

Caracterização das proteínas 14-3-3 ϵ 1 e 14-3-3 ϵ 2 do parasito *Echinococcus granulosus*



Bruna Valandro Meneghetti, Aline Teichmann, Karina Mariante Monteiro, Henrique Bunselmeyer Ferreira, Arnaldo Zaha
E-mail: bvalandromeneghetti@gmail.com

Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos & Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia, UFRGS

Introdução

A hidatidose cística é uma doença infecciosa causada pelo cestódeo *Echinococcus granulosus* e uma zoonose hiperendêmica no Cone Sul da América do Sul, incluindo o sul do Brasil¹. O *E. granulosus* tem, como hospedeiros definitivos, os canídeos, e, como hospedeiros intermediários, ungulados domésticos e o homem. O estabelecimento e a manutenção do cisto hidático (forma larval patogênica) durante a infecção crônica envolve a participação de diversas proteínas que podem estar relacionadas a atividades fisiológicas do parasito².

As proteínas 14-3-3 constituem uma família conservada de moléculas que têm sido descritas como de grande relevância na biologia celular de eucariotos, estando envolvidas em diversos processos, incluindo regulação do ciclo celular, apoptose, regulação da transcrição e sinalização celular³. Em *E. granulosus*, duas isoformas ϵ das proteínas 14-3-3 foram identificadas em análises proteômicas, estando presentes em protoescolices (pré-adultos)⁴ e nos seus produtos de secreção/excreção em cultura (dados não publicados). Isso sugere que as proteínas 14-3-3 de *E. granulosus* podem desempenhar um papel potencialmente importante na relação parasito-hospedeiro.

Objetivos

- Clonar e expressar em *Escherichia coli* as seqüências codificadoras das proteínas 14-3-3 ϵ 1 (Eg14-3-3 ϵ 1) e 14-3-3 ϵ 2 (Eg14-3-3 ϵ 2) de *E. granulosus*;
- Identificar proteínas que interagem com as proteínas Eg14-3-3 ϵ 1 e Eg14-3-3 ϵ 2 de *E. granulosus*;
- Analisar o padrão de expressão da proteína Eg14-3-3 ϵ 1 em componentes do cisto hidático.

Metodologia

1- Clonagem, expressão e purificação das proteínas Eg14-3-3 ϵ 1 e Eg14-3-3 ϵ 2:

A clonagem das seqüências codificadoras das proteínas Eg14-3-3 ϵ 1 e Eg14-3-3 ϵ 2 foram realizadas por recombinação homóloga *in vivo* em dois vetores plasmidiais distintos (pET-26b e pGEX-TEV, respectivamente). As seqüências clonadas tiveram a sua identidade confirmada pelo sequenciamento num sequenciador MEGABACE 1000. A expressão das proteínas recombinantes foram em *E. coli* BL21 Codon Plus RP (DE3) na condição de 0,5mM de IPTG sob agitação a 25 C por 3 horas para Eg14-3-3 ϵ 1 e 0,1mM de IPTG sob agitação a 37 C por 3 horas para Eg14-3-3 ϵ 2. A expressão da proteína Eg14-3-3 ϵ 1 recombinante no espaço periplásmico com cauda de histidina, permitiu posterior purificação por cromatografia de afinidade com resina de níquel, e a expressão da proteína Eg14-3-3 ϵ 2 recombinante no citoplasma, em fusão com a GST, foi submetida a clivagem com a protease TEV e posterior purificação por cromatografia de afinidade com resina de glutiona-Sephrose 4B.

