

Análise da expressão da proteína MK2 ao longo do processo de estrobilização de *Mesocestoides corti*

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 Basika.



paz no plural

INTRODUÇÃO

Proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs, de *mitogen-activated protein kinases*) são serino/treonino-proteínas-quinases que realizam a conversão de estímulos extracelulares em uma variedade de respostas celulares. MAPKs estão entre os componentes de algumas das principais e mais conservadas rotas de transdução de sinais que regulam muitos processos fisiológicos, incluindo a progressão do ciclo celular, a migração celular, a organização do citoesqueleto e o remodelamento da cromatina. Estudos moleculares envolvendo platelmintos da classe Cestoda têm demonstrado que as MAPKs possuem um papel fundamental no desenvolvimento destes organismos. Análises transcritômicas preliminares realizadas pelo nosso grupo (Bizarro *et al.*, 2005), evidenciaram a expressão diferencial do gene que codifica uma proteína da família das MAPKs chamada MAPK-proteína-quinase ativada (MK2) entre os estágios larval e adulto do cestódeo *Mesocestoides corti*, sugerindo seu possível envolvimento na regulação do desenvolvimento deste parasito. *M. corti* é uma espécie-modelo para o estudo da classe Cestoda, utilizado inclusive para a investigação do processo de diferenciação da larva (tetratirídeo) no verme adulto, chamado de estrobilização (Figura 1). Platelmintos cestódeos são agentes etiológicos de parasitoses importantes (cestodíases), tanto em seres humanos como em animais, causando doenças como a hidatidose 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.

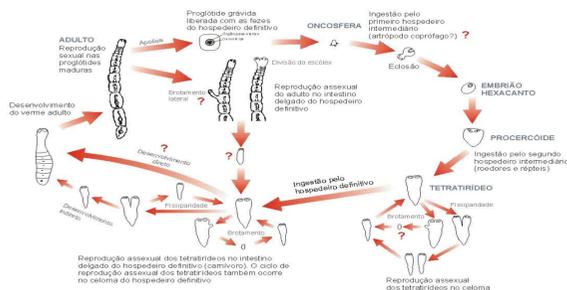


Figura 1: Representação do provável ciclo de vida de *M. corti*.

OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi a investigação do padrão de expressão espacial e temporal do gene *McMK2* e dos produtos codificados por ele, a fim de elucidar outros processos moleculares envolvidos com a estrobilização de *M. corti*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Análise do padrão de expressão temporal do gene *McMK2*

Para a análise do padrão de expressão temporal da *McMK2* ao longo da estrobilização, foram realizados experimentos de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Os níveis de expressão de *McMK2* foram avaliados em quatro estágios de desenvolvimento estrobilar de *M. corti*. O gene da proteína de ligação a poli-A (*PABP*, do inglês *poly A binding protein*) foi utilizado como controle endógeno. Esta reação foi realizada em duplicatas biológicas e triplicatas técnicas. Em uma análise adicional, o gene *McSET/TAF* de *M. corti* (Costa *et al.*, 2015) foi utilizado como marcador de desenvolvimento estrobilar. Nesta nova análise, foram utilizadas triplicatas técnicas.

2. Expressão e purificação da *McMK2* recombinante

Para a expressão da *McMK2* (*rMcMK2*) recombinante, células de *Escherichia coli* BL21-CodonPlus-RP foram transformadas com o plasmídeo pGEX-4T1-TEV (Figura 2) contendo a sequência codificadora do gene *McMK2*. Após a otimização das condições de expressão, a proteína foi produzida em maior escala, tendo sua expressão induzida a 18°C, durante 16h, pelo indutor isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração de 0,1mM. A purificação da *rMcMK2* foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando a resina de Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare). Para a recuperação das proteínas recombinantes livres de GST, as proteínas de fusão foram clivadas com a protease do *tabacco etch virus* (TEV).

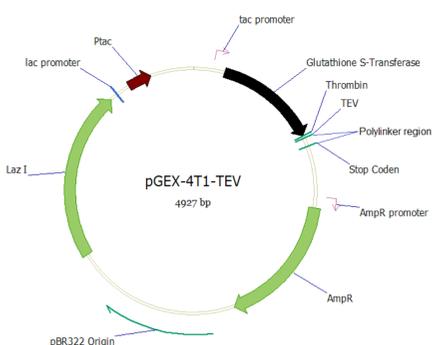


Figura 2: Mapa do vetor pGEX-4T1-TEV.

RESULTADOS

Análise do padrão de expressão temporal do gene *McMK2*

A análise inicial da expressão do gene *McMK2* (Figura 3), realizada por RT-qPCR, mostrou uma expressão significativamente aumentada deste gene na fase larval (tetratirídeo), em relação ao verme adulto estrobilado. Em uma segunda análise, o padrão de expressão de *McMK2* seguiu o observado anteriormente (Figura 4). O gene *McSET/TAF*, que foi incluído nesta análise como marcador de desenvolvimento de *M. corti*, seguiu o padrão descrito por Costa *et al.*, 2015, validando os dados obtidos para o gene *McMK2*.

