas de citoesqueleto, proteínas envolvidas com metabolismo e chaperonas como, por exemplo, actina, tubulina, enolase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e HSPs. Isso demonstra que, independente das condições de realização dos experimentos ou do organismo estudado, algumas proteínas de interação identificadas parecem ser conservadas, o que demonstra a confiabilidade dos nossos resultados.

A opção de estudar as isoformas de Eg14-3-3.1-4 se deu em função de serem estas as isoformas expressas na forma larval patogênica do parasito, conforme dados transcritômicos (Parkinson *et al.*, 2012, Tsai *et al.*, 2013, Zheng *et al.*, 2013) e proteômicos (Monteiro *et al.*, 2010, Virginio *et al.*, 2012), os quais foram posteriormente confirmados por nossos estudos de expressão. Para estudos funcionais, optou-se pela análise comparativa do repertório de proteínas ligantes dessas quatro isoformas, visando a identificação de possíveis funções compartilhadas ou especializadas.

A identificação de proteínas ligantes compartilhadas pelas isoformas Eg14-3-3.1-4, é sugestiva de um certo grau de redundância funcional. Essa redundância funcional de proteínas 14-3-3 já foi anteriormente demonstrada em

outros organismos onde as isoformas 14-3-3 apresentaram perfis de interação com sobreposição parcial (Swatek *et al.*, 2011, Paul *et al.*, 2012). Por outro lado, várias proteínas de ligação às isoformas Eg14-3-3 identificadas em nossos experimentos foram exclusivas de uma única isoforma, o que é sugestivo de um certo grau de especialização funcional. Estudos anteriores com outros organismos sugerem que há de fato especialização funcional para isoformas de 14-3-3, a qual pode estar associada à expressão diferencial das proteínas ou a interação com diferentes ligantes (Paul *et al.*, 2012, Uhart & Bustos 2014). A teoria da especificidade das isoformas de proteínas 14-3-3 prevê que algumas delas têm uma ou mais função(ões) que não está(ão) presente(s) em outras isoformas, mesmo que essas outras isoformas estejam presentes na mesma célula (Paul *et al.*, 2012). Esta teoria não se opõe à idéia de que existem exemplos de sobreposição de funções, mas demonstra que algumas funções seriam bem distintas entre as isoformas. Em *Drosophila*, foi identificado que a isoforma D14-3-3 ϵ desempenha um papel específico na migração celular, visto que a deficiência de D14-3-3 ϵ não pôde não ser compensada pela isoforma 14-3-3 Leo (Tsigkari *et al.*, 2012). Em um estudo com linhagens celulares humanas foram avaliados os diferentes parálogos de 14-3-3, demonstrando que as 14-3-3 estavam presentes em tecidos específicos e com localização subcelular diferenciada, sugerindo uma especialização entre as isoformas (Moreira *et al.*, 2008).

A partir dos ensaios de interação realizados (2D *gel overlay*, *cross linking* e cromatografia de afinidade), foi possível evidenciar, como base nos ligantes identificados, que as proteínas Eg14-3-3 estão envolvidas em ampla gama de funções biológicas. O repertório de proteínas de ligação que é compartilhado por quatro, três ou duas isoformas Eg14-3-3 está representado principalmente por proteínas que estão envolvidas em funções gerais, como o transporte e metabolismo de carboidratos, modificações pós-traducionais e funções relacionadas com o citoesqueleto. As proteínas identificadas interagindo exclusivamente com uma única isoforma Eg14-3-3 estão predominantemente envolvidas em funções mais especializadas, como transcrição, tradução, tráfego intracelular/secreção e proteínas envolvidas com estruturas extracelulares.

Entre as proteínas Eg14-3-3 estudadas, a isoforma Eg14-3-3.3 foi a que apresentou um maior número de interações exclusivas. Essas interações representavam tanto o envolvimento dessa isoforma com funções mais básicas como em funções mais especializadas. Isto sugere que essa isoforma participa de processos moleculares tão diversos como transcrição e tráfego intracelular e secreção, apontando para um maior grau de multifuncionalidade. Um dos ligantes de Eg14-3-3.3 identificados foi a tetraspanina, uma proteína com potencial imunomodulador. Em *Schistosoma mansoni* a tetraspanina é expressa no tegumento externo do adulto atuando como receptor de ligantes para o hospedeiro (Tran *et al.*, 2006). A maioria das moléculas imunomoduladoras de superfície envolvem interações entre receptor e ligante, de modo que a tetraspanina associada às proteínas parceiras pode facilitar o seu posicionamento lateral na membrana (Levy & Shoham 2005). Esta proteína pode associar-se com diferentes proteínas, dependendo do tipo de célula, em microdomínios de membrana que fornecem uma estrutura de suporte para a transmissão de estímulos externos para componentes de sinalização intracelulares.

As tetraspaninas também já foram descritas como marcadores proteicos extracelulares de vesículas, tais como os exossomos (Perez-Hernandez *et al.*, 2013). Estas vesículas extracelulares estão emergindo como novos mecanismos de comunicação intercelular, estando envolvidas na apresentação de antígenos, na imunidade e na transmissão de patógenos. A presença das proteínas 14-3-3 e das tetraspaninas em vesículas já foi descrita através de proteômica de exossomos (Mathivanan *et al.*, 2010), sendo interessante especular um possível envolvimento da interação de Eg14-3-3.3 com a tetraspanina na exportação de proteínas via vesículas. Neste contexto, a Eg14-3-3.3 poderia ser tanto um alvo da exportação como um possível mediador do processo a partir das interações estabelecidas com seus ligantes.

Entre as interações da isoforma Eg14-3-3.3 foram identificadas proteínas extracelulares, como por exemplo, colágeno, a proteína G1Y162 e integrinas, o que é um indicativo de que a Eg14-3-3.3 pode estar potencialmente envolvida na entrega de proteínas de membrana na superfície da célula. Entre as proteínas extracelulares destaca-se a proteína G1Y162 uma proteína interessante porque

apresentou ortólogos apenas com parasitos, tais como dos gêneros *Echinococcus* e *Taenia*. A sequência de aminoácidos de EMY162 (proteína ortóloga de *E. multilocularis*) possui uma sequência de peptídeo-sinal potencial para sua secreção e ancoramento na membrana. Proteínas secretadas e ancoradas na superfície de parasitos podem estar envolvidas em interações do parasito com o hospedeiro, podendo participar de funções incluindo penetração e estabelecimento nos tecidos do hospedeiro, modulação da resposta imune (Katoch *et al.*, 2008). A análise da expressão da proteína EMY162 demonstrou que esta proteína é expressa em metacestódeo, em protoescólices e no verme adulto é altamente provável que essa proteína desempenha um papel essencial para a sobrevivência do parasito na infecção por *E. multilocularis* em todas as estágios de desenvolvimento (Kouguchi *et al.*, 2007). Proteínas transportadas até a membrana e com possível exposição extracelular dependente, direta ou indiretamente, da Eg14-3-3 podem ser importantes para processos de interação parasito-hospedeiro. A modulação do repertório de proteínas de membrana na superfície celular por proteínas 14-3-3 tem sido reconhecida como um importante mecanismo regulador fisiológico (Smith *et al.*, 2011).

