

# Clonagem e expressão heteróloga da MK2 do parasito cestódeo *Mesocestoides corti* (Cyclophyllidea, Mesocestoididae)

Bárbara Machado Marques & Henrique Bunselmeyer Ferreira (orientador)\*

Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional e Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
\* Este trabalho também teve a colaboração da estudante de doutorado Tatiana Bazika.



## INTRODUÇÃO

Platelmintos da classe Cestoda (cestódeos) são agentes etiológicos de parasitoses importantes (cestodíases), causando doenças como a equinococose e a cisticercose. Assim, o estudo de aspectos básicos da biologia destes parasitos é importante para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle de cestodíases. Uma espécie-modelo para o estudo da classe Cestoda é o *Mesocestoides corti*, especialmente para caracterização do processo de diferenciação da larva (tetratrídeo) no verme adulto, chamado de estrobilização. Proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs, de *mitogen-activated protein kinases*) são serino/treonino-proteína-quinases que estão entre os componentes de algumas das principais e mais conservadas rotas de transdução de sinais, regulando muitos processos fisiológicos. Estudos transcritômicos preliminares realizados em *M. corti* (Bizarro *et al.*, 2005) evidenciaram a expressão diferencial entre os estágios larval (de tetratrídeo) e adulto (verme proglotizado e segmentado) de uma proteína ortóloga a proteína-quinase 2 ativada por MAPK (MK2, de *MAPK-activated protein kinase 2*) de vertebrados, que faz parte de rotas de sinalização mediadas por MAPKs. Isso sugeriu o envolvimento da MK2 de *M. corti* (McMK2) na regulação do processo de estrobilização deste parasito.