2- Imunolocalização:

As proteínas recombinantes foram utilizadas na imunização de animais para a produção de antissoros, que foram utilizados nas análises do padrão de expressão da proteína Eg14-3-3 ϵ 1. Os experimentos de imuno-localização foram realizados por microscopia confocal em protoescolices e camada germinativa com cortes de 5 μ m e *in toto* para protoescolices. A marcação de núcleo e citoesqueleto foram feitas com DAPI-4'6'-diamidino-2-phenylindole e Faloidina Alexa Fluor 594 (Invitrogen) respectivamente. Para detecção do complexo anticorpo/proteína foi utilizado anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen). As lâminas foram preparadas em meio Fluoromount (Sigma) e analisadas em microscópio Confocal ESPECTRAL FV1000 no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

3- Ensaio de interação - Cross-Linking:

A identificação de proteínas de extratos de protoescolices (pré-adultos) que interagem com as isoformas Eg14-3-3 ϵ 1 e Eg14-3-3 ϵ 2 foi realizada através de ensaios de *cross-linking* mediados por Sulfo-SBED (Pierce, Thermo Scientific), para marcação de ligantes com biotina e recuperação por cromatografia de afinidade com avidina (Monomeric Avidin Resin, Pierce, Thermo Scientific). As proteínas de interação foram identificadas por espectrometria de massas (LC-MS/MS). As seqüências foram processadas utilizando o Mascot 2.2.1. As classes funcionais foram atribuídas com base em proteínas anotadas no KOG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/grace/kognitor.html>).

Resultados

1- Purificação das proteínas Eg14-3-3 ϵ 1 e Eg14-3-3 ϵ 2: Após a extração da fração periplásmica foi possível purificar a proteína recombinante Eg14-3-3 ϵ 1 com cauda de histidina (massa molecular de 28 kDa) (Figura 1A). A purificação da Eg14-3-3 ϵ 2 em fusão com a GST (massa molecular de 54 kDa) foi submetida a clivagem obtendo a proteína livre da fusão (massa molecular de 28 kDa) (Figura 1B).