A partir deste trabalho foi possível estabelecer os padrões de expressão das isoformas Eg14-3-3 sugerindo possíveis papéis desempenhados por estas proteínas em mecanismos moleculares de interação parasito-hospedeiro. Os ligantes das proteínas Eg14-3-3 identificados estão relacionados com uma vasta gama de funções biológicas, indicando que as proteínas Eg14-3-3 estão envolvidos em várias vias moleculares em *E. granulosus*. Embora tenhamos encontrados ligantes descritos anteriormente como parceiros das proteínas 14-3-3 novas interações foram relatadas, o que poderia representar interações proteicas específica do parasito. Nossos resultados revelaram que as isoformas Eg14-3-3 possuem parceiros compartilhados, indicando algumas funções que se sobrepõem, mas elas também se ligam proteínas exclusivas sugerindo funções especializadas. Com isso, é notável que a caracterização do padrão de expressão e as interações aqui demonstradas indicam papéis importantes para estas proteínas e sua relevância para o desenvolvimento do parasito.

A partir das interações identificadas e das funções evidenciadas para as Eg14-3-3, estudos mais direcionados para confirmar as interações individuais e o papel regulador desempenhado por essas proteínas em diferentes vias celulares do parasito surgem como perspectivas importantes deste trabalho. A confirmação das proteínas de interação com as Eg14-3-3 deve ser realizada por ensaios de imunoprecipitação (Karam *et al.*, 2010) a partir da escolha de proteínas-alvo. Como já temos disponíveis os anticorpos anti-14-3-3, poderíamos realizar a confirmação das proteínas de interação usando anticorpos específicos.

Os resultados até agora obtidos abrem também a perspectiva de investigar a possível regulação que as proteínas 14-3-3 podem desempenhar ao se ligarem com seus interagentes. Essa análise poderia ser realizada avaliando o efeito de uma isoforma 14-3-3 sobre uma determinada proteína-alvo, conforme a evidência de interação prévia fornecida pelos nossos dados. Essa avaliação poderia, por exemplo, indicar se essa regulação tem um efeito direto no aumento/diminuição de atividade da proteína-alvo na presença/ausência das proteínas 14-3-3, se as proteínas de interação necessitam das proteínas 14-3-3 para serem estabilizadas durante sua atividade, ou se as proteínas 14-3-3 podem afetar a ligação de uma determinada proteína por oclusão física (Cotelle *et al.*, 2000, Chernik *et al.*, 2007).

A caracterização do padrão de expressão e das interações aqui demonstradas indicam papéis importantes para as proteínas Eg14-3-3 na biologia de *E. granulosus*. Para demonstrar a relevância das proteínas Eg14-4-3 para sobrevivência e desenvolvimento do parasito, seria interessante a realização de experimentos de interferência por RNA para o silenciamento de genes codificadores destas proteínas. A partir destes ensaios similares aos descritos por (Mizukami *et al.*, 2010), poderiam ser avaliados fenótipos de perda de função em protoescólices, os quais evidenciaríamos papéis funcionais dos genes/proteínas afetados. Entre os fenótipos que poderiam ser analisados estão a viabilidade, a integridade estrutural, a motilidade e o desenvolvimento através da diferenciação ou rediferenciação de protoescólices *in vitro*.

As proteínas Eg14-3-3 e alguns de seus ligantes identificados neste estudo podem apresentar potencial para diagnóstico e vacinação. As proteínas 14-3-3, a tetraspanina e a G1Y162 já foram descritas em estudos prévios como potenciais

antígenos vacinais para *E. multilocularis* (Kouguchi *et al.*, 2007, Katoh *et al.*, 2008, Siles-Lucas *et al.*, 2008, Dang *et al.*, 2009). Uma perspectiva deste trabalho é a avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes Eg14-3-3 e alguns de seus alvos frente a soros de pacientes humanos com hidatidose cística. A avaliação da imunogenicidade a partir da análise do possível efeito das proteínas Eg14-3-3 recombinantes sobre a secreção de citocinas por células do sistema imune representa também uma interessante perspectiva.

O fato das proteínas Eg14-3-3 terem se mostrado versatéis ao interagirem com diversas outras proteínas essenciais de diferentes rotas biológicas, as torna alvos interessantes para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para a hidatidose. As várias rotas em que as proteínas Eg14-3-3 atuam poderiam ser bloqueadas através da inibição das interações proteína-proteína. Espera-se que o bloqueio destas rotas possa afetar o desenvolvimento ou a sobrevivência do parasito.

6. Referências

- ACEVEDO, S., K. TSIGKARI, S. GRAMMENOUDI, E. SKOULAKIS. 2007. *In vivo* functional specificity and homeostasis of *Drosophila* 14-3-3 proteins. *Genetics* 177: 239-253.
- ALEXANDER, R. D., P. C. MORRIS. 2006. A proteomic analysis of 14-3-3 binding proteins from developing barley grains. *Proteomics* 6: 1886-1896.
- ALVAREZ ROJAS, C. A., T. ROMIG, M. W. LIGHTOWLERS. 2014. *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes infecting humans--review of current knowledge. *Int J Parasitol* 44: 9-18.
- ANDRADE, M., M. SILES-LUCAS, E. ESPINOZA, J. PÉREZ ARELLANO, B. GOTTSTEIN, A. MURO. 2004. *Echinococcus multilocularis* laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages in vitro. *Nitric Oxide* 10: 150-155.
- AZIZ, A., W. ZHANG, J. LI, A. LOUKAS, D. P. MCMANUS, J. MULVENNA. 2011. Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J Proteomics* 74: 1560-1572.
- BALBINOTTI, H., G. B. SANTOS, J. BADARACO, A. C. AREND, D. GRAICHEN, K. L. HAAG, A. ZAHA. 2012. *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Vet Parasitol* 188: 255-260.
- BATTELLI, G. 2009. Echinococcosis: costs, losses and social consequences of a neglected zoonosis. *Vet Res Commun* 33 Suppl 1: 47-52.
- BESEMER, J., M. BORODOVSKY. 2005. GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses. *Nucleic Acids Res* 33: W451-454.
- BRIDGES, D., G. MOORHEAD. 2005. 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE* 2005: re10.
- BRINDLEY, P. J., M. MITREVA, E. GHEDIN, S. LUSTIGMAN. 2009. Helminth genomics: The implications for human health. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e538.
- BUDKE, C., P. DEPLAZES, P. TORGERSON. 2006. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis* 12: 296-303.
- BURGE, C. B., S. KARLIN. 1998. Finding the genes in genomic DNA. *Curr Opin Struct Biol* 8: 346-354.
- CHANG, I. F., A. CURRAN, R. WOOLSEY, D. QUILICI, J. C. CUSHMAN, R. MITTLER, A. HARMON, J. F. HARPER. 2009. Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* 9: 2967-2985.