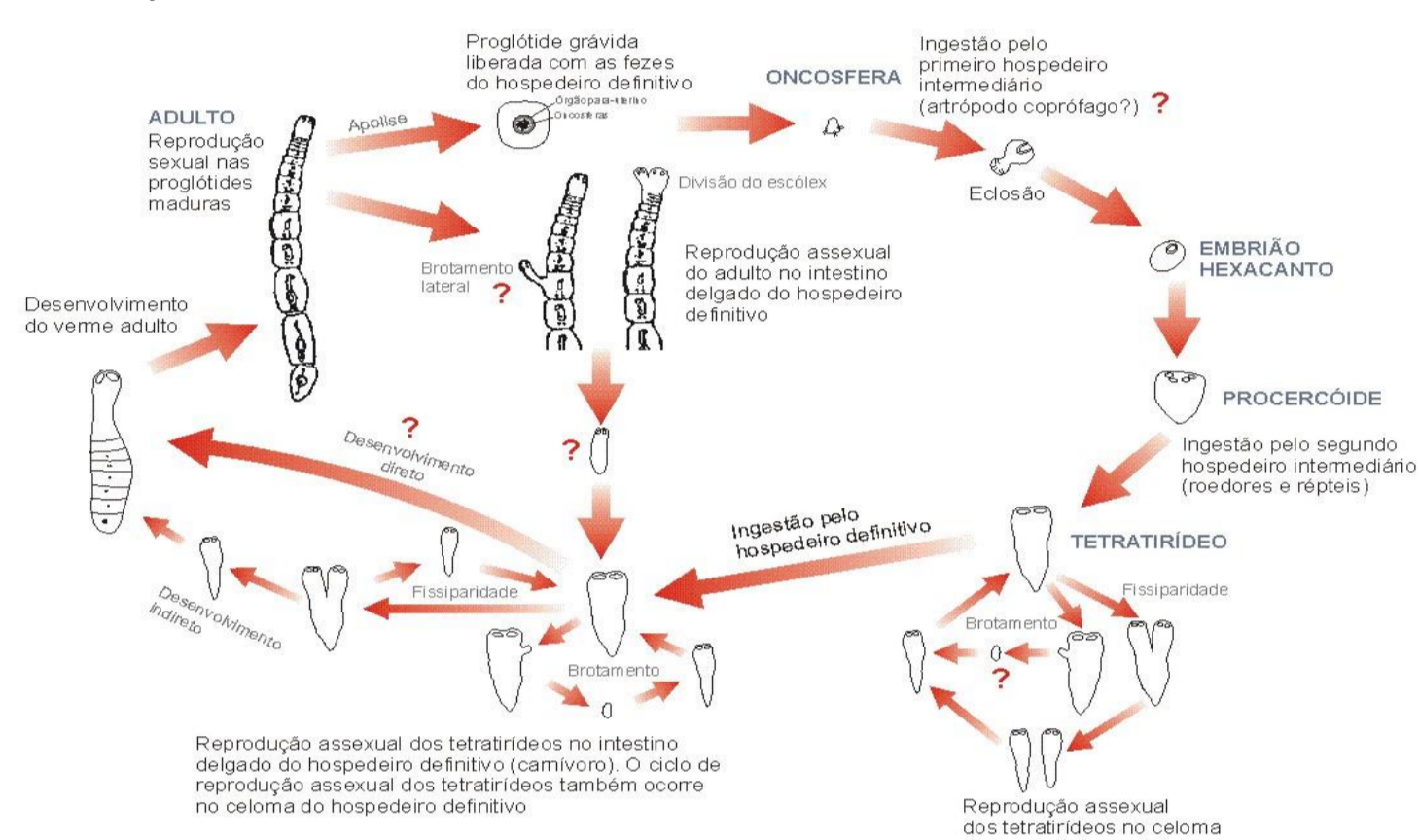


Figura 1: Representação do provável ciclo de vida de *M. corti*

## OBJETIVO

O objetivo de este trabalho é a realização da clonagem e expressão heteróloga da McMK2, visando disponibilizar a enzima em maiores quantidades e em forma pura para a futura investigação do seu padrão de expressão e do seu papel funcional na estrobilização de *M. corti*. Com isso, espera-se fornecer subsídios para uma melhor compreensão da biologia do desenvolvimento de cestódeos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Amplificação e clonagem da sequência codificadora da McMK2

RNA total da fase larval de *M. corti* foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) e posteriormente tratado com DNase I. A partir do RNA obtido, foi realizada a reação de transcrição reversa com a enzima transcriptase reversa Revert Aid (Thermo) para a síntese de cDNA. Iniciadores específicos para a McMK2, projetados com base na sequência do gene correspondente, foram utilizados para a amplificação da sua sequência codificadora. Em uma segunda etapa de amplificação, foram acrescentadas às extremidades do amplicon inicial sequências de 50 pb homólogas à região de clonagem do vetor plasmidial de expressão pGEX-4T-TEV (Costa *et al.*, 2015).

Este segundo amplicon foi então clonado no vetor por recombinação homóloga *in vivo* (Parrish *et al.*, 2004) em células de *Escherichia coli* KC8. As colônias transformantes contendo o plasmídeo recombinante pGEX-McMK2 foram selecionadas por PCR. Para a expressão da proteína recombinante a partir do plasmídeo pGEX-McMK2 foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21-CodonPlus-RP (Agilent Technologies)

### 2. Expressão heteróloga de McMK2

Células de *E. coli* BL21-CodonPlus-RP foram transformadas com o plasmídeo pGEX-McMK2. As células transformadas foram submetidas a testes de indução da expressão da proteína recombinante, testando-se as concentrações de 0,1 mM, 0,25mM e 0,5 mM do indutor isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 37°C por 14-16 h. Foram também avaliados diferentes tempos de indução (3, 5 e 16 h) e diferentes temperaturas de incubação (18 e 25°C) durante o período de indução. Os níveis de expressão e a solubilidade da McMK2 recombinante produzida foram avaliados em cada condição testada por eletroforese em géis de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

