

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Clonagem e expressão da proteína 14-3-3 ϵ 1 de *Echinococcus granulosus* em
*Escherichia coli***

Dissertação de Mestrado

Aline Teichmann

Porto Alegre, outubro 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Clonagem e expressão da proteína 14-3-3 ϵ 1 de *Echinococcus granulosus* em
*Escherichia coli***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Aline Teichmann

Orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, outubro 2010

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional e Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia da UFRGS, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico

A minha amada família e, em especial, ao meu noivo, Juliano Rathke, pelo companheirismo e incentivo durante toda essa jornada.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela dedicação, auxílio, incentivo e oportunidade da realização deste trabalho.

Ao Dr. Arnaldo Zaha pelo apoio, auxílio, e oportunidade de convívio e aprendizado.

À Dra. Karina Mariante Monteiro pela amizade, incentivo, apoio, ensinamentos, discussões, conselhos e pelas boas idéias sempre compartilhadas.

A todos os colegas dos laboratórios 204, 206 e 210, Veri, Bruna, Karina L., Taylor, Jéssica, Thiely, Gabriela, Luciana, Taís, Helier, Martín, Edi, Daiani, Carol, Guilherme e Poliana, pela amizade, apoio e colaboração nas dúvidas e discussões.

À Dra. Andréia Rosane de Moura Valim, por sua amizade, apoio e principalmente por ter me encaminhado para o mestrado.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial à Sílvia, Luciano, Milton e Paulo pelo auxílio e colaboração.

Aos meus sogros, Ângela e Gilberto, pelo apoio, amizade e por sempre cuidarem de mim.

A toda minha família, por todo amor, apoio, incentivo, orações, dedicação e compreensão pela minha ausência.

Ao meu “noivido”, Juliano pelo amor, dedicação, incentivo e por ser meu grande companheiro em todos os desafios da minha vida.

Índice

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	1
Lista de figuras	8
Resumo	9
Abstract	10
1. Introdução	11
1.1. <i>Echinococcus granulosus</i> e hidatidose cística	11
1.2. Epidemiologia e distribuição	15
1.3. Interação parasito-hospedeiro	19
1.4. Proteínas 14-3-3	20
2. Justificativa e objetivos	25
3. Materiais e métodos	27
3.1. Cistos hidáticos	27
3.2. Preparação de RNA de protoescólices e síntese do cDNA	27
3.3. Amplificação da sequência-alvo e clonagem nos vetores de expressão	27
3.4. Expressão da proteína recombinante	29
3.5. Solubilização de proteína recombinante	30
3.6. Purificação da proteína recombinante fusionada a GST	30
3.7. Extração da fração periplasmática	31
3.8. Purificação da proteína recombinante fusionada a cauda de histidina	31
3.9. Análise eletroforética de DNA e RNA em géis de agarose	32
3.10. Análise eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS	32
4. Resultados	34
4.1. Clonagem da sequência codificadora Eg14-3-3ε1	34
4.2. Expressão da proteína Eg14-3-3ε1 em <i>E. coli</i> a partir de pGEX-TEV	36
4.3. Purificação da proteína recombinante fusionada a GST	37
4.4. Expressão da proteína Eg14-3-3ε1 em <i>E. coli</i> a partir do vetor pET-26b	38
4.5. Purificação da proteína recombinante com cauda de histidina	39
5. Discussão	42
6. Referências bibliográficas	49
Curriculum Vitae	57

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

cDNA: DNA complementar

DNA: ácido desoxirribonucleico

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

Eg14-3-3: Proteína 14-3-3 de *Echinococcus granulosus*

GST: glutationa-S-transferase

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa: quilodalton(s) (1000 daltons)

pb: par(es) de bases

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PCR: reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

RNA: ácido ribonucleico

RT-PCR: transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase

SAP: fosfatase alcalina de camarão

SDS: dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

TEV: do inglês, *tobacco etch virus*

Lista de figuras

Figura 1: Forma adulta do <i>Echinococcus granulosus</i>	12
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Echinococcus granulosus</i>	14
Figura 3: Diagrama esquemático do metacéstódeo	15
Figura 4: Mapa da distribuição global de <i>Echinococcus granulosus</i>	16
Figura 5: Dímero estrutural da isoforma da proteína 14-3-3 σ humana.....	22
Figura 6: Produtos de amplificação da sequência codificadora da isoforma Eg14-3-3 ϵ 1	34
Figura 7: Clonagem da sequência codificadora	35
Figura 8: Expressão da Eg14-3-3 ϵ 1 em <i>E. coli</i>	36
Figura 9: Solubilização e clivagem da proteína recombinante.....	38
Figura 10: Expressão da Eg14-3-3 ϵ 1 em <i>E. coli</i>	39
Figura 11: Extração da fração periplasmática e purificação da proteína recombinante	40
Figura 12: Purificação da proteína recombinante	41

Resumo

O *Echinococcus granulosus* é um platelminto parasita da classe Cestoda, que tem, como hospedeiros definitivos, os canídeos, e, como hospedeiros intermediários mais comuns, ungulados domésticos e o homem. Este parasito é o agente etiológico da hidatidose cística, zoonose hiperendêmica no Cone Sul da América do Sul, incluindo o sul do Brasil. Para o estabelecimento e manutenção do cisto hidático por longos períodos de tempo (infecção crônica), o parasito secreta e expõe ao seu hospedeiro numerosas proteínas, que podem apresentar tanto atividade imunomoduladora, como estar relacionadas a atividades fisiológicas do parasito. As proteínas 14-3-3 constituem uma família altamente conservada de moléculas reguladoras eucarióticas, que são capazes de interagir com diferentes proteínas ligantes em diversos contextos celulares, regulando funções biológicas complexas. Em *E. granulosus*, foram identificadas cinco proteínas 14-3-3, sendo três isoformas ζ e duas isoformas ϵ . Essas proteínas podem estar envolvidas em interações parasito-hospedeiro que propiciam o estabelecimento e o desenvolvimento da forma larval patogênica (metacestódeo). Para a futura caracterização funcional da proteína 14-3-3 ϵ 1 de *E. granulosus* (Eg14-3-3 ϵ 1), já detectada em componentes do metacestódeo, a sua sequência codificadora foi expressada em *Escherichia coli*. A clonagem foi realizada em dois vetores plasmidiais distintos (pGEX-TEV e pET-26b), para permitir a expressão em *E. coli* da proteína Eg14-3-3 ϵ 1 recombinante no citoplasma, em fusão com a GST, e no espaço periplásmico, com cauda de histidina, respectivamente. A solubilização da Eg14-3-3 ϵ 1 em fusão com a GST foi obtida com 0,5% de sarcosil, mas no entanto não foi possível a sua purificação. A proteína Eg14-3-3 ϵ 1 com cauda de histidina foi obtida por extração da fração periplasmática seguida da purificação por cromatografia de afinidade, tendo sido obtido um rendimento final de 0,5 mg/l de cultura. A proteína Eg14-3-3 ϵ 1 recombinante purificada será futuramente utilizada em ensaios funcionais, buscando inicialmente a identificação de seus ligantes proteicos dentre o repertório de proteínas do parasito e do hospedeiro, no contexto da infecção crônica.