- CHERNIK, I. S., A. S. SEIT-NEBI, S. B. MARSTON, N. B. GUSEV. 2007. Small heat shock protein Hsp20 (HspB6) as a partner of 14-3-3gamma. *Mol Cell Biochem* 295: 9-17.
- COTELLE, V., S. E. MEEK, F. PROVAN, F. C. MILNE, N. MORRICE, C. MACKINTOSH. 2000. 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved *Arabidopsis* cells. *EMBO J* 19: 2869-2876.
- DANG, Z., K. YAGI, Y. OKU, H. KOUJUCHI, K. KAJINO, J. WATANABE, J. MATSUMOTO, R. NAKAO, H. WAKAGURI, A. TOYODA, C. SUGIMOTO. 2009. Evaluation of *Echinococcus multilocularis* tetraspanins as vaccine candidates against primary alveolar echinococcosis. *Vaccine* 27: 7339-7345.
- DARLING, D., J. YINGLING, A. WYNshaw-BORIS. 2005. Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development. *Curr Top Dev Biol* 68: 281-315.
- DE LA RUE, M. 2008. Cystic echinococcosis in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50: 53-56.
- DOUGHERTY, M., D. MORRISON. 2004. Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* 117: 1875-1884.
- DÍAZ, A., C. CASARAVILLA, F. IRIGOÍN, G. LIN, J. O. PREVIATO, F. FERREIRA. 2011. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol* 27: 204-213.
- DÍAZ, Á., C. FERNÁNDEZ, Á. PITTINI, P. SEOANE, J. E. ALLEN, C. CASARAVILLA. 2015. The laminated layer: Recent advances and insights into *Echinococcus* biology and evolution. *Exp Parasitol*.
- ECKERT, J., P. DEPLAZES. 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* 17: 107-135.
- FERNÁNDEZ, C., W. GREGORY, P. LOKE, R. MAIZELS. 2002. Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Mol Biochem Parasitol* 122: 171-180.
- FU, H., R. SUBRAMANIAN, S. MASTERS. 2000. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 617-647.
- GARDINO, A., S. SMERDON, M. YAFFE. 2006. Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Semin Cancer Biol* 16: 173-182.
- GARDINO, A. K., M. B. YAFFE. 2011. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* 22: 688-695.

GAVIDIA, C., A. GONZALEZ, W. ZHANG, D. MCMANUS, L. LOPERA, B. NINAQUISPE, H. GARCIA, S. RODRÍGUEZ, M. VERASTEGUI, C. CALDERON, W. PAN, R. GILMAN. 2008. Diagnosis of cystic echinococcosis, central Peruvian Highlands. *Emerg Infect Dis* 14: 260-266.

GELPERIN, D., J. WEIGLE, K. NELSON, P. ROSEBOOM, K. IRIE, K. MATSUMOTO, and S. LEMMON. 1995. 14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport Ras signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11539-11543.

GOTTSTEIN, B. 2005. [Vaccination against echinococcosis (?)]. *Ther Umsch* 62: 685-693.

GOTTSTEIN, B., K. HAAG, M. WALKER, J. MATSUMOTO, N. MEJRI, A. HEMPHILL. 2006. Molecular survival strategies of *Echinococcus multilocularis* in the murine host. *Parasitol Int* 55 Suppl: S45-49.

GYGI, S. P., G. L. CORTHALS, Y. ZHANG, Y. ROCHON, R. AEBERSOLD. 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9390-9395.

HEWITSON, J., J. GRAINGER, R. MAIZELS. 2009. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol* 167: 1-11.

JENKINS, D., T. ROMIG, R. THOMPSON. 2005. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.--a global update. *Int J Parasitol* 35: 1205-1219.

JIN, J., F. D. SMITH, C. STARK, C. D. WELLS, J. P. FAWCETT, S. KULKARNI, P. METALNIKOV, P. O'DONNELL, P. TAYLOR, L. TAYLOR, A. ZOUGMAN, J. R. WOODGETT, L. K. LANGE BERG, J. D. SCOTT, T. PAWSON. 2004. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol* 14: 1436-1450.

KARAM, C. S., W. A. KELLNER, N. TAKENAKA, A. W. CLEMMONS, V. G. CORCES. 2010. 14-3-3 mediates histone cross-talk during transcription elongation in *Drosophila*. *PLoS Genet* 6: e1000975.

KATOH, Y., H. KOUGUCHI, J. MATSUMOTO, A. GOTO, T. SUZUKI, Y. OKU, K. YAGI. 2008. Characterization of emY162 encoding an immunogenic protein cloned from an adult worm-specific cDNA library of *Echinococcus multilocularis*. *Biochim Biophys Acta* 1780: 1-6.

KERN, P. 2010. Clinical features and treatment of alveolar echinococcosis. *Curr Opin Infect Dis* 23: 505-512.

KJARLAND, E., T. J. KEEN, R. KLEPPE. 2006. Does isoform diversity explain functional differences in the 14-3-3 protein family? *Curr Pharm Biotechnol* 7: 217-223.