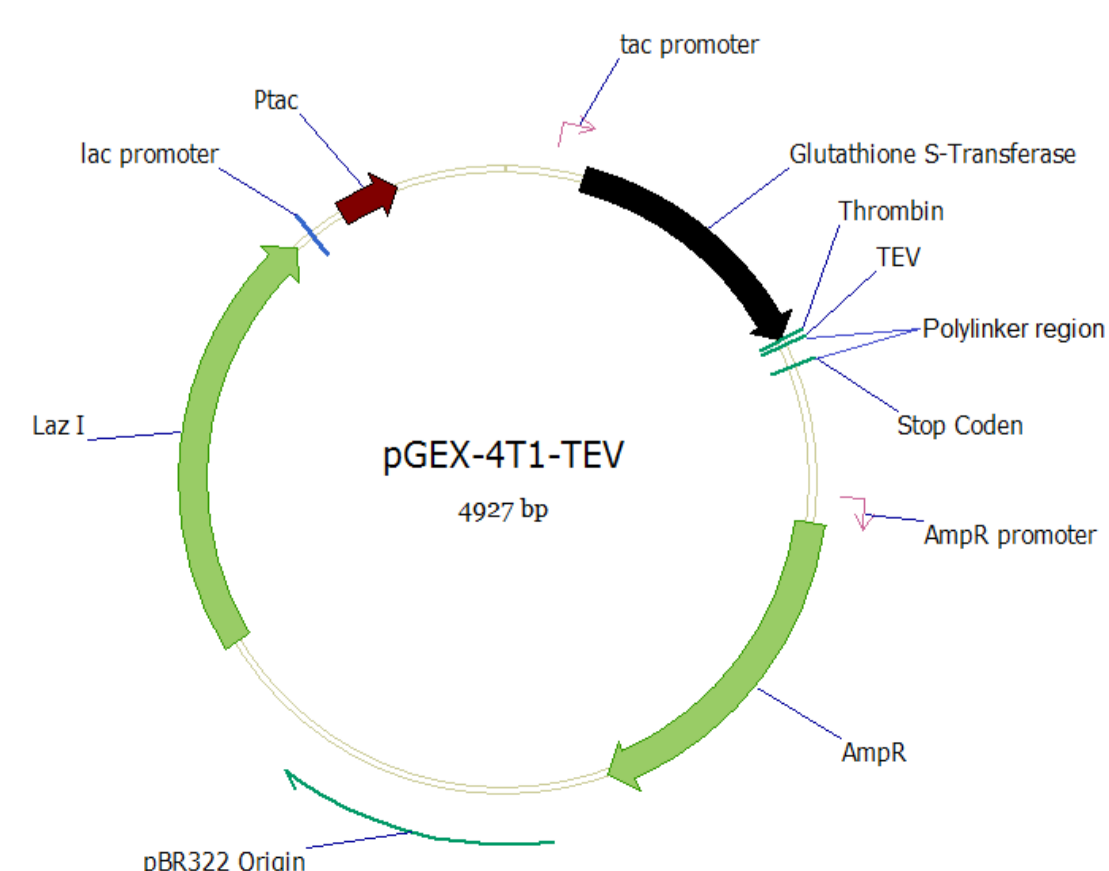


Figura 2: Mapa do vetor pGEX-4T1-TEV. Este vetor é derivado do vetor pGEX-4T1, porém foi modificado para incluir a sequência codificadora do sítio de clivagem da protease do vírus do mosaico do tabaco (TEV) (figura cedida por Filipe Dutra).

## RESULTADOS

### Clonagem Molecular de McMK2

A partir da análise por PCR das colônias de *E. coli* KC8 transformantes, foram identificadas duas colônias portadoras da construção recombinante de interesse (pGEX-McMK2) (Figura 3)