Abstract

Echinococcus granulosus is a parasitic platyhelminth of the Cestoda class, which has canids as definitive hosts, domestic ungulates and humans as intermediate hosts. This parasite is the causative agent of cystic hydatid disease, a hyperendemic zoonosis in the Southern Cone of South America, including Southern Brazil. In order to the establishment and maintenance of hydatid cyst for a long period of time, the parasite secretes and exposes to its host numerous proteins, which may have immunomodulatory activity as well to be related to physiological activities of the parasite. The 14-3-3 proteins are a family of highly conserved eukaryotic regulatory molecules that are able to interact with different partner proteins in different cellular contexts, regulating complex biological functions. In *E. granulosus* five 14-3-3 proteins have been identified, three ζ isoform and two ϵ isoform. These proteins may be involved in host-parasite interactions that favor the establishment and growth of the pathogenic larval form (metacestode). For future functional characterization of the 14-3-3 ϵ 1 protein from *E. granulosus* (Eg14-3-3 ϵ 1) previously detected in metacestode components, its coding sequence was expressed in *Escherichia coli*. The cloning was done into two different plasmid vectors (pGEX-TEV and pET-26b), to produce recombinant Eg14-3-3 ϵ 1 protein in *E. coli*, in the cytoplasm, in fusion with GST, and periplasmic with histidine tail, respectively. Solubilization of Eg14-3-3 ϵ 1 fused with GST was achieved with 0.5% sarcosyl, yet it was not possible to purify it. The Eg14-3-3 ϵ 1 protein with histidine tail was obtained by extracting the periplasmic fraction from *E. coli* cultures, followed of purification by affinity chromatography, yielding 0.5 mg/l. The recombinant Eg14-3-3 ϵ 1 protein will be used in functional assays, initially aiming at the identification of protein ligands from the repertoire of proteins from the parasite and from host in the context of chronic infection.

1. Introdução

1.1. *Echinococcus granulosus* e hidatidose cística

O gênero *Echinococcus*, Rudolphi 1801, pertence família Taeniidae classe Cestoda filo Platyhelminthes. Os membros deste filo caracterizam-se por serem animais triploblásticos, acelomados e achatados dorso-ventralmente. Os membros do gênero *Echinococcus* são endoparasitos que necessitam dois hospedeiros mamíferos para completar seus ciclos vitais. Diferentes hospedeiros intermediários são descritos para as espécies pertencentes ao gênero *Echinococcus* (Thompson & McManus 2002). Para as espécies *Echinococcus vogeli* e *Echinococcus oligarthus*, por exemplo, roedores. Para a espécie *Echinococcus multilocularis*, além de roedores, também são descritos como hospedeiros intermediários suínos selvagens e domésticos, assim como primatas. Para *Echinococcus granulosus* são descritos como hospedeiros intermediários principalmente ungulados domésticos que incluem ovinos e bovinos além de cabras e camelos para alguns grupos isolados.

Todas as espécies que fazem parte do gênero *Echinococcus* são infectivas para seres humanos na sua fase larval. Dentre estas espécies, *E. granulosus* é a mais estudada, por apresentar grande importância médica e veterinária, sendo o agente causador da hidatidose cística (Thompson *et al.* 1995), que é um importante problema de saúde em diversas partes do mundo. Os seres humanos adquirem a infecção acidentalmente, ao entrarem em contato com os ovos do parasito.

E. granulosus, na sua forma adulta, é uma pequena tênia, com 2 a 7 mm de comprimento (Eckert & Deplazes 2004). Na sua porção anterior, o verme

adulto apresenta um escólex, que possui quatro ventosas musculares e um rostelo com duas fileiras de ganchos, envolvidos na fixação do parasito no hospedeiro. O corpo ou estróbilo é composto de três segmentos ou proglótides, que diferem no seu estágio de maturação sexual. A primeira proglótide é dita jovem ou imatura, a segunda é a proglótide sexualmente madura, e a última, a proglótide grávida que contém os ovos do parasito (Figura 1).

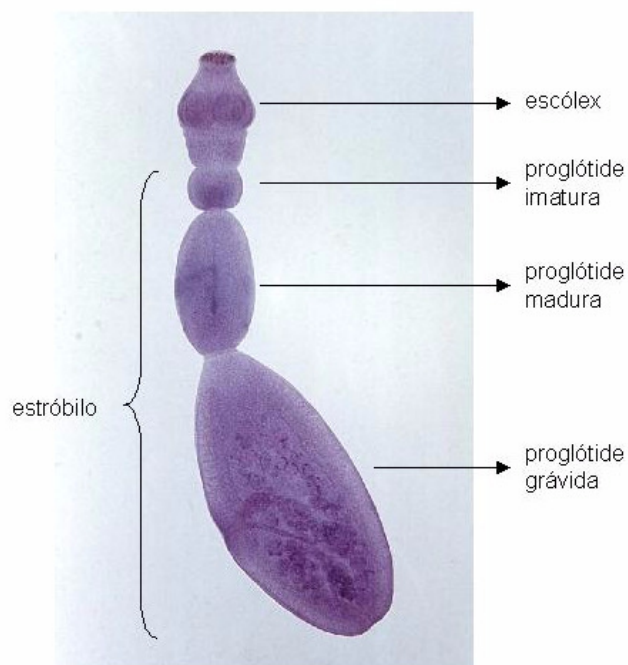


Figura 1: Forma adulta do *Echinococcus granulosus*. O parasito adulto possui um escólex globular, onde encontram-se estruturas de adesão e fixação, e um estróbilo composto por três proglótides. A proglótide imatura, a proglótide madura, e a proglótide grávida. Modificado de http://www.cmpt.ca/photo_album_parasitology/parasitology_photos_4_ces.htm.