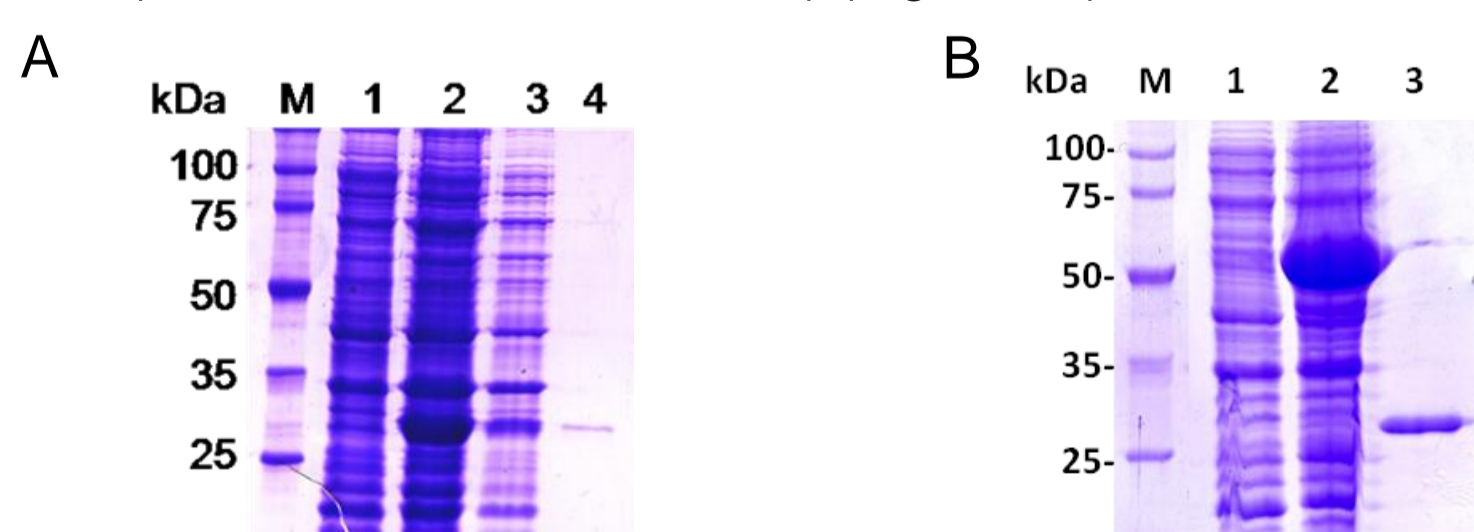


Figura 1: (A) Purificação da proteína Eg14-3-3 ϵ 1 M- Marcador de Massa Molecular 1- Cultura não-induzida 2- Cultura induzida com 0,5 mM de IPTG 3- Extração da Fração Periplásmica 4- Purificação da proteína recombinante Eg14-3-3 ϵ 1 com cauda de histidina (B) Purificação da proteína Eg14-3-3 ϵ 2 M- Marcador de Massa Molecular 1- Cultura não-induzida 2- Cultura induzida com 0,1mM de IPTG da proteína Eg14-3-3 ϵ 2 em fusão com a proteína GST 3- Purificação da proteína Eg14-3-3 ϵ 2, livre da fusão com a GST.

2- Análise do padrão de expressão da proteína Eg14-3-3 ϵ 1

Nos experimentos de imunolocalização com protoescolices, foi possível observar uma ampla distribuição da proteína por todo o protoescolice (Figura 2) e principalmente ao redor dos núcleos das células (Figura 3). A proteína Eg14-3-3 ϵ 1 também pode ser observada na camada germinativa do cisto hidático (Figura 4) que é um componente de interação com o hospedeiro demonstrando um papel potencialmente importante da proteína Eg14-3-3 ϵ 1 na relação parasito-hospedeiro.

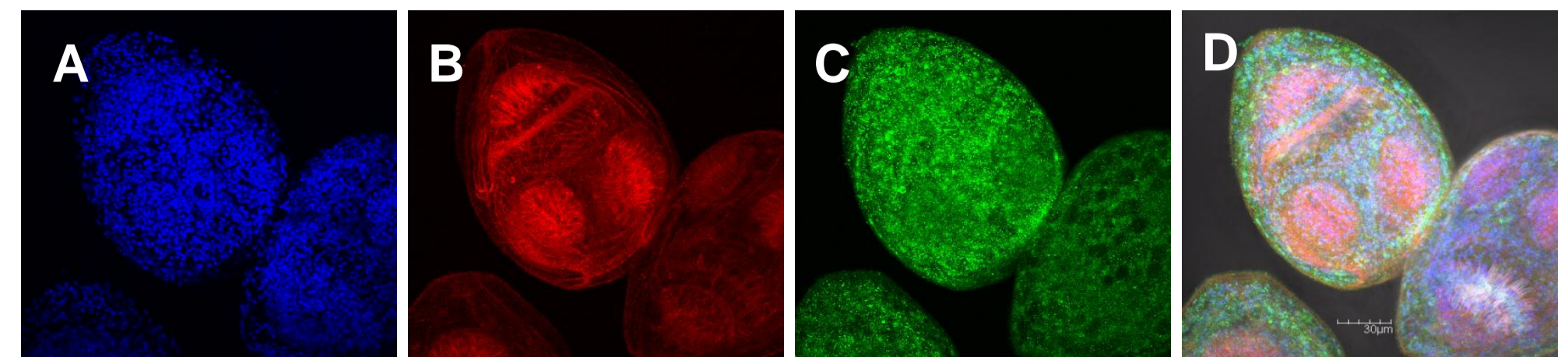


Figura 2: Análise *in toto* do padrão de expressão da isoforma Eg14-3-3 ϵ 1 em protoescolices – A: marcação de núcleos com DAPI (azul); B: marcação de actina com Faloidina conjugada com fluoróforo Alexa 594 (vermelho); C: detecção da proteína por marcação indireta com anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa 488 (verde); D: sobreposição das marcações.

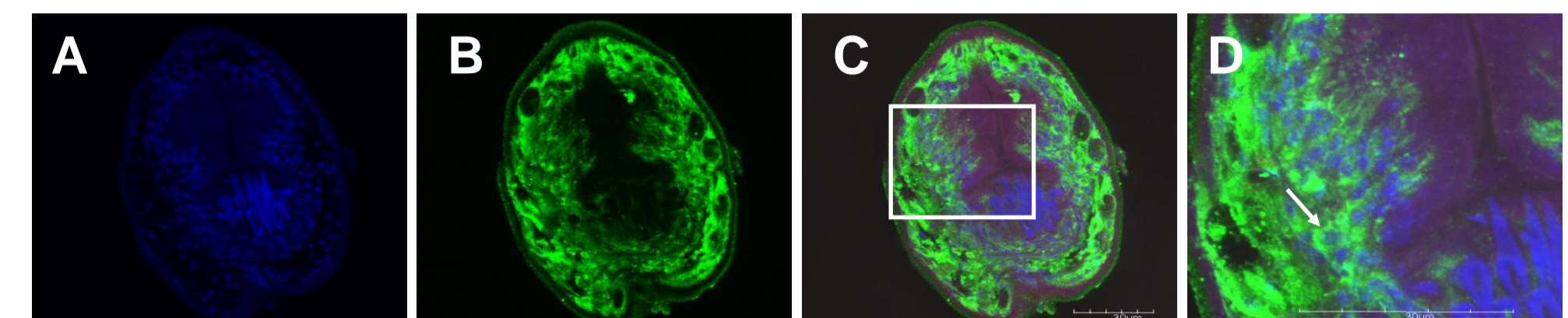


Figura 3: Análise do padrão de expressão da isoforma Eg14-3-3 ϵ 1 em cortes longitudinais de protoescolices. A: marcação de núcleos com DAPI (azul); B: detecção da proteína por marcação indireta com anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa 488 (verde); C: sobreposição das marcações. D: detalhe da imagem C, seta indica localização perinuclear da proteína Eg14-3-3 ϵ 1.

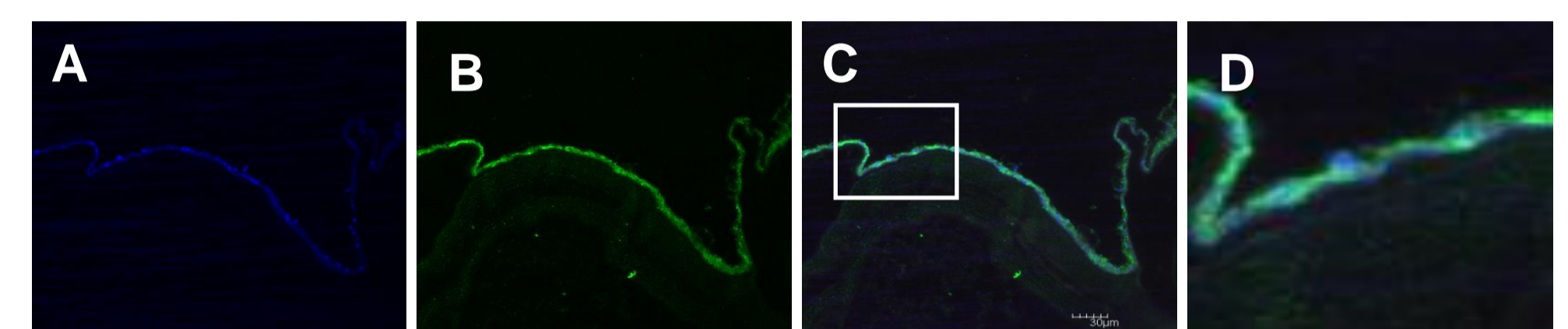


Figura 4: Análise do padrão de expressão da isoforma Eg14-3-3 ϵ 1 em cortes de camada germinativa do cisto hidático - A: marcação de núcleos com DAPI (azul); B: detecção da proteína por marcação indireta com anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa 488 (verde); C: sobreposição das marcações. D: detalhe da imagem C.