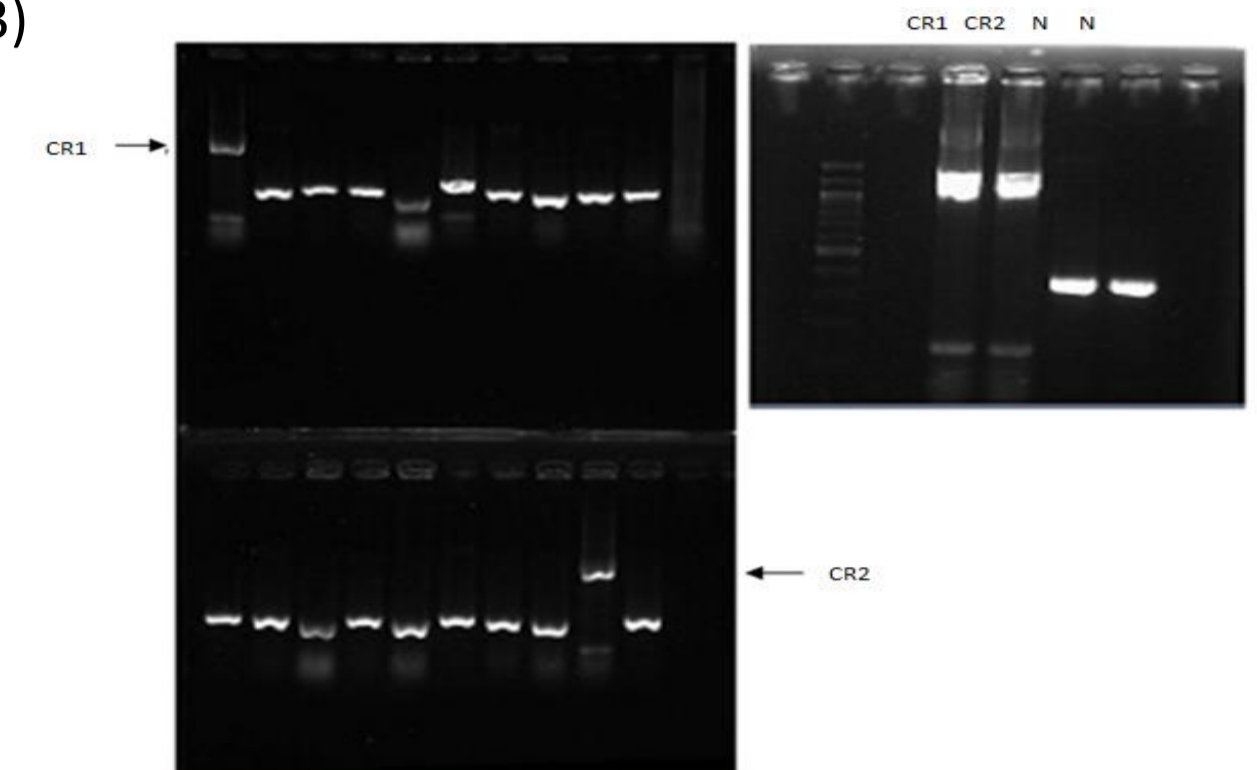


Figura 3: Análise dos produtos da PCR das colônias transformadas, feita por eletroforese em gel de agarose 1%. Em (CR1) colônia recombinante 1, (CR2) colônia recombinante 2 e (N) controle negativo da PCR.

### Análise inicial da expressão e da solubilidade da McMK2 recombinante

A análise por SDS-PAGE da expressão da McMK2 recombinante em diferentes condições de indução mostrou que as três concentrações de IPTG testadas tiveram efeitos similares (Figura 4). O tempo de indução em que se obteve maior expressão de McMK2 foi o de 16 h (Figura 5) e a temperatura na qual a McMK2 foi produzida com maior solubilidade foi a de 18°C (Figura 6).

