

Estudo da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Echinococcus granulosus*

Helier Balbinotti*, Karina R. Lorenzatto, Karina M. Monteiro, Henrique B. Ferreira, Arnaldo Zaha



Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos & Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, CBIOT, UFRGS, RS, Brasil.

*e-mail:helierbalbinotti@gmail.com



Introdução

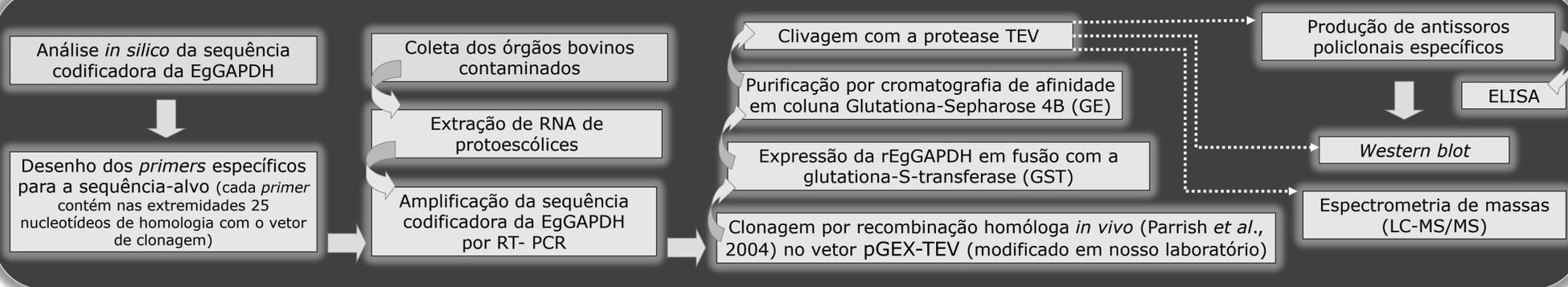
Echinococcus granulosus é um endoparasito que causa a hidatidose cística, doença caracterizada pela formação do cisto hidático (fase larval) em órgãos do hospedeiro intermediário (ungulados domésticos e seres humanos). A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) tem sido descrita como uma proteína multifuncional, desempenhando diversas funções não-glicolíticas. A GAPDH tem sido encontrada na superfície celular de vários organismos parasitas, o que sugere que ela poderia estar envolvida na interação parasito-hospedeiro (Braschi *et al.*, 2006; Pérez-Sánchez *et al.*, 2008).

Pouco se sabe sobre os mecanismos de interação da fase larval do parasito *Echinococcus granulosus* com os hospedeiros intermediários. Neste contexto, com o intuito de caracterizar o papel da EgGAPDH, a sequência codificadora desta proteína foi clonada e a produção da proteína recombinante foi padronizada.

Objetivo

Expressão, purificação da proteína recombinante GAPDH de *E. granulosus* (rEgGAPDH) e produção de antissoro policlonal contra a rEgGAPDH, para caracterização funcional da EgGAPDH.

Metodologia



Resultados e Discussão

Análise in silico

A região codificadora da EgGAPDH é formada por **3 éxons** e contém **1008 pb**, produzindo uma proteína de **336 aminoácidos** (predição da massa molecular: \approx 36 kDa; pI: 8,44)

Expressão da rEgGAPDH

A expressão da rEgGAPDH foi realizada em células de *E. coli* BL21 (DE3) pLYSE na condição de cultivo por 5h a 20°C.

Purificação da rEgGAPDH

Durante a purificação da rEgGAPDH (Figura 1) foi evidenciada a ocorrência de dois produtos proteicos não esperados. Um desses produtos foi identificado por western blot como sendo a proteína GST, logo um produto de proteína truncada (Figura 2). O outro produto possivelmente é o resultado de alguma degradação proteica, que pode ter ocorrido durante a etapa de purificação.

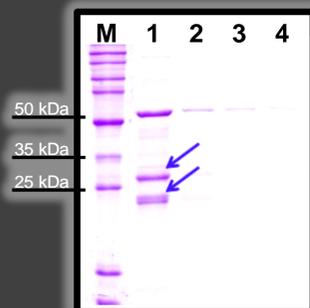


Figura 1: Purificação da rEgGAPDH em fusão com a GST (SDS-PAGE 12% corado com coomassie blue). (1-4) Eluições da proteína de fusão; (M) Marcador de massa molecular. As setas indicam os produtos proteicos não esperados na purificação.

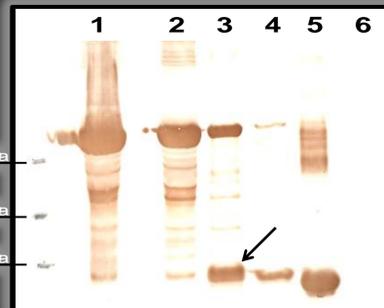


Figura 2: Western blot das etapas de expressão e purificação da rEgGAPDH. (1) Expressão proteica; (2) Fração solúvel; (3) Eluição da proteína de fusão; (4) Clivagem; (5) Proteína GST, controle positivo; (6) Proteína recombinante B4-GFP, controle negativo. A seta indica o produto de proteína truncada.

Para evitar a provável degradação proteica e aumentar o rendimento da purificação, foi repetida a etapa de purificação da proteína com a adição de um inibidor de protease (PMSF). Contudo não foi possível evitar tal degradação (Figura 3).