E. granulosus necessita de dois hospedeiros para completar o seu ciclo de vida (Figura 2). O verme adulto vive no intestino delgado de um canídeo (hospedeiro definitivo), que geralmente é um cão doméstico. Os ovos são

eliminados pelo adulto juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo, sendo presumivelmente maduros e, portanto, possuem capacidade infectiva. Após a liberação no ambiente, os ovos são dispersos pelo vento, pela água e por insetos e são infecciosos para os hospedeiros intermediários, que, em geral, são ungulados domésticos. O homem é infectado acidentalmente pela ingestão de ovos do parasito através das mãos, comida, água ou outros materiais contaminados com fezes do hospedeiro definitivo (Eckert & Deplazes 2004). Depois de ingerido pelo hospedeiro intermediário, o ovo sofre a ação de enzimas digestivas, o que leva à liberação da oncosfera. A oncosfera atravessa a parede intestinal e, por via venosa ou linfática, atinge diferentes órgãos do hospedeiro, principalmente pulmões e fígado, onde fica retida em vasos de pequeno calibre. Uma vez fixada, a oncosfera inicia um complexo processo de diferenciação, dando origem ao cisto hidático (metacestódeo) que é a forma larval patogênica. Cistos hidáticos de *E. granulosus* em seres humanos se desenvolvem principalmente no fígado (70%) e pulmões (20%), com 10% dos cistos podendo ocorrer em outros locais, como cérebro, musculatura, coração, rins e ossos (Jenkins *et al.* 2005).

Os pré-adultos (protoescólices) originam-se a partir da membrana interna do cisto hidático. Ao ser ingerido por um hospedeiro definitivo juntamente com vísceras infectadas por cistos hidáticos, cada protoescólex tem a capacidade de se diferenciar em um verme adulto, fechando o ciclo vital do *E. granulosus*.

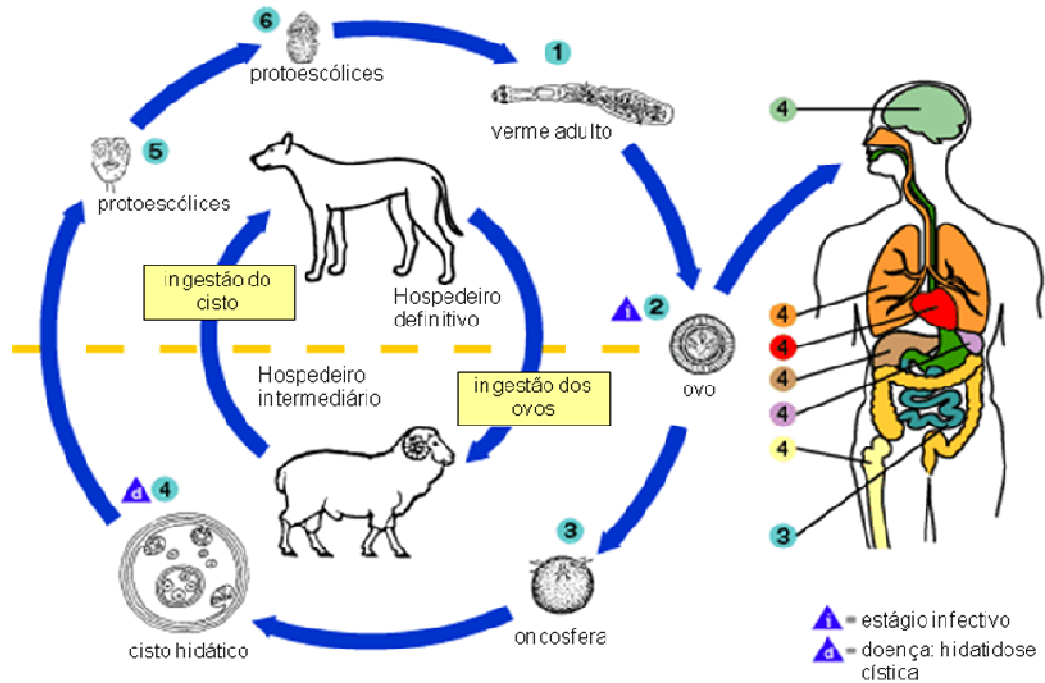


Figura 2: Ciclo de vida do *Echinococcus granulosus*. Modificado do Centro para o Controle e Prevenção de Doenças Infecciosas (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

O metacestódeo (Figura 3) é composto por uma camada germinativa interna que é sustentada por uma camada laminar que é secretada pela camada germinativa e é constituída principalmente de mucopolissacarídeos e de uma pequena fração proteica. Externamente, o cisto é envolto pela camada adventícia, a qual é constituída por tecido conjuntivo do hospedeiro, produto da reação inflamatória em resposta à presença do parasito. O cisto é preenchido internamente pelo líquido hidático que é uma mistura de moléculas do parasito e moléculas derivadas do soro do hospedeiro. Os protoescolices se originam da membrana germinativa, sendo infecciosos para os hospedeiros definitivos (Thompson *et al.* 1995).