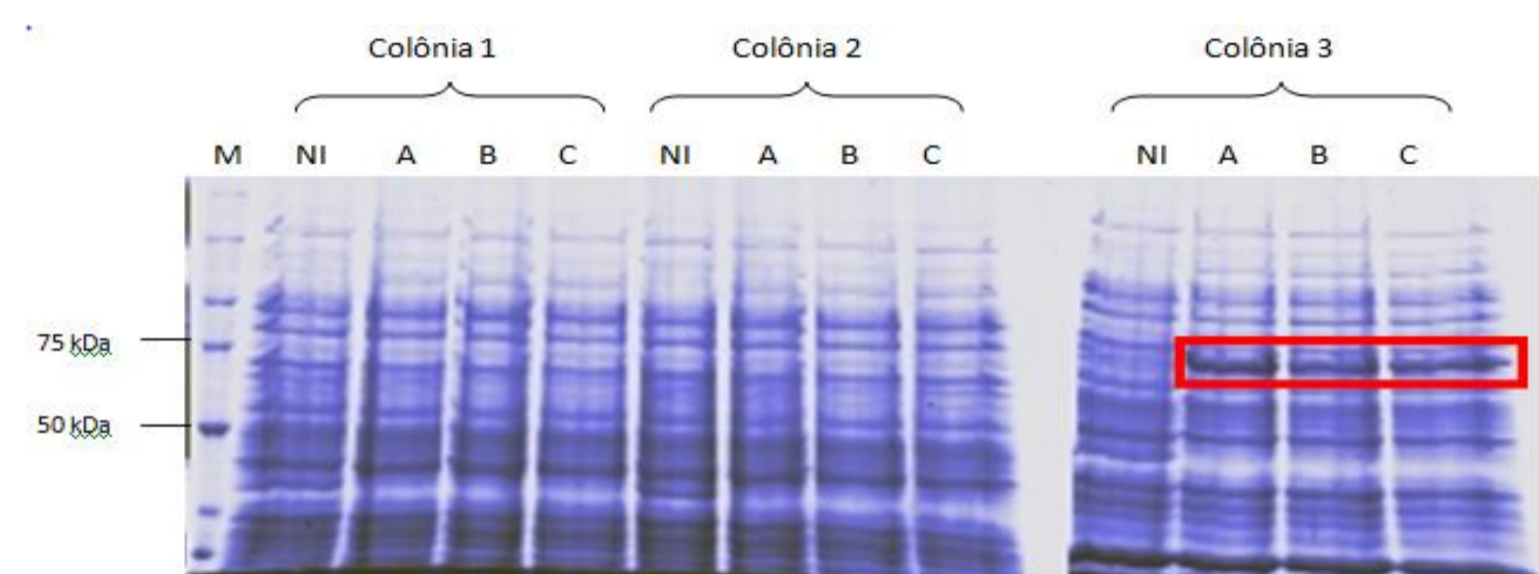


Figura 4: Avaliação por SDS-PAGE 10% da expressão da McMK2 recombinante a partir de *E. coli* BL21 sob indução com diferentes concentrações de IPTG por 16 h. (M) Marcador de massa molecular (kDa); (NI) cultivo não induzido, (A) cultivo induzido com 0,1 mM IPTG; (B) cultivo induzido com 0,25 mM IPTG; (C) cultivo com 0,5 mM IPTG, para cada colônia. A banda em destaque corresponde à McMK2 recombinante.

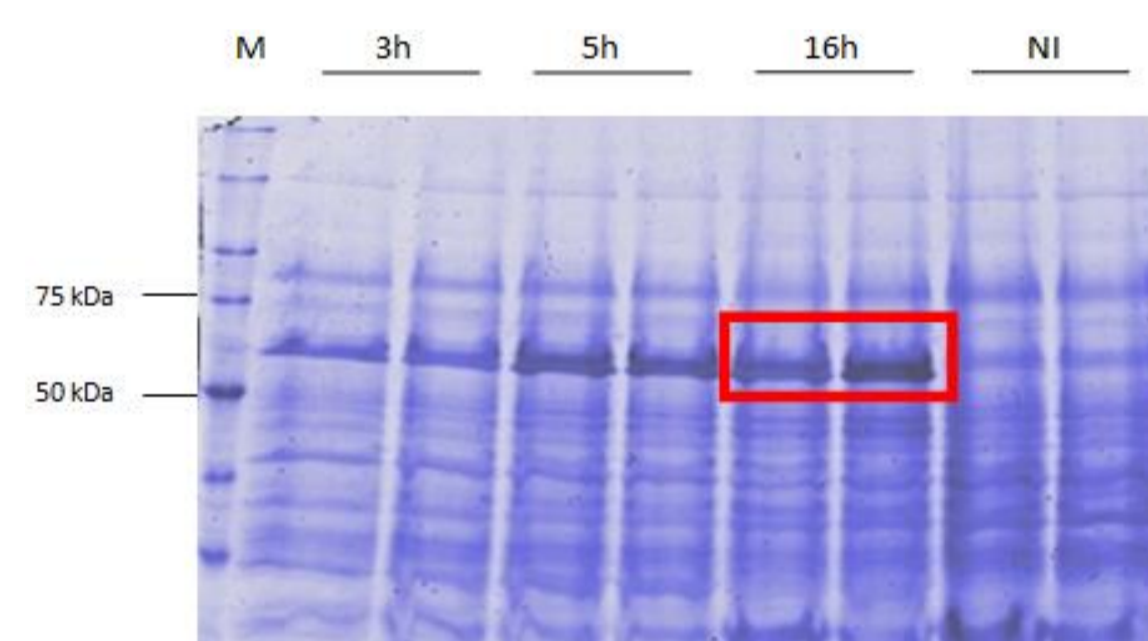


Figura 5: Avaliação por SDS-PAGE 10% da expressão da McMK2 recombinante a partir de *E. coli* BL21 sob indução em diferentes tempos. (M) Marcador de massa molecular (kDa); (NI) cultivo não induzido. A banda em destaque corresponde à McMK2 recombinante.