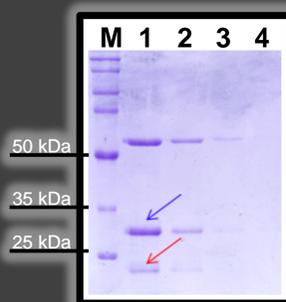


Figura 3: Purificação da rEgGAPDH com o inibidor de protease, PMSF (SDS-PAGE 12% corado com coomassie blue). (1-4) Eluições; (M) Marcador de massa molecular. As setas indicam os produtos proteicos não esperados na purificação. A seta em vermelho indica o produto truncado e a seta em azul indica um produto originado de uma possível degradação proteica.

A expressão da rEgGAPDH também foi realizada em células de *E. coli* BL21 (DE3) RIL nas mesmas condições de cultivo com o intuito de verificar se o mesmo padrão proteico era mantido. Neste caso, a purificação foi feita utilizando Triton 1%. Como se nota na Figura 4, os mesmos produtos proteicos são obtidos.

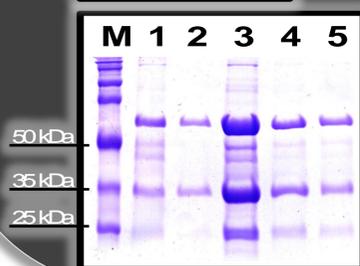
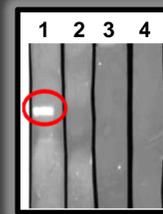


Figura 4: Purificação da rEgGAPDH expressa em células de *E. coli* BL21 (DE3) RIL (SDS-PAGE 12% corado com coomassie blue). (1-5) Eluições; (M) Marcador de massa molecular.

Deteção da proteína EgGAPDH em extratos proteicos do parasito

A produção de anticorpos policlonais contra a rEgGAPDH foi monitorada através de experimentos de ELISA. Mesmo imunizando o animal por cinco vezes, a titulação do antissoro obtido foi baixa (dados não mostrados). Embora o antissoro obtido foi capaz de reconhecer a rEgGAPDH (Figura 5), a detecção da proteína cognata em extratos proteicos do parasito não foi possível.

Figura 5: Western blot em extratos de protoescolices utilizando o anti-rEgGAPDH (1) rEgGAPDH; (2) Proteína recombinante GAPDH de *Metarhizium anisopliae* controle de reatividade cruzada; (3) Extrato proteico de protoescolices; (4) Proteína GST, como controle negativo. A elipse em vermelho indica que o antissoro identificou apenas a proteína recombinante.



O fato da proteína EgGAPDH não ser detectada no extrato proteico de protoescolices não era esperado, porque a GAPDH já foi identificada como sendo expressa em protoescolices em um estudo proteômico realizado pelo nosso grupo (Monteiro *et al.*, 2010).

Com o intuito de entender melhor os resultados obtidos, assim como para identificar os peptídeos da rEgGAPDH, análises por espectrometria de massas foram realizadas.

Análise da rEgGAPDH por espectrometria de massas

Os peptídeos da GAPDH de *E. granulosus* foram identificados, contudo também foram identificados peptídeos da GAPDH de *E. coli*.

Esses resultados indicam que a proteína-alvo recombinante interagiu com a proteína GAPDH da bactéria utilizada para a expressão heteróloga. Este fenômeno já foi observado em um estudo com a GAPDH de esperma de rato, no qual essa GAPDH formou um heterotetrâmero com a GAPDH de *E. coli* (Frayne *et al.*, 2009). Nesse estudo, a formação do heterotetrâmero é explicada pelo fato da proteína recombinante ter um baixo nível de solubilidade, de modo que a formação de qualquer dímero pela proteína recombinante poderia rapidamente ser equilibrada ao se ligar à proteína da bactéria, uma vez que a GAPDH tende a formar tetrâmeros.

Conclusão

Como o objetivo do nosso projeto é o estudo funcional da proteína EgGAPDH e considerando que a proteína recombinante purificada pode estar formando complexos com a GAPDH de *E. coli*, a proteína purificada em questão não é adequada para seguir com os experimentos.

Perspectivas

- Obtenção da proteína rEgGAPDH pura, livre da proteína GAPDH de *E. coli*, utilizando uma linhagem de expressão cujo gene da GAPDH esteja mutado, na tentativa de evitar a expressão da proteína GAPDH da bactéria;
- Análise da expressão do gene codificador da EgGAPDH por RT-PCR;
- Análise in silico da estrutura do gene da EgGAPDH.

Referências bibliográficas

- Braschi, S., Borges, W. C., Wilson, R. A. (2006). Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 101, 202-212.
- Frayne, J., Taylor, A., Cameron, G., Hadfield, A. T. (2009). Structure of insoluble rat sperm glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) via heterotetramer formation with *Escherichia coli* GAPDH reveals target for contraceptive design. J. Biol. Chem. 284, 22703-22712.
- Monteiro, K. M., de Carvalho, M. O., Zaha, A., Ferreira, H. B. (2010). Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacystode during infection of its intermediate host. Proteomics Mar 9.
- Parrish, J. R., Limjindaporn, T., Hines, J. A., Liu, J., Liu, G. & Finley, R. L. (2004) High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. J. Proteome Res. 3, 582-586.
- Pérez-Sánchez, R., Valero, M. L., Ramajo-Hernández, A., Siles-Lucas, M., Ramajo-Martín, V., Oleaga, A. (2008). A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male and female *Schistosoma bovis* worms. Mol. Biochem. Parasitol. 161, 112-123.