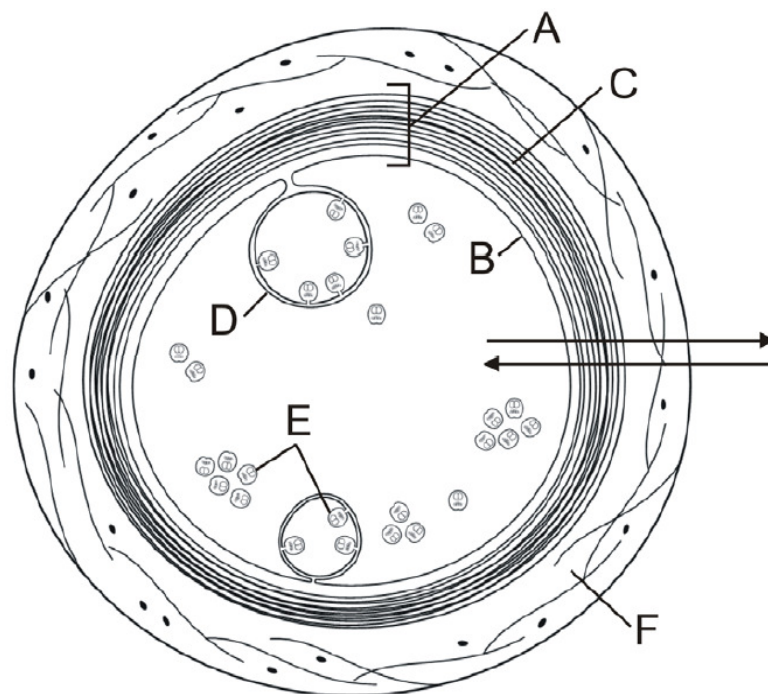


Figura 3: Diagrama esquemático do metacestódeo: A: parede do cisto hidático, B: camada germinativa, C: camada laminar, D: cápsula prolígera, E: protoescólices, F: camada adventícia, as setas indicam a troca de moléculas entre o parasito e o hospedeiro. (Monteiro *et al.* 2010).

1.2. Epidemiologia e distribuição

A hidatidose cística representa um problema importante de saúde pública humana e animal em todo mundo, com considerável impacto sócio-econômico (Pednekar *et al.* 2009). Ela é considerada uma zoonose parasitária emergente em nível mundial (Figura 4), que já causa prejuízos anuais da ordem de US\$ 760 milhões, em gastos no tratamento de pacientes humanos, e de mais de US\$ 2 bilhões, associados à diminuição de rendimento na pecuária (Budke *et al.* 2006, Battelli 2009). Na América do Sul, a hidatidose tem caráter endêmico ou hiperendêmico no Cone Sul (incluindo o sul do Brasil) e na região andina (de la Rue 2008, Gavidia *et al.* 2008, Moro *et al.* 2008).

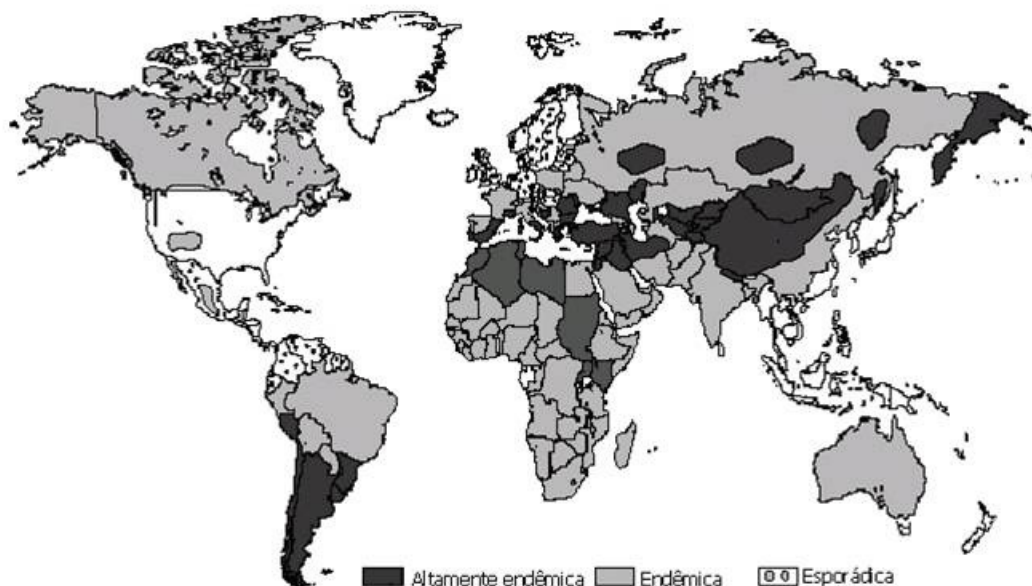


Figura 4: Mapa mostrando a distribuição global de *E. granulosus* (Budke *et al.* 2006).

O Rio Grande do Sul é considerado uma zona altamente endêmica da hidatidose, especialmente nos municípios que fazem fronteira com o Uruguai e a Argentina. A alta incidência da doença nestas regiões é resultado da pecuária, atividade econômica expressiva nestes municípios, com a criação de bovinos e ovinos. Nestas localidades, o ciclo doméstico do parasito se perpetua principalmente pela alimentação dos cães com vísceras contaminadas, em abates clandestinos ou domésticos.

No Rio Grande do Sul, a prevalência da hidatidose cística em bovinos vem se mantendo estável em torno dos 12% há mais de uma década, enquanto a prevalência da doença em ovinos, que se mantinha mais baixa (entre 2,5 e 9%) na década de 1990, tem aumentado, passando de sete para 18% em um período

de cinco anos (de la Rue, 2008). Em seres humanos, a média anual de casos diagnosticados no Rio Grande do Sul variou entre 13 e 43, de 1995 a 2001, de acordo com o Programa Estadual de Controle da Hidatidose. Entretanto, sabe-se que a hidatidose cística humana apresenta prevalências muito mais elevadas em certas áreas, que são subestimadas pelas estatísticas oficiais (Torgerson *et al.* 2000, Farias *et al.* 2004, de la Rue 2008).

Devido à presença do verme adulto no hospedeiro definitivo ser assintomática (Thompson *et al.* 1995), o significado clínico e econômico de *E. granulosus* é quase completamente restrito à infecção com o metacestódeo. Como a hidatidose cística afeta tanto animais domésticos como o homem, ela apresenta considerável impacto tanto para a agricultura como para a saúde pública, e causa importantes consequências sócio-econômicas em áreas endêmicas. A doença acarreta prejuízos econômicos relacionados ao tratamento médico ou cirúrgico de pacientes humanos e à diminuição de rendimento na pecuária, devido à redução no ganho de peso, na produção de leite, na taxa de fertilidade e no valor da lã e outros produtos. A hidatidose cística, apesar de não estar associada a altos índices de mortalidade (1-2%), provoca também prejuízos econômicos indiretos em função da sua morbidade, a qual acarreta na diminuição da produtividade do indivíduo (Torgerson & Budke 2003).

Na hidatidose as manifestações clínicas resultam do crescimento de uma massa cística ou de reações de hipersensibilidade. Os sintomas são decorrentes de uma lesão invasiva, que compromete a função do órgão afetado e causa compressão em órgãos e tecidos vizinhos. Os sintomas dependem, fundamentalmente, da localização e tamanho do cisto (McManus *et al.* 2003).

Como o cisto hidático possui crescimento lento e localização variável, a doença apresenta sintomas tardios e inespecíficos (McManus *et al.* 2003). Normalmente, o hospedeiro não desenvolve sintomas clínicos até que o cisto apresente pelo menos 10 cm de diâmetro (Eckert & Deplazes 2004). Por outro lado, o rompimento eventual do cisto, com a subsequente liberação do seu conteúdo, pode precipitar uma reação anafilática, que pode variar em severidade desde uma simples urticária até um choque fatal (McManus *et al.* 2003).

A inespecificidade dos sintomas e dos métodos físicos disponíveis para a detecção de cistos hidáticos (radiologia e ultrassonografia) torna complicado o diagnóstico clínico da hidatidose cística humana (Pawlowski *et al.* 2001). Também a caracterização limitada do repertório antigênico do parasito limita o desenvolvimento de vacinas, embora algumas proteínas com potencial para utilização em vacinação contra a hidatidose cística ou contra a hidatidose multilocular (causada por *E. multilocularis*) já tenham sido identificadas (Gottstein 2005, Gottstein *et al.* 2006, Lightowers 2006).

Para a prevenção e controle da hidatidose cística, os programas são baseados em medidas preventivas como educação sanitária, eliminação dos abates domésticos e a conscientização da população para mudança do hábito associado à prática rural de alimentar os cães com vísceras contaminadas, além do tratamento de cães com anti-helmínticos (Eckert *et al.* 2000, Moro & Schantz 2009). Mesmo com o desenvolvimento de ferramentas preventivas eficazes e de eventuais resultados positivos obtidos em programas locais de controle, não houve mudança acerca da distribuição global e do impacto na saúde pública humana e animal causado por *E. granulosus* (Craig *et al.* 2007, Moro & Schantz

2009). A hidatidose cística continua sendo uma doença negligenciada, onde na grande maioria das áreas, um controle efetivo não foi alcançado, apresentando status re-emergente em diversos países (Budke *et al.* 2006, Budke *et al.* 2009, Moro & Schantz 2009).

1.3. Interação parasito-hospedeiro

Para o estabelecimento do metacéstódeo no hospedeiro e manutenção da infecção por longo período de tempo, o parasito secreta e expõe ao seu hospedeiro numerosas proteínas, relacionadas às suas atividades fisiológicas, como reprodução, nutrição (Maizels & Yazdanbakhsh 2003) e à sua interação com as espécies hospedeiras (Siracusano *et al.* 2008), apresentando atividade imunomoduladora do sistema imune do hospedeiro. No entanto, o repertório de proteínas identificadas e caracterizadas no estágio larval patogênico de *E. granulosus* ainda é bastante limitado. No estudo da biologia de *E. granulosus*, há uma ênfase histórica na caracterização de antígenos. Dentre as proteínas de *E. granulosus* mais estudadas, estão o antígeno B (AgB) (Ferreira & Zaha 1994, Mamuti *et al.* 2006) e o antígeno 5 (Ag5) (Lorenzo *et al.* 2005), que são os componentes imunodominantes entre os produtos de secreção/excreção do parasito, presentes no líquido hidático que preenche o cisto (Chemale *et al.* 2001, Virginio *et al.* 2003, Monteiro *et al.* 2007, Virginio *et al.* 2007).

Poucas proteínas de *E. granulosus* vêm recebendo uma maior atenção e, o número daquelas para as quais foram realizados estudos além da determinação de seu potencial antigênico ou imunogênico é relativamente pequeno. Dentre estas proteínas, podem ser citadas uma proteína de fragmentação de filamentos

de actina (AFFP) da família da gelsolina (Cortez-Herrera *et al.* 2001, Grimm *et al.* 2006) e proteínas 14-3-3 (Siles-Lucas *et al.* 2001, Nunes *et al.* 2004). Há, contudo, uma carência de mais estudos para que estas e outras proteínas tenham seus papéis funcionais na biologia do parasito melhor esclarecidos, especialmente no que diz respeito ao potencial envolvimento em processos de interação parasito-hospedeiro a fim de melhor caracterizar os mecanismos utilizados pelo parasito para modular a resposta do hospedeiro e estabelecer a infecção crônica.

Grandes esforços são feitos para ampliar o conhecimento sobre a biologia de *E. granulosus*, incluindo estudos baseados principalmente em métodos moleculares que tem como objetivo melhor entender aspectos biológicos básicos do seu desenvolvimento e como se dá a sua interação com o hospedeiro. O desenvolvimento de novos estudos na área de proteômica (Chemale *et al.* 2003, Monteiro *et al.* 2010) e caracterização funcional de proteínas (Haag *et al.* 2006) do metacestódeo de *E. granulosus* representam uma etapa essencial para o melhor entendimento dos mecanismos utilizados por estes parasitos no estabelecimento e manutenção da infecção.

1.4. Proteínas 14-3-3

As proteínas 14-3-3 constituem uma família altamente conservada de moléculas reguladoras eucarióticas (Dougherty & Morrison 2004, Mhawech 2005, Yasmin *et al.* 2010). São proteínas acídicas, de massa molecular entre 28 e 33 kDa, e geralmente têm nove α -hélices e formam homo e /ou heterodímeros (Figura 5) (Fu *et al.* 2000) . Possuem vários domínios de modificação conhecidos,

incluindo regiões para interação com cátions divalentes, fosforilação e acetilação. Essas proteínas já foram identificadas em todos os organismos eucarióticos onde foram estudadas e estão presentes em diferentes isoformas (Bridges & Moorhead 2005).

O número de isoformas de proteínas 14-3-3 varia de organismo para organismo: protistas e algumas algas possuem apenas uma; leveduras, *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* possuem duas e muitas plantas superiores possuem de 12 a 15. Na maioria dos mamíferos, inclusive em seres humanos, são encontradas sete isoformas, identificadas pelas letras gregas β (beta), δ (delta), ϵ (epsilon), γ (gama), η (eta), τ (tau) e ζ (zeta). Em organismos com mais de uma isoforma de 14-3-3, a perda de uma delas por deleção gênica, pode ser tolerada, o que indica um certo grau de redundância funcional, mas a deleção de todos os genes de 14-3-3, testada experimentalmente em *Saccharomyces cerevisiae*, é letal (Gelperin *et al.* 1995). A especificidade funcional das isoformas de 14-3-3 pode ser resultado da expressão de genes específicos ou regulação por um ligante isoforma-específico (Gardino *et al.* 2006, Acevedo *et al.* 2007). As isoformas de 14-3-3 mesmo tendo afinidade por ligantes em comum podem apresentar funções diferentes.

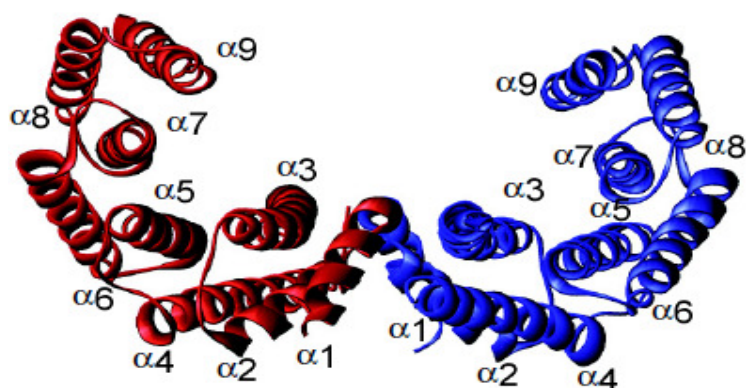


Figura 5: Dímero estrutural da isoforma 14-3-3 σ humana. Cada monômero é formado por 9 alfa-hélices antiparalelas que podem formar dímeros (Benzinger *et al.* 2005).

Em diferentes organismos, de leveduras a mamíferos, já foi demonstrado que as proteínas 14-3-3 são capazes de interagir com mais de 300 proteínas-alvo (Schoonheim *et al.* 2007, Siles-Lucas *et al.* 2008). Em geral, as proteínas às quais as 14-3-3 se ligam possuem motivos de fosfotreonina ou de fosfo-serina, definidos por RSXpSXP e RXXXpSXP (onde R = Arginina, S = Serina, X = qualquer aminoácido, pS = fosfo-serina, e P = prolina; a fosfotreonina – pT – pode substituir a pS), mas há vários casos descritos de proteínas-alvo não-fosforiladas (Bridges & Moorhead 2005).

As atividades das proteínas 14-3-3 em seus alvos específicos podem ser exercidas por indução de mudanças conformacionais, por oclusão física de estruturas proteicas ou através da estruturação de um arcabouço proteico (*scaffolding*) (Bridges & Moorhead 2005). Através destas interações com um amplo repertório de proteínas-alvo e em diferentes contextos celulares, as proteínas 14-3-3 desempenham um papel central em rotas de sinalização eucarióticas, regulando funções biológicas complexas, como o controle do ciclo

celular, a apoptose, a organização do citoesqueleto, a resistência ao estresse, a proliferação e a diferenciação celulares, o desenvolvimento e a longevidade (Darling *et al.* 2005, Thomas *et al.* 2005, Berdichevsky *et al.* 2006, Lottersberger *et al.* 2006, Li *et al.* 2007, Morrison 2009, Yasmin *et al.* 2010).

Entre os organismos com modo de vida parasitário, as proteínas 14-3-3 têm sido mais estudadas em protozoários, como aqueles dos gêneros *Plasmodium* e *Trypanosoma*, mas proteínas de algumas espécies de helmintos parasitas (nematódeos e platelmintos) também já foram investigadas (Siles-Lucas & Gottstein 2003, Chaithirayanon *et al.* 2006). Dentre os helmintos parasitos, espécies dos gêneros *Schistosoma* e *Echinococcus* são os que tiveram as proteínas 14-3-3 mais estudadas, embora, até o momento, poucas funções tenham sido atribuídas a elas.

Em *Echinococcus* spp., pelo menos oito genes codificadores de proteínas 14-3-3 já foram identificados, cinco deles em *E. granulosus* e três em *E. multilocularis*. Em *E. granulosus*, três proteínas 14-3-3 correspondentes a isoforma ζ e duas correspondentes a isoforma ϵ . Estas sequências encontram-se acessíveis em um banco de dados público de ESTs do parasito (<http://www.nematodes.org/NeglectedGenomes/Lopho/LophDB.php>).

Existem evidências experimentais do envolvimento das proteínas 14-3-3 com processos potencialmente relevantes para o desenvolvimento do parasito (Siles-Lucas & Gottstein 2003, Siles-Lucas *et al.* 2008). Por exemplo, a 14-3-3 ζ de *E. multilocularis* é expressa em níveis relativamente mais elevados na membrana germinativa, sugerindo que ela contribui para a proliferação de tipo tumoral dos cistos multiloculares do parasito (Siles-Lucas *et al.* 1998, Siles-Lucas *et al.* 2001),

e uma 14-3-3ζ de *E. granulosus* é produzida na glândula rosetal do adulto, sugerindo seu envolvimento em processos secretórios possivelmente associados à fixação do parasito no intestino delgado de hospedeiros definitivos (Siles-Lucas *et al.* 2000).

Há evidências cumulativas em *Echinococcus* spp. de que proteínas 14-3-3 são antígenos com potencial diagnóstico bem como alto potencial vacinal (Siles-Lucas *et al.* 2003, Siles-Lucas *et al.* 2007, Uribe *et al.* 2007, Siles-Lucas *et al.* 2008) o que justificaria uma avaliação imunológica comparativa das diferentes isoformas de 14-3-3 de *E. granulosus*. Em um estudo realizado do efeito da proteína 14-3-3ζ de *E. multilocularis* na produção de óxido nítrico foi demonstrado que a proteína 14-3-3ζ diminui a produção de óxido nítrico por macrófagos ativados, indicando um papel imunomodulador por parte das proteínas 14-3-3 de *Echinococcus* (Andrade *et al.* 2004, Siles-Lucas *et al.* 2008).

As duas isoformas 14-3-3ε de *E. granulosus* foram identificadas em análises proteômicas, estando presentes em protoescolices (Monteiro *et al.* 2010). Além disso, estas duas isoformas foram detectadas em produtos de secreção/excreção de protoescolices em cultura (Virginio *et al.* manuscrito em preparação). Estes estudos sugerem que as proteínas 14-3-3 de *E. granulosus*, parecem desempenhar um papel potencialmente importante na relação parasito-hospedeiro. No contexto geral o conhecimento sobre as proteínas mediadoras de processos moleculares importantes para a interação de parasitos do gênero *Echinococcus* com seus hospedeiros como no caso as proteínas 14-3-3 de *E. granulosus* representam alvos bastante interessantes para diversos estudos.

2. Justificativa e objetivos

Os processos moleculares envolvidos na interação de parasitos do gênero *Echinococcus* com seus hospedeiros são ainda bastante escassos. A maioria dos estudos neste sentido restringe-se à investigação do papel de alguns antígenos em processos de modulação da resposta imune do hospedeiro intermediário (Gottstein *et al.* 2006, Riganò *et al.* 2007, Virginio *et al.* 2007), havendo uma lacuna importante no que diz respeito ao conhecimento sobre os mecanismos moleculares de interação parasito-hospedeiro, não diretamente relacionados à imunidade. Pouco ainda se sabe, por exemplo, sobre mecanismos de adesão e a respeito de rotas de sinalização celular, que são obviamente vitais para o estabelecimento e o desenvolvimento do parasito. Estes mecanismos e rotas medeiam processos de fixação ao hospedeiro e de proliferação e diferenciação celular, fundamentais para o desenvolvimento do parasito ao longo de seu ciclo vital.

Neste contexto, as proteínas 14-3-3 de *E. granulosus* representam alvos bastante interessantes para estudo. Além dos papéis centrais e conservados que estas proteínas desempenham em rotas de sinalização canônicas que coordenam funções celulares essenciais e o próprio desenvolvimento, elas podem, em organismos parasitas como *E. granulosus*, desempenhar algumas funções mais especializadas, no contexto do contato íntimo e de longa duração entre parasito e hospedeiro. Assim, é de fundamental importância a caracterização das proteínas 14-3-3 presentes no metacestódeo de *E. granulosus*, levando a um maior

conhecimento sobre as suas atividades no desenvolvimento e na manutenção do estágio larval patogênico do parasito

Sendo assim, este trabalho tem como objetivos:

1. Clonar e expressar em *E. coli* a 14-3-3ε1 de *E. granulosus* (Eg14-3-3ε1)
2. Otimizar as condições de expressão e solubilização da proteína recombinante em cepas *Escherichia coli*;
3. Produzir a Eg14-3-3ε1 de forma solúvel, pura e em quantidade suficiente para utilização em estudos funcionais.

3. Materiais e métodos

3.1. Cistos hidáticos

Os cistos hidáticos foram coletados de vísceras de bovinos naturalmente infectados, em colaboração com um frigorífico do Rio Grande do Sul. No processamento dos cistos, o líquido hidático foi aspirado assepticamente com o auxílio de seringa, e os protoescólices foram recuperados por sedimentação e lavados com PBS (27 mM KCl; 20 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 100 mM NaHPO₄; pH 7,4) para remoção de contaminantes.

3.2. Preparação de RNA de protoescólices e síntese do cDNA

O RNA foi extraído de 100 µl de protoescólices com TRIzol (Invitrogen) para posterior reação de RT-PCR. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se 300 ng de RNA, com a enzima *SuperScript III RT* e *Oligo dT Primer* do kit *GeneRacer* (Invitrogen).

3.3. Amplificação da sequência-alvo e clonagem nos vetores de expressão

A sequência codificadora da isoforma 14-3-3ε1 de *E. granulosus* utilizada nesse estudo foi obtida do banco de dados públicos lophoDB (<http://www.nematodes.org/NeglectedGenomes/Lopho/LophDB.php>) onde seu *cluster* está depositado sob a identificação de EGC00123, sendo que foi gerado a partir de 1 EST derivada de bibliotecas de protoescólices (Fernández *et al.* 2002).

Para clonagem e expressão na forma de fusão com GST, a sequência codificadora de 14-3-3ε1 de *E. granulosus* foi amplificada por PCR com os iniciadores F1 (5'-GGTCGTTATGTCTTCTCTCAGT-3') e R1 (5'-CTCCGACATTTCTTCATTTA-3'). Esses iniciadores continham nucleotídeos específicos para amplificação da sequência-alvo e mais 25 nucleotídeos de homologia com o vetor pGEX-TEV, construído em nosso laboratório (Vargas *et al.* 2009) a partir de modificação do vetor de expressão pGEX-4T1 (GE Healthcare), para introdução da sequência codificadora do sítio de clivagem da protease de TEV. Os produtos da PCR foram usados como molde para uma segunda PCR, com iniciadores contendo uma região adicional de 25 nucleotídeos de homologia com vetor.

Para clonagem e expressão com cauda de histidina, a sequência codificadora de 14-3-3ε1 de *E. granulosus* foi amplificada por PCR com os iniciadores F2 (5'-ATGTCTTCTCTCAGTAAGCGCGAG-3') e R2 (5'-ATCGGCTTTCGGCGGTTTC-3'). Esses iniciadores continham nucleotídeos específicos para amplificação da sequência-alvo e mais 35 nucleotídeos de homologia com o vetor pET-26b.

A clonagem da sequência codificadora da Eg14-3-3ε1 em cada vetor foi feita através do método de recombinação homóloga *in vivo* (Parrish *et al.* 2004). O vetor pGEX-TEV foi linearizado por clivagem com endonuclease de restrição *XhoI* e o vetor pET-26b com a endonuclease de restrição *EcoRI* e defosforilados com a enzima SAP. Os vetores clivados foram purificados a partir de gel de agarose utilizando o *kit* de purificação de DNA GFX (GE Healthcare). Para a clonagem em pGEX-TEV foi utilizadas *E. coli* KC8 e, para clonagem em pET-26b foi utilizada *E.*

coli DH5 α . As células bacterianas foram transformadas com 50 ng de cada vetor linearizado e 50 ng do produto de PCR a ser clonado em 25 μ l de tampão KCM 2x (200 mM KCl; 60 mM CaCl₂; 100 mM MgCl₂). Após choque térmico, as células foram incubadas em 1 ml de meio LB (Luria Bertani) a 37°C por 1 h, e semeadas em meio seletivo com antibióticos. A identificação dos plasmídeos recombinantes foi realizada por PCR de colônia utilizando os iniciadores específicos dos vetores. A extração de DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina (Sambrook & Russel, 2001). O clone utilizado para posterior expressão foi sequenciado utilizando o *Kit Dyenamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences), em sequenciador automático MEGABACE 1000, conforme manual do fabricante.

3.4. Expressão da proteína recombinante

Os plasmídeos recombinantes obtidos da clonagem em pGEX-TEV foram utilizados para transformação em células de *E. coli* BL21 Codon Plus RIL, BL21 Star (DE3), BL21 pLysE (DE3), BL21 Codon Plus RP e Rosetta (DE3) pLysS. A expressão da proteína recombinante em fusão com a GST foi induzida com IPTG nas concentrações finais de 0,1 mM e 0,5 mM, em tempos de 3 e 16 h sob agitação, e com temperaturas de 37°C, 28°C, 23°C e a 20°C. Os plasmídeos recombinantes obtidos da clonagem em pET-26b foram utilizados para transformação em células de *E. coli* BL21 Codon Plus RIL (DE3). A expressão da proteína recombinante foi induzida com IPTG nas concentrações finais de 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM, em tempos de 3 e 16 h sob agitação, na temperatura de 30°C. A expressão das proteínas recombinantes foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS 12%.

3.5. Solubilização de proteína recombinante

Após a expressão, as células foram submetidas a processos de solubilização. Foram utilizados triton X-100 nas concentrações de 0,5%, 0,75%, 1%, 1,5% e 2%, tween nas concentrações de 0,5%, 1% e 1,5% e sarcosil nas concentrações de 0,5%, 0,75%, 1%, 1,25% e 1,5%. A solubilização da proteína recombinante foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS 12%.

3.6. Purificação da proteína recombinante fusionada a GST

A fração solúvel foi incubada com a resina glutationa-Sepharose 4B (GE Healthcare) para a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade. Para a eluição da proteína foram utilizados os tampões:

- 20 mM Glutathione reduzida e 50 mM Tris-HCl - pH 8,0;
- 20 mM Glutathione reduzida, 120 mM de NaCl e 100 mM Tris-HCl - pH 8,0;
- 20 mM Glutathione reduzida e 50 mM Tris-HCl - pH 9,0;
- 2% Ácido fórmico e 150 mM de NaCl - pH 2,0
- 75 mM HEPES, 150 mM de NaCl, 5mM de DTT e 0,1% de SDS - pH7,4

A proteína recombinante ligada a resina foi clivada com a protease TEV na proporção 0,01 mg da protease para 0,1 mg da proteína de fusão, a 34°C por 16 horas. A eficiência da clivagem foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida–SDS (SDS-PAGE) 12%.

3.7. Extração da fração periplasmática

Para a extração da fração periplasmática as células foram submetidas a choque osmótico e também choque osmótico associado ao uso de lisozima. Inicialmente as células foram ressuspensas em tampão contendo 20% sacarose 500 µg/ml lisozima, 200mM Tris-HCl pH 7,5 e 1mM EDTA. As células foram incubadas por 15 min a temperatura ambiente com agitação, e posteriormente adicionando igual volume de água destilada gelada e incubadas por mais 15 min em banho de gelo com agitação. A recuperação da fração periplasmática foi por centrifugação a 13.000 g a 4°C.

3.8. Purificação da proteína recombinante fusionada a cauda de histidina

A fração periplasmática foi incubada com 3 diferentes resinas por 30 minutos a 4°C. Foi utilizada a resina HisLink (Promega) de níquel, pré-equilibrada com o tampão 10 mM de imidazol e 100 mM de HEPES pH 7,5, a resina de níquel NI-NTA (QIAGEN), pré-equilibrada com tampão 50mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl e 10 mM de imidazol e a resina de cobalto Talom (Clontech) pré-equilibrada com o tampão 50 mM de fosfato de sódio e 300 mM de NaCl. Após a incubação foi realizada a lavagem das resinas com os mesmos tampões de equilíbrio, mas sem o imidazol com o objetivo de remover as proteínas não aderidas a resina e também possíveis ligações inespecíficas. A proteína foi eluída com tampões contendo diferentes concentrações de imidazol (10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 100 mM e 150 mM). As eluições da proteína foram dialisadas em tampão em tampão 150 mM KCl, 75mM KH₂PO₄, 10% glicerol pH 7,5.

3.9. Análise eletroforética de DNA e RNA em géis de agarose

Para a visualização de DNA e RNA as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 1X (89 mM Tris-HCl; 2,5 mM EDTA e 89 mM Ácido Bórico - pH 8,3) e GelRed. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e fotodocumentadas em aparelho Gel Doc XR (Bio-Rad). O marcador de tamanho molecular utilizado foi o plasmídeo pUC18 clivado com a enzima *Ddel*.

3.10. Análise eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS

Para separação eletroforética de proteínas foi utilizado o sistema de SDS-PAGE na concentração de 12%. As amostras foram resolvidas em um sistema de cubas verticais de eletroforese (BioRad). A eletroforese era realizada em tampão Tris-glicina/SDS (250 mM Tris-Cl; 1,92 mM glicina; 1% SDS; pH 8,3