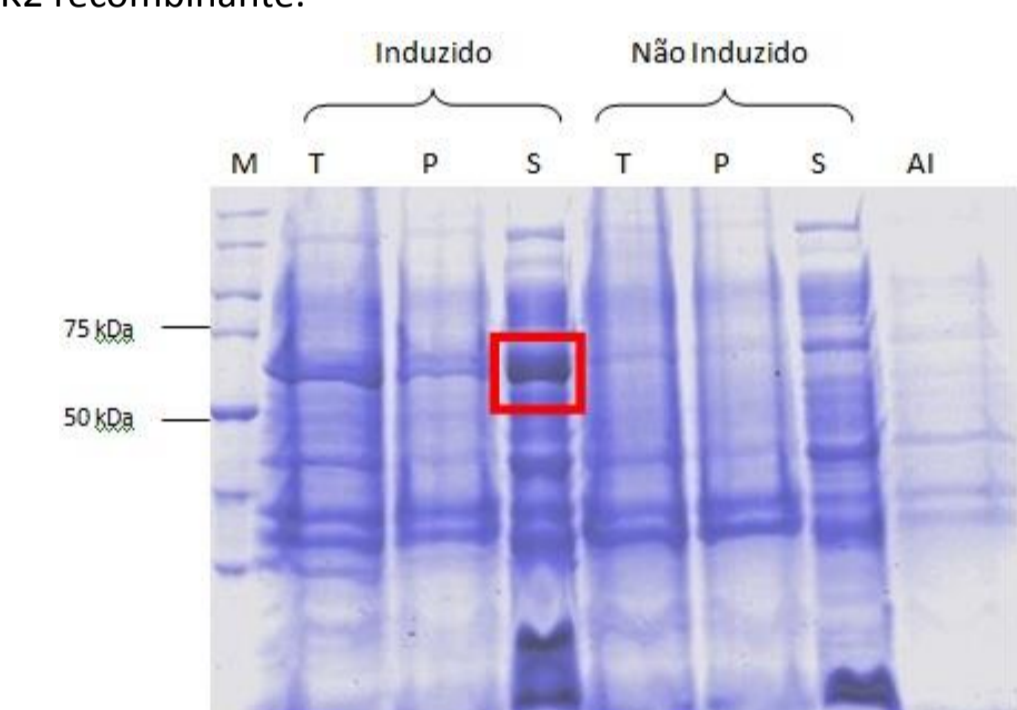


Figura 6: Avaliação por SDS-PAGE 10% da expressão da McMK2 recombinante, a partir de *E. coli* BL21, na temperatura de indução de 18°C. (M) Marcador de massa molecular (kDa); (T) extrato total; (S) sobrenadante; (P) pellet; (AI) extrato anterior à indução. A banda em destaque corresponde à McMK2 recombinante.

## PERSPECTIVAS

1. A partir do clone obtido e das condições de cultivo e indução padronizadas, a McMK2 recombinante será produzida em maior escala (da ordem de miligramas) e purificada.
2. A McMK2 recombinante purificada será inicialmente utilizada na imunização de coelhos, para a produção de anticorpos policlonais específicos contra a proteína nativa.
3. Os anticorpos anti-McMK2 serão posteriormente utilizados em experimentos de imunolocalização, para avaliação dos padrões de expressão espaciais e temporais da McMK2 em diferentes estágios do desenvolvimento estrobilar de *M. corti*.
4. Os níveis transcricionais de expressão do gene *McMK2*, codificador da McMK2, serão também avaliados ao longo do desenvolvimento estrobilar por PCR em tempo real quantitativo (qPCR).

## REFERÊNCIAS

- Bizarro, C.V., Bengtson, M.H., Ricachenevsky, F.K., Zaha, A., Sogayar, M.C., and Ferreira, H.B. (2005). Differentially expressed sequences from a cestode parasite reveals conserved developmental genes in platyhelminthes. *Mol Biochem Parasitol* 144, 114-118.
- Costa CB, Monteiro KM, Teichmann A, da Silva ED, Lorenzatto KR, Cancela M, Paes JA, Benitz Ade N, Castillo E, Margis R, Zaha A, Ferreira HB (2015) Expression of the histone chaperone SET/TAF-β during the strobilation process of *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes, Cestoda). *Parasitology* 142, 1171-1182.
- Parrish, J.R., Limjindaporn, T., Hines, J.A., Liu, J., Liu, G., and Finley, R.L. (2004). High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by *in vivo* recombination in *Escherichia coli*. *J Proteome Res* 3, 582-586.

Apoio:

