

Introdução

O antígeno B (AgB) é a principal proteína encontrada nos produtos de secreção/excreção do cisto hidático, a forma larval de *Echinococcus granulosus*.

O AgB é uma lipoproteína oligomérica formada por subunidades de 8 kDa, codificadas por uma família multigênica (Chemale *et al.*, 2003). Estão descritas cinco subunidades diferentes para o antígeno B: AgB8/1, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4 e AgB8/5. O AgB é amplamente estudado em relação ao seu papel biológico, e os resultados desses estudos evidenciam suas implicações nos processos que promovem o estabelecimento e a sobrevivência do parasito (ver por ex. Shepherd *et al.*, 1991; Riganò *et al.*, 2001).

Apesar dos recentes avanços em relação a caracterização molecular do AgB (Monteiro *et al.*, 2007), ainda pouco se sabe sobre sua estrutura oligomérica e composição de subunidades.

O objetivo deste trabalho é avaliar as propriedades agregativas de duas subunidades recombinantes do AgB (rAgB8/4 e rAgB8/5) expressas em *Escherichia coli*.

Material e Métodos

• Purificação das proteínas recombinantes

Foi feita a expressão de rAgB8/4 em fusão com GFP (*Green Fluorescent Protein*) e cauda de histidinas e de rAgB8/5 em fusão com Glutathione-S-Transferase (GST) em *Escherichia coli*.

As proteínas recombinantes em fusão foram purificadas por cromatografia de afinidade.

Por meio de clivagem com a protease TEV (*Tobacco Etch Virus*) as proteínas recombinantes (rAgB8/4 e rAgB8/5) foram liberadas da fusão.

• Cross-linking

80 µl de uma solução 2 mg/ml de cada subunidade recombinante foram incubados com 0,1% de glutaraldeído à temperatura ambiente.

Aliquotas de 10 µl foram removidas em diferentes intervalos de tempo e analisadas em SDS-PAGE.

• Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Para os experimentos de DLS utilizou-se 1 mg de proteína em solução (1 mL de PBS) previamente filtrada em membrana de 0,45 µm em capela de fluxo laminar.

As medidas foram conduzidas em um equipamento da Brookhaven Instruments, em ângulo fixo de 90° e sob temperatura controlada de 37°C. Foi utilizado um laser He-Ne (632,8 nm) como fonte de luz.

• Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As proteínas recombinantes em solução (3mg/ml em PBS) foram aquecidas a 37°C por 15 min.

Telas de formvar/carbono foram colocadas sobre uma gota de 20 µl de cada subunidade recombinante por 15 minutos.

As amostras foram coradas com acetato de uranila 1% por 5 minutos.

As imagens de MET foram registradas em um microscópio JEOL modelo JEM 1200EXII (disponível no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS), operado a 80 kV.

Resultados

As imagens de MET mostram grandes agregados formados por rAgB8/4 e rAgB8/5, assim como, diferenças estruturais existentes entre os mesmos (Fig. 1). Os agregados formados por rAgB8/4 possuem uma estrutura mais aberta, com regiões afiladas, enquanto aqueles formados por rAgB8/5 apresentam uma estrutura mais compacta, quase globular (Figs. 1A e 1B, respectivamente). Na preparação de rAgB8/5 também foram observados agregados com aspecto amorfo (Fig. 1C)

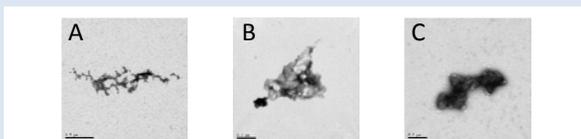


Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão dos oligômeros formados pelas subunidades recombinantes. As imagens mostram a estrutura de rAgB8/4 (A) e rAgB8/5 (B e C). Aumento: 60 000x (A) e 100 000x (B e C).

As análises por *cross-linking* também demonstraram que as formas monoméricas de rAgB8/4 e rAgB8/5 interagem formando oligômeros de alta massa molecular (Fig. 2). Nos tempos iniciais aparecem bandas regularmente espaçadas de 8, 16, 24 kDa, o que se assemelha muito ao padrão observado para o AgB nativo em SDS-PAGE. A partir de 30 min de incubação com glutaraldeído observam-se diferenças significativas entre as duas subunidades recombinantes. O monômero de rAgB8/5 desaparece e evidenciam-se produtos de *cross-linking* concentrados na região de 35-50 kDa (Fig. 2B), enquanto que no caso de AgB8/4 observa-se, embora em menor quantidade, a presença do monômero e os oligômeros de maior massa molecular distribuem-se acima dos 35 kDa (Fig. 2A).

Além disso, também é possível ver uma banda >150 kDa que não está presente no *cross-linking* de rAgB8/5 (Fig. 2B).

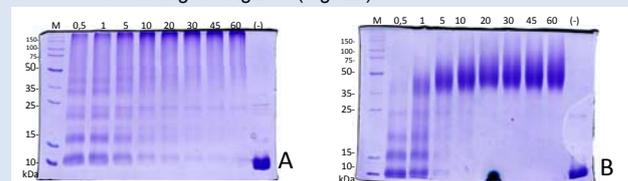


Figura 2. *Cross-linking* dos oligômeros recombinantes de AgB8/4 (A) e AgB8/5 (B). As proteínas foram incubadas com glutaraldeído 0,1% por 0,5; 1; 5; 10; 20; 30; 45 e 60 min como indicado no topo da imagem. (-) Amostra sem glutaraldeído. M: Marcador de massa molecular.

Os resultados obtidos com a técnica de espalhamento de luz dinâmico corroboram com os demais resultados mostrando que as subunidades formam agregados em solução. As análises por DLS mostram diferenças nos estados agregativos de cada subunidade, rAgB8/4 forma uma população principal de agregados que se destaca, enquanto rAgB8/5 apresenta pelo menos duas subpopulações representativas (Fig. 3).

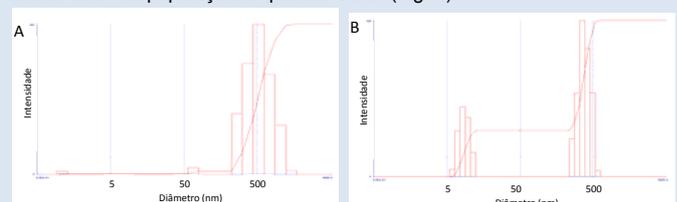


Figura 3. Análise por espalhamento de luz dinâmico dos oligômeros recombinantes de AgB8/4 (A) e AgB8/5 (B). Foram utilizadas soluções contendo 1mg/ml de proteína recombinante, a 37°C. O eixo x representa as medidas em nanômetros para os diâmetros hidrodinâmicos dos agregados. O eixo y dita a representatividade da população de agregados na amostra.

Discussão

O perfil dos oligômeros formados foi característico de cada subunidade recombinante. rAgB8/5 apresentou tanto uma associação com maior afinidade e formação de agregados com estrutura mais fechada e compacta, demonstrado pelas análises de *cross-linking* e imagens de MET, como graus de oligomerização variados, visível nas análises de DLS.

Monteiro *et al.* (2007) demonstraram que as subunidades rAgB8/1, rAgB8/2 e rAgB8/3 possuem capacidade de se associar, não-covalentemente, assim como, apresentam diferenças em seu estado oligomérico. Os resultados obtidos neste trabalho, indicam que as subunidades rAgB8/4 e rAgB8/5 apresentam essas mesmas propriedades agregativas.

Perspectivas

Caracterizar as subunidades recombinantes por meio de técnicas como gel filtração e dicroísmo circular para confirmar os resultados obtidos até o momento e obter informações sobre a estrutura secundária destas subunidades.

Referências

- CHEMALE, G. *et al.* *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 116: 233-237 (2001).
MONTIÉRO, K. M. *et al.* Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1774: 278-285 (2007).
RIGANÒ, R. *et al.* Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect. Immunol.* 69: 288-296 (2001).
SHEPHERD, J.C. A protein secreted *in vivo* by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44: p. 81-90, (1991).