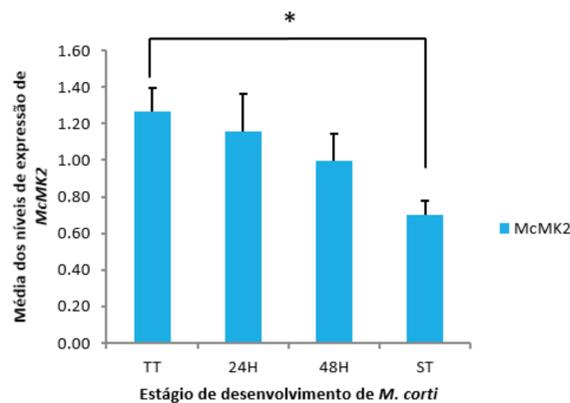


Figura 3: Níveis de expressão de *McMK2*. O nível de expressão de *McMK2* foi normalizado em relação ao nível de expressão do gene *PABP*. Dados que diferem com significância de 5% pelo teste T foram indicados com letras diferentes. As barras indicam desvio-padrão.

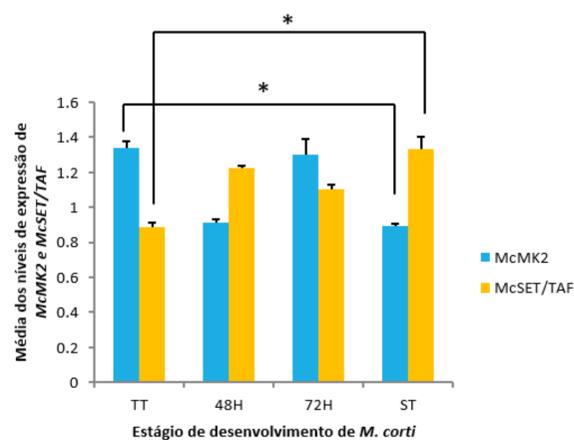


Figura 4: Níveis de expressão de *McMK2* e *McSET/TAF*. Os níveis de expressão de *McMK2* e *McSET/TAF* foram normalizados em relação ao nível de expressão do gene *PABP*. Dados que diferem com significância de 5% pelo teste T foram indicados com letras diferentes. As barras indicam desvio-padrão.

Expressão e purificação da *McMK2* recombinante

Após a padronização das condições de cultivo, células de *E. coli* BL21-CodonPlus-RP transformadas com o plasmídeo pGEX-*McMK2* foram cultivadas, para indução da expressão de *rMcMK2*-GST em maior escala. A análise das frações eluídas feita por SDS-PAGE, mostra que houve eluição parcial da *rMcMK2* após a clivagem com TEV (Figura 5 – E1-3). Entretanto, grande parte da *rMcMK2* produzida permaneceu retida na resina, sugerindo uma possível ligação de caráter inespecífico da *rMcMK2* com a resina (Figura 5 - Ma).

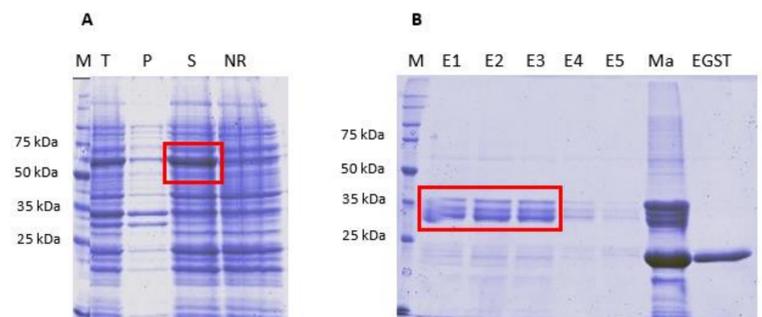


Figura 5: Avaliação da expressão e purificação da *McMK2* recombinante, em SDS-PAGE 12%. (M) Marcador de massa molecular (kDa). A: (T) extrato total; (P) pellet; (S) sobrenadante; (NR) fração não retida. A banda em destaque corresponde à *rMcMK2*-GST. B: (E1-5) eluído após clivagem com TEV; (Ma) matriz após clivagem com TEV; (EGST) eluição de GST. A banda em destaque corresponde à *rMcMK2*.

PERSPECTIVAS

1. A *McMK2* recombinante purificada será inicialmente utilizada na imunização de coelhos, para a produção de anticorpos policlonais específicos contra a proteína nativa.
2. 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*.
3. Experimentos de RNA de interferência também serão realizados, para avaliação de modificações no fenótipo de *M. corti* devido à perda de função do gene *McMK2*, e assim possivelmente inferir uma provável função para este gene.

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.