- KLEPPE, R., A. MARTINEZ, S. O. DØSKELAND, J. HAAVIK. 2011. The 14-3-3 proteins in regulation of cellular metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 22: 713-719.
- KOUGUCHI, H., J. MATSUMOTO, Y. KATOH, Y. OKU, T. SUZUKI, K. YAGI. 2007. The vaccination potential of EMY162 antigen against *Echinococcus multilocularis* infection. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 915-920.
- LALLE, M., S. CAMERINI, S. CECCHETTI, A. SAYADI, M. CRESCENZI, E. POZIO. 2012. Interaction network of the 14-3-3 protein in the ancient protozoan parasite *Giardia duodenalis*. *J Proteome Res* 11: 2666-2683.
- LEVY, S., T. SHOHAM. 2005. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 5: 136-148.
- LIGHTOWLERS, M. 2006. Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. *Parasitology* 133 Suppl: S27-42.
- MATHIVANAN, S., H. Ji, R. J. SIMPSON. 2010. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73: 1907-1920.
- MCMANUS, D., W. ZHANG, J. LI, P. BARTLEY. 2003. Echinococcosis. *Lancet* 362: 1295-1304.
- MCMANUS, D. P., D. J. GRAY, W. ZHANG, Y. YANG. 2012. Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis. *BMJ* 344: e3866.
- MEEK, S., W. LANE, H. PIWNICA-WORMS. 2004. Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. *J Biol Chem* 279: 32046-32054.
- MHAWECH, P. 2005. 14-3-3 proteins--an update. *Cell Res* 15: 228-236.
- MIZUKAMI, C., M. SPILLOTIS, B. GOTTSTEIN, K. YAGI, K. KATAKURA, Y. OKU. 2010. Gene silencing in *Echinococcus multilocularis* protoscoleces using RNA interference. *Parasitol Int*.
- MONTEIRO, K. M., M. O. DE CARVALHO, A. ZAHA, H. B. FERREIRA. 2010. Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics* 10: 1985-1999.
- MOREIRA, J. M., T. SHEN, G. OHLSSON, P. GROMOV, I. GROMOVA, J. E. CELIS. 2008. A combined proteome and ultrastructural localization analysis of 14-3-3 proteins in transformed human amnion (AMA) cells: definition of a framework to study isoform-specific differences. *Mol Cell Proteomics* 7: 1225-1240.
- MORO, P., C. CAVERO, M. TAMBINI, Y. BRICEÑO, R. JIMÉNEZ, L. CABRERA. 2008. Identification of risk factors for cystic echinococcosis in a peri-urban population of Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 75-78.

MORO, P., P. SCHANTZ. 2009. Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis* 13: 125-133.

MORRISON, D. 2009. The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* 19: 16-23.

NAKAO, M., A. LAVIKAINEN, T. YANAGIDA, A. ITO. 2013. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Int J Parasitol* 43: 1017-1029.

OBSIL, T., and V. OBSILOVA. 2011. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol* 22: 663-672.

OBSILOVA, V., M. KOPECKA, D. KOSEK, M. KACIROVA, S. KYLAROVA, L. REZABKOVA, T. OBSIL. 2014. Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation. *Physiol Res* 63 Suppl 1: S155-164.

PARKINSON, J., J. D. WASMUTH, G. SALINAS, C. V. BIZARRO, C. SANFORD, M. BERRIMAN, H. B. FERREIRA, A. ZAHA, M. L. BLAXTER, R. M. MAIZELS, C. FERNÁNDEZ. 2012. A transcriptomic analysis of *Echinococcus granulosus* larval stages: implications for parasite biology and host adaptation. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1897.

PAUL, A. L., F. C. DENISON, E. R. SCHULTZ, A. K. ZUPANSKA, R. J. FERL. 2012. 14-3-3 phosphoprotein interaction networks - does isoform diversity present functional interaction specification? *Front Plant Sci* 3: 190.

PAULY, B., M. LASI, C. MACKINTOSH, N. MORRICE, A. IMHOF, J. REGULA, S. RUDD, C. N. DAVID, A. BÖTTGER. 2007. Proteomic screen in the simple metazoan *Hydra* identifies 14-3-3 binding proteins implicated in cellular metabolism, cytoskeletal organisation and Ca²⁺ signalling. *BMC Cell Biol* 8: 31.

PEREZ-HERNANDEZ, D., C. GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, I. JORGE, S. LÓPEZ-MARTÍN, A. URSA, F. SÁNCHEZ-MADRID, J. VÁZQUEZ, M. YÁÑEZ-MÓ. 2013. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem* 288: 11649-11661.

POZUELO RUBIO, M., K. M. GERAGHTY, B. H. WONG, N. T. WOOD, D. G. CAMPBELL, N. MORRICE, C. MACKINTOSH. 2004. 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J* 379: 395-408.

SALAMOV, A. A., V. V. SOLOVYEV. 2000. Ab initio gene finding in *Drosophila* genomic DNA. *Genome Res* 10: 516-522.

SALAZAR-ANTON, F., J. LINDH. 2011. *Taenia solium*: a two-dimensional Western blotting method combined with the use of an EST-library for the identification of immunogenic proteins recognized by sera from neurocysticercosis patients. *Exp Parasitol* 128: 371-376.

- SANTIVÁÑEZ, S. J., A. HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, N. CHILE, A. OLEAGA, Y. ARANA, S. PALMA, M. VERASTEGUI, A. E. GONZALEZ, R. GILMAN, H. H. GARCIA, M. SILES-LUCAS, C. W. G. I. PERU. 2010. Proteomic study of activated *Taenia solium* oncospheres. *Mol Biochem Parasitol* 171: 32-39.
- SCHOONHEIM, P., H. VEIGA, D. C. PEREIRA, G. FRISO, K. VAN WIJK, A. DE BOER. 2007. A comprehensive analysis of the 14-3-3 interactome in barley leaves using a complementary proteomics and two-hybrid approach. *Plant Physiol* 143: 670-683.
- SILES-LUCAS, M., R. FELLEISEN, A. HEMPHILL, W. WILSON, B. GOTTSTEIN. 1998. Stage-specific expression of the 14-3-3 gene in *Echinococcus multilocularis*. *Mol Biochem Parasitol* 91: 281-293.
- SILES-LUCAS, M., M. MERLI, B. GOTTSTEIN. 2008. 14-3-3 proteins in *Echinococcus*: their role and potential as protective antigens. *Exp Parasitol* 119: 516-523.
- SILES-LUCAS, M., M. MERLI, U. MACKENSTEDT, B. GOTTSTEIN. 2003. The *Echinococcus multilocularis* 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis. *Vaccine* 21: 431-439.
- SILES-LUCAS, M., C. NUNES, A. ZAHA. 2001. Comparative analysis of the 14-3-3 gene and its expression in *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitology* 122: 281-287.
- SILES-LUCAS, M., C. NUNES, A. ZAHA, M. BREIJO. 2000. The 14-3-3 protein is secreted by the adult worm of *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunol* 22: 521-528.
- SILES-LUCAS, M. M., B. GOTTSTEIN. 2003. The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. *Trends Parasitol* 19: 575-581.
- SIRACUSANO, A., R. RIGANÒ, E. ORTONA, E. PROFUMO, P. MARGUTTI, B. BUTTARI, F. DELUNARDO, A. TEGGI. 2008. Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. *Exp Parasitol* 119: 483-489.
- SMITH, A. J., J. DAUT, B. SCHWAPPACH. 2011. Membrane proteins as 14-3-3 clients in functional regulation and intracellular transport. *Physiology (Bethesda)* 26: 181-191.
- SWATEK, K. N., K. GRAHAM, G. K. AGRAWAL, J. J. THELEN. 2011. The 14-3-3 isoforms chi and epsilon differentially bind client proteins from developing *Arabidopsis* seed. *J Proteome Res* 10: 4076-4087.
- THOMPSON, R., A. LYMBERY, C. CONSTANTINE. 1995. Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Adv Parasitol* 35: 145-176.
- TORGERSON, P., C. BUDKE. 2003. Echinococcosis--an international public health challenge. *Res Vet Sci* 74: 191-202.

TORGERSON, P. R. 2003. Economic effects of echinococcosis. *Acta Trop* 85: 113-118.

TORGERSON, P. R., K. KELLER, M. MAGNOTTA, N. RAGLAND. 2010. The global burden of alveolar echinococcosis. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e722.

TRAN, M. H., M. S. PEARSON, J. M. BETHONY, D. J. SMYTH, M. K. JONES, M. DUKE, T. A. DON, D. P. MCMANUS, R. CORREA-OLIVEIRA, A. LOUKAS. 2006. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med* 12: 835-840.

TSAI, I. J., M. ZAROWIECKI, N. HOLROYD, A. GARCIARRUBIO, A. SANCHEZ-FLORES, K. L. BROOKS, A. TRACEY, R. J. BOBES, G. FRAGOSO, E. SCIUTTO, M. ASLETT, H. BEASLEY, H. M. BENNETT, J. CAI, F. CAMICIA, R. CLARK, M. CUCHER, N. DE SILVA, T. A. DAY, P. DEPLAZES, K. ESTRADA, C. FERNÁNDEZ, P. W. HOLLAND, J. HOU, S. HU, T. HUCKVALE, S. S. HUNG, L. KAMENETZKY, J. A. KEANE, F. KISS, U. KOZIOL, O. LAMBERT, K. LIU, X. LUO, Y. LUO, N. MACCHIAROLI, S. NICHOL, J. PAPS, J. PARKINSON, N. POUCHKINA-STANTCHEVA, N. RIDDIFORD, M. ROSENZVIT, G. SALINAS, J. D. WASMUTH, M. ZAMANIAN, Y. ZHENG, X. CAI, X. SOBERÓN, P. D. OLSON, J. P. LACLETTE, K. BREHM, M. BERRIMAN, T. S. G. CONSORTIUM. 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496: 57-63.

TSIGKARI, K. K., S. F. ACEVEDO, E. M. SKOULAKIS. 2012. 14-3-3ε Is required for germ cell migration in *Drosophila*. *PLoS One* 7: e36702.

UHART, M., D. M. BUSTOS. 2014. Protein intrinsic disorder and network connectivity. The case of 14-3-3 proteins. *Front Genet* 5: 10.

VAN HELLEMOND, J. J., K. RETRA, J. F. BROUWERS, B. W. VAN BALKOM, M. YAZDANBAKHS, C. B. SHOEMAKER, A. G. TIELENS. 2006. Functions of the tegument of *schistosomes*: clues from the proteome and lipidome. *Int J Parasitol* 36: 691-699.

VIRGINIO, V. G., K. M. MONTEIRO, F. DRUMOND, M. O. DE CARVALHO, D. M. VARGAS, A. ZAHA, H. B. FERREIRA. 2012. Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Mol Biochem Parasitol* 183: 15-22.

WANG, W., D. C. SHAKES. 1996. Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *J Mol Evol* 43: 384-398.

YASMIN, L., J. VEESSEMEYER, M. DIAZ, M. FRANCIS, C. OTTMANN, R. PALMER, A. HAUSER, B. HALLBERG. 2010. Electrostatic interactions play a minor role in the binding of ExoS to 14-3-3 proteins. *Biochem J* 427: 217-224.

ZHENG, H., W. ZHANG, L. ZHANG, Z. ZHANG, J. LI, G. LU, Y. ZHU, Y. WANG, Y. HUANG, J. LIU, H. KANG, J. CHEN, L. WANG, A. CHEN, S. YU, Z. GAO, L. JIN, W. GU, Z. WANG, L. ZHAO, B. SHI, H. WEN, R. LIN, M. K. JONES, B. BREJOVA, T. VINAR, G. ZHAO, D. P.

McMANUS, Z. CHEN, Y. ZHOU, S. WANG. 2013. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. Nat Genet 45: 1168-1175.

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Aline Teichmann

Nascimento 04/06/1983 - Sobradinho/RS - Brasil

Celular (51) 97904341

Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia
Av. Bento Gonçalves, 9500
Prédio 43421 salas 204/206
Agronomia - Porto Alegre
91501-970, RS - Brasil
Telefone: 51 33086070

Endereço eletrônico e-mail para contato: alinet@cbiot.ufrgs.br
e-mail alternativo: ateichmann2@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2010** Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Caracterização das proteínas 14-3-3 expressas na fase larval patogênica de *Echinococcus* spp.
Orientador: Henrique Bulselmeyer Ferreira
Co-orientador: Karina Mariante Monteiro
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2009 - 2010** Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Expressão da proteína 14-3-3epsilon1 de *Echinococcus granulosus* em *Escherichia coli*, Ano de obtenção: 2010
Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2003 - 2007** Graduação em Farmácia.
Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, Santa Cruz Do Sul, Brasil
Título: Análise do perfil de resistência de *Escherichia coli* uropatogênica aos antibióticos e identificação do gene sul2 em isolados ambulatoriais e hospitalares
Orientador: Andréia Rosane de Moura Valim

Formação complementar

- 2013 - 2013** Monitora na disciplina Atividade Orientada I.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2011 - 2011** Monitora na disciplina Atividade Orientada I.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2010 - 2010** Imunolocalização de proteínas.
Universidad Andrés Bello, UNAB, Santiago, Chile
- 2010 - 2010** Estágio em docência em Biologia Molecular Básica.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2009 - 2009** Estágio em docência em Biologia Molecular Básica.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2009 - 2009** Estágio em docência em Biologia Molecular Básica.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2008 - 2008** Monitora na disciplina Biologia Molecular Básica.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

- 2010 - Atual** Vínculo: Estudante de doutorado, Enquadramento funcional: Estudante de doutorado, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
- 2009 - 2010** Vínculo: Estudante de mestrado, Enquadramento funcional: Estudante de mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
- 2008 - 2009** Vínculo: Estagiário, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 20, Regime: Parcial

2. Drogeria Tarumã - DT

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Responsável Técnica, Enquadramento funcional: Farmacêutica , Carga horária: 40, Regime: Integral

3. Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC

Vínculo institucional

2014 - 2014 Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento funcional: Colaboradora, Carga horária: 13, Regime: Parcial

2007 - 2007 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial

2006 - 2006 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial

2005 - 2005 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Projetos

2012 - Atual Caracterização funcional de proteínas expressas na fase larval de *Echinococcus granulosus* e de interações proteicas relevantes na interface parasito-hospedeiro durante a infecção crônica.

Integrantes: Aline Teichmann; Karina Mariante Monteiro; Daiane de Vargas; Henrique Bunselmeyer Ferreira (Responsável); Arnaldo Zaha; Karina Rodrigues Lorenzatto.

2011 - Atual Estudo de Aspectos Moleculares da Biologia de platelmintos parasitas da classe Cestoda.

Integrantes: Aline Teichmann; Karina Mariante Monteiro; Daiane de Vargas; Henrique Bunselmeyer Ferreira (Responsável); Arnaldo Zaha; Karina Rodrigues Lorenzatto.

2010 - Atual Caracterização de proteínas 14-3-3 expressas na fase larval patogênica de *Echinococcus granulosus*.

Integrantes: Aline Teichmann; Karina Mariante Monteiro; Daiane de Vargas; Henrique Bunselmeyer Ferreira (Responsável); Arnaldo Zaha; Bruna Valandro Meneghetti.

2009 - Atual Estudo de proteínas relacionadas ao estabelecimento e desenvolvimento da forma larval patogênica de *Echinococcus granulosus*.

Integrantes: Aline Teichmann; Karina Mariante Monteiro; Henrique Bunselmeyer Ferreira (Responsável); Arnaldo Zaha; Karina Rodrigues Lorenzatto; Norbel Galanti; Rodolfo Paredes.

2008 - 2011 Estudo de proteínas expressas em estágios larvais patogênicos de parasitos da classe Cestoda.

Integrantes: Aline Teichmann; Karina Mariante Monteiro; Daiane de Vargas;

Henrique Bunselmeyer Ferreira (Responsável); Arnaldo Zaha; Karina Rodrigues Lorenzatto.

Revisor de periódico

1. Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)

Vínculo

2012 - Atual Regime: Parcial

Prêmios e títulos

2007 1º Lugar no Concurso Acadêmico de Pesquisa da Farmácia, Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul

Produção

Artigos completos publicados em periódicos

1. TEICHMANN, ALINE, AGRA, HOMERO NETO DE CUNHA, NUNES, LUCIANA DE SOUZA, ROCHA, MARION PEREIRA DA, RENNER, JANE DAGMAR POLLO, POSSUELO, LIA GONÇALVES, CARNEIRO, MARCELO, RIEGER, ALEXANDRE, BENITEZ, LISIANNE BRITTES, VALIM, ANDRÉIA ROSANE DE MOURA

Antibiotic resistance and detection of the *sul2* gene in urinary isolates of *Escherichia coli* in patients from Brazil. *Journal of Infection in Developing Countries* (Online). , v.8, p.39 - 43, 2014.

Artigos aceitos para publicação

1. TEICHMANN, ALINE, VARGAS, DAIANI MACHADO, MONTEIRO, KARINA M., MENEGHETTI, BRUNA VALANDRO, DUTRA, CRISTINE SOUZA, PAREDES, RODOLFO, GALANTI, NORBEL, ZAHA, ARNALDO, FERREIRA, HENRIQUE BUNSELMAYER

Characterization of 14-3-3 isoforms expressed in the *Echinococcus granulosus* pathogenic larval stage. *Journal of Proteome Research* (Online), 2015.

2. COSTA, CAROLINE B., MONTEIRO, KARINA M., TEICHMANN, ALINE, SILVA, EDILEUZA D., LORENZATTO, KARINA R., CANCELA, MARTÍN, PAES, JÉSSICA A., BENITZ, ANDRÉ N. D., CASTILLO, ESTELA, MARGIS, ROGÉRIO, ZAHA, ARNALDO, FERREIRA, HENRIQUE BUNSELMAYER

Expression of the histone chaperone SET/TAF-I β during the strobilation process of *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes, Cestoda). *Parasitology* (Online), 2015.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. TEICHMANN, A., Monteiro, K.M., de VARGAS, D. M., MENEGHETTI, B. V., DUTRA, C. S., ZAHA, A., FERREIRA, H. B.
Characterization of 14-3-3 Epsilon Isoforms from the Parasite *Echinococcus granulosus* In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu.
Anais da XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular., 2014.
2. BARROS, G. F., Monteiro, K.M., TEICHMANN, A., ZAHA, A., FERREIRA, H. B.
Identification of Glycosylphosphatidylinositol Anchored Proteins in the Cestode Parasite *Echinococcus granulosus* In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu.
Anais da XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular., 2014.
3. TEICHMANN, A., Monteiro, K.M., de VARGAS, D. M., MENEGHETTI, B. V., DUTRA, C. S., ZAHA, A., FERREIRA, H. B.
Caracterização das proteínas 14-3-3epsilon1 e 14-3-3epsilon2 do parasito *Echinococcus granulosus* In: XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2013, Florianópolis.
Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul., 2013.
4. MENEGHETTI, B. V., TEICHMANN, A., Monteiro, K.M., de VARGAS, D. M., FERREIRA, H. B., ZAHA, A.
Analysis of the expression pattern of 14-3-3epsilon1 and 14-3-3epsilon2 proteins from *Echinococcus granulosus* In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria e XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro.
XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria e XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine., 2012.
5. de VARGAS, D. M., Monteiro, K.M., TEICHMANN, A., MENEGHETTI, B. V., ZAHA, A., FERREIRA, H. B.
Characterization of two *Echinococcus granulosus* 14-3-3 protein isoforms (Eg14-3-3zeta2 and Eg14-3-3zeta3) expressed in the parasite s pathogenic larval stage In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria e XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine, 2012
XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria e XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine., 2012.
6. TEICHMANN, A., Monteiro, K.M., de VARGAS, D. M., MENEGHETTI, B. V., FERREIRA, H. B., ZAHA, A.
Characterization of 14-3-3 epsilon isoforms from the parasite *Echinococcus granulosus* In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria e XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine, 2012, Rio de

Janeiro.

XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria e XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine., 2012.

7. de VARGAS, D. M., Monteiro, K.M., TEICHMANN, A., ZAHA, A., FERREIRA, H. B.

Caracterização funcional das proteínas 14-3-3zeta2 e 14-3-3zeta3 de *Echinococcus granulosus* In: XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2011, São Paulo.

Anais do XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia., 2011.

8. TEICHMANN, A., Monteiro, K.M., de VARGAS, D. M., MENEGHETTI, B. V., ZAHA, A., FERREIRA, H. B.

Identificação de ligantes proteicos da proteína 14-3-3epsilon1 DE *Echinococcus granulosus* In: XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2011, São Paulo.

Anais do XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2011.

9. de VARGAS, D. M., Monteiro, K.M., TEICHMANN, A., ZAHA, A., FERREIRA, H. B.

Binding Proteins from the *Echinococcus granulosus* Larval Pathogenic Stage. In: XXXIX Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu.

XXXIX Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010.

10. TEICHMANN, A., NUNES, L. S., Lia Gonçalves Possuelo, AGRA, H., RENNER, J. D. P., Rocha, M. P., Benitez, L. B., Rieger, A., Valim, A. R. M.

Análise do perfil de resistência de *Escherichia coli* uropatogênica aos antibióticos e identificação do gene sul2 em isolados ambulatoriais e hospitalares In: 1º Congresso Latino-Americano de Resistência Microbiana, 2009, SANTA CRUZ DO SUL.

Anais do 1º Congresso Latino-Americano de Resistência Microbiana, 2009.

11. TEICHMANN, A., NUNES, L. S., Assunção, L. S., AGRA, H., Lia Gonçalves Possuelo, RENNER, J. D. P., Benitez, L. B., Rieger, A., Valim, A. R. M.

Caracterização molecular de isolados uropatogênicos de *Escherichia coli* e análise de dados clínicos dos pacientes In: 1º Congresso Latino-Americano de Resistência Microbiana, 2009, SANTA CRUZ DO SUL.

Anais do 1º Congresso Latino-Americano de Resistência Microbiana., 2009.

12. TEICHMANN, A., Monteiro, K.M., de VARGAS, D. M., ZAHA, A., FERREIRA, H. B.

Characterization of an *Echinococcus granulosus* 14-3-3 epsilon isoform and identification of its interaction partners In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia.

Livros de Resumos da XXXVIII Reunião Anual da SBBq, 2009., 2009.

13. de VARGAS, D. M., Monteiro, K.M., TEICHMANN, A., ZAHA, A., FERREIRA,

H. B.

Characterization of 14-3-3zeta2 Isoform from *Echinococcus granulosus* Larval Stage In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2009, 2009, Águas de Lindóia.

Livros de Resumos da XXXVIII Reunião Anual da SBBq, 2009., 2009.

14. TEICHMANN, A., NUNES, L. S., Assunção, L. S., AGRA, H., RENNER, J. D. P., Benitez, L. B., Rocha, M. P., Rieger, A., Valim, A. R. M.

Incidência de resistência aos antibióticos apresentada por *Escherichia coli* uropatogênica e identificação do gene *sul2* em isolados ambulatoriais e hospitalares In: XVIII Congresso Mundial de Epidemiologia/ VII Congresso Brasileiro de Epidemiologia, 2008, Porto Alegre.

Anais do XVIII Congresso Mundial de Epidemiologia., 2008.

15. TEICHMANN, A., KAUFFMANN, C, ROCHA, G. A., MORSCH, L. M., MACHADO, E. O., Valim, A. R. M., TODENDI, P. F.

Atenção farmacêutica a paciente hipertenso usuário da Farmácia Escola da UNISC. In: XIII Seminário de Iniciação Científica XII Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão, 2007, Santa Cruz do Sul.

Seminário de Iniciação Científica XII Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão., 2007.

16. TEICHMANN, A., Assunção, L. S., AGRA, H., RENNER, J. D. P., Rocha, M. P., Benitez, L. B., Rieger, A., Valim, A. R. M.

Avaliação do perfil de suscetibilidade, genotipagem dos isolados de *Escherichia coli* e análise dos dados clínicos de pacientes com infecção do trato urinário In: XIII Seminário de Iniciação Científica e XII Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da UNISC, 2007, Santa Cruz do Sul.

Anais do XIII Seminário de Iniciação Científica e XII Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da UNISC., 2007.

17. Assunção, L. S., TEICHMANN, A., Rieger, A., RENNER, J. D. P., Benitez, L. B., Rocha, M. P., Valim, A. R. M., AGRA, H.

Diferenciação intra-espécie de isolados de *Escherichia coli* provindos de pacientes ambulatoriais e hospitalizados In: XIII Seminário de Iniciação Científica e XII Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da UNISC, 2007, Santa Cruz do Sul.

Anais do XIII Seminário de Iniciação Científica e XII Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da UNISC., 2007.

18. Valim, A. R. M., TEICHMANN, A., Lia Gonçalves Possuelo, AGRA, H., NUNES, L. S., Assunção, L. S., Schuch, B. N., Schwalbert, A. M., Goes, J. T., Lima, A. D., Rieger, A., Benitez, L. B., Rocha, M. P.

Genotipagem e caracterização do perfil de suscetibilidade de isolados uropatogênicos de *Escherichia coli* In: XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.

Anais do o XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2007.

19. Valim, A. R. M., TEICHMANN, A., Assunção, L. S., Schuch, B. N., Schwalbert, A. M., Goes, J. T., Lima, A. D., AGRA, H., RENNER, J. D. P., Rocha, M. P., Benitez, L. B., Rieger, A.

Relação clonal de isolados de *Escherichia coli* resistentes a múltiplos fármacos causadores de infecção do trato urinário In: II Congresso Brasileiro sobre o uso racional de medicamentos, 2007, Florianópolis.

Anais do II Congresso Brasileiro sobre o uso racional de medicamentos. 2007.