3- Identificação das proteínas de interação com as isoformas Eg14-3-3 ϵ 1 e Eg14-3-3 ϵ 2:

A partir do experimento de *cross-linking* foi possível identificar 24 proteínas de interação com a proteína Eg14-3-3 ϵ 1 e 19 proteínas de interação com a proteína Eg14-3-3 ϵ 2 (Quadro 1). Conforme a análise das classes funcionais, foi possível observar que o maior número de proteínas de interação com a proteína Eg14-3-3 ϵ 1 estão relacionadas a modificações pós-traducionais *turnover* de proteínas e chaperonas (25%), proteínas envolvidas na produção e conversão de energia (20%) e proteínas de citoesqueleto (16%). Para a proteína Eg14-3-3 ϵ 2 a maioria das proteínas de interação estão relacionadas a modificações pós-traducionais *turnover* de proteínas e chaperonas (26%), proteínas de citoesqueleto (26%) e proteínas envolvidas a produção e conversão de energia (21%).

Quadro 1: Proteínas de interação com as proteínas Eg14-3-3 ϵ 1 e Eg14-3-3 ϵ 2 organizadas de acordo com a classificação funcional KOG.

Proteínas de interação com a Eg14-3-3 ϵ 1 e categorias funcionais	Proteínas de interação com a Eg14-3-3 ϵ 2 e categorias funcionais
Modificações pós-traducionais, turnover de proteína e Chaperonas	Modificações pós-traducionais, turnover de proteína e Chaperonas
1- Proteína de choque térmico (HSP20)	1- Proteína de choque térmico (HSP20)
2- Proteína de choque térmico (HSP60)	2- Proteína de choque térmico (HSP70)
3- Proteína de choque térmico (HSP70)	3- Proteína de choque térmico (HSP90)
4- Proteína de choque térmico (HSP90)	4- Tiorredoxina-peroxidase
5- Tiorredoxina-peroxidase	5- 14-3-3 epsilon 1
6- 14-3-3 epsilon 1	Citoesqueleto
Produção e conversão de energia	6- Actina
7- Fosfoenolpiruvato-carboxiquinase	7- Alfa-tubulina
8- Malato-desidrogenase	8- Miofilina
9- Citrato-sintase	9- Miosina
10- Lactato-desidrogenase	10- Proteína de fragmentação de filamento de actina
11- Succinato-desidrogenase	Produção e conversão de energia
Citoesqueleto	11- Fosfoenolpiruvato-carboxiquinase
12- Actina	12- Malato-desidrogenase
13- Alfa-tubulina	13- Citrato-sintase
14- Dineína	14- Succinato-desidrogenase
15- Miosina	Transporte e metabolismo de carboidratos
Transporte e metabolismo de carboidratos	15- Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
16- Enolase	16- Transketolase
17- Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular
18- Fosfoglicerato-mutase	17- Anexina
19- Transketolase	Controle do ciclo celular, divisão celular e particionamento do cromossomo
Tradução, estrutura ribossomal e biogênese	18- Catepsina D
20- Fator de elongação 1-alfa	Sem classificação
Transporte e metabolismo de aminoácidos	19- MVP
21- Omitina-aminotransferase	
Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular	
22- Anexina	
Mecanismos de defesa	
23- DJ-1	
Sem classificação	
24- MVP	

Das interações identificadas neste estudo, muitas já foram descritas na literatura para outros organismos. Entre as proteínas de interação, muitas estão envolvidas em funções biológicas significativas para o parasito, como organização de citoesqueleto, resistência a estresse e processos metabólicos.

Perspectivas

- Realizar outras duas abordagens complementares que identifiquem proteínas de interação;
- Confirmar algumas das interações observadas por ensaios de imuno-precipitação;
- Analisar o padrão de expressão da proteína Eg14-3-3 ϵ 1 em componentes do cisto hidático.

Referências

- Thompson, R. C. A. & McManus, D. P. Trends in Parasitology 18: 452-457, 2002.
- Siles-Lucas *et al.* Exp Parasitol, 119, 516-23, 2008.
- Fu *et al.* 2000. Annu Rev Pharmacol Toxicol 40: 617-647.
- Monteiro, *et al.* Proteomics 2010, 10, 1985-1999