20. TEICHMANN, A., AGRA, H., Rieger, A., RENNER, J. D. P., Benitez, L. B., NUNES, L. S., Rocha, M. P., Valim, A. R. M.

Análise de dados epidemiológicos dos pacientes portadores de ITU e genotipagem de isolados uropatogênicos de *Escherichia coli* In: XII SEMINARIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E XI JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2006, SANTA CRUZ DO SUL.

CD do evento., 2006.

21. TEICHMANN, A., Benitez, L. B., Rieger, A., RENNER, J. D. P., Rocha, M. P., AGRA, H., Valim, A. R. M.

Análise do perfil de resistência e genotipagem de isolados uropatogênicos de *Escherichia coli* In: X SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, I SIMPÓSIO DE TERAPIA CELULAR E II FÓRUM DE BIOÉTICA. INSTITUTO DE CARDIOLOGIA, 2006, PORTO ALEGRE.

Anais do X SIC., 2006.

22. TEICHMANN, A., NUNES, L. S., AGRA, H., RENNER, J. D. P., Rocha, M. P., Benitez, L. B., Rieger, A., Valim, A. R. M.

Genotipagem de isolados uropatogênicos de *Escherichia coli* e análise de dados epidemiológicos dos pacientes In: XVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XV FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, I SALÃO UFRGS JOVEM, 2006, Porto Alegre.

Livro de Resumos do XVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XV FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, I SALÃO UFRGS JOVEM., 2006.

23. TEICHMANN, A., Rocha, M. P., RENNER, J. D. P., AGRA, H., Valim, A. R. M. Caracterização de isolados de *Escherichia coli* uropatogênicos obtidos de pacientes ambulatoriais e hospitalizados In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005, SANTOS.

ANAIS DO XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA., 2005.

24. TEICHMANN, A., Valim, A. R. M.

Padronização de Metodologia para Extração e Amplificação de DNA de *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC) In: XI Seminário de Iniciação Científica e X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2005, Santa Cruz do Sul.

CD., 2005.

Apresentação de trabalho e palestra

1. TEICHMANN, A.

Caracterização funcional das proteínas 14-3-3 de *Echinococcus granulosus*, 2011. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

2. TEICHMANN, A., Rocha, M. P., Valim, A. R. M., Rieger, A.
Caracterização do perfil de resistência aos antibióticos de isolados uropatogênicos de *Escherichia coli* e identificação do gene *sul2*, 2007. (Outra,Apresentação de Trabalho)

3. AGRA, H., RENNER, J. D. P., Benitez, L. B., Rieger, A., Valim, A. R. M., TEICHMANN, A.
Comparação entre a relação clonal de isolados de *Escherichia coli*, avaliação do perfil de suscetibilidade e análise dos dados clínicos de pacientes com infecção do trato urinário, 2007. (Comunicação,Apresentação de Trabalho)

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. (Congresso)
Characterization of 14-3-3 Epsilon Isoforms from the Parasite *Echinococcus granulosus*.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2013. (Congresso)
CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS 14-3-3epsilon1 E 14-3-3epsilon2 DO PARASITO *Echinococcus granulosus*.

3. Conferencista no(a) X Semana Acadêmica do Curso de Farmácia, 2013. (Outra)
O mercado de trabalho farmacêutico sob o olhar do egresso da UNISC.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria e XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine, 2012. (Congresso)
Characterization of 14-3-3 epsilon isoforms from the parasite *Echinococcus granulosus*.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2011. (Congresso)
Identificação de ligantes proteicos da proteína 14-3-3epsilon1 de *Echinococcus granulosus*.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) 1º Congresso Latino-Americano de Resistência Microbiana, 2009. (Congresso)
Análise do perfil de resistência de *Escherichia coli* uropatogênica aos antibióticos e identificação do gene *sul2* em isolados ambulatoriais e hospitalares.

7. Apresentação de Poster / Painel no(a) XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009. (Outra)

Characterization of an *Echinococcus granulosus* 14-3-3 epsilon isoform and identification of its interaction partners.

8. XXIII International Congress of Hydatidology. Workshop on advances in the biology and biochemistry of *Echinococcus* infections. 2009. (Congresso)

9. Apresentação de Poster / Painel no(a) XVIII Congresso Mundial de Epidemiologia/ VII Congresso Brasileiro de Epidemiologia, 2008. (Congresso)
Incidência de resistência aos antibióticos apresentada por *Escherichia coli* uropatogênica e identificação do gene sul2 em isolados ambulatoriais e hospitalares.

10. Apresentação de Poster / Painel no(a) VII Semana Acadêmica do Curso de Farmácia da Unisc, 2007. (Outra)
Caracterização do perfil de resistência aos antibióticos de isolados uropatogênicos de *Escherichia coli* e identificação do gene sul2.

11. III Aula Inaugural dos cursos da área da saúde, 2007. (Outra)

12. Doença Renal Crônica: Realidade e Desafios, 2007. (Encontro)

13. A nova realidade do mercado Farmacêutico, 2007. (Outra)

14. VI SEMANA ACADÊMICA DO CURSO DE FARMÁCIA, 2006. (Outra)

15. INJETÁVEIS NA PRÁTICA, 2006. (Outra)

16. Tendências do Mercado Farmacêutico, 2006. (Outra)

17. Primeiros Socorros, 2006. (Outra)

18. Apresentação de Poster / Painel no(a) XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005. (Congresso)
Caracterização de isolados de *Escherichia coli* uropatogênicos obtidos de pacientes ambulatoriais e hospitalizados.

19. Oficina de Elaboração de Projetos de Pesquisa e de Extensão, 2005. (Oficina)

20. ANTIHISTAMÍNICOS E ANTIINFLAMATÓRIOS, 2005. (Outra)

21. V SEMANA ACADÊMICA DO CURSO DE FARMÁCIA, 2005. (Outra)

22. Cianobactérias Tóxicas: Qualidade da água e saúde pública, 2005. (Outra)

23. III SEMANA ACADÊMICA DO CURSO DE FARMÁCIA, 2004. (Outra)

Organização de evento

1. FERREIRA, H. B., TEICHMANN, A.

Genômica Funcional de Platelminos Parasitas, 2013.

2. FERREIRA, H. B., TEICHMANN, A.

Curso Teórico prático do CBAB sobre Genômica Funcional de Microrganismos Patogênicos, 2009.

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. Valim, A. R. M., Lia Gonçalves Possuelo, TEICHMANN, A.

Participação em banca de Aline Predebon. Suscetibilidade genética associada à obesidade em escolares de Santa Cruz do Sul - RS, 2012.

(Farmácia) Universidade de Santa Cruz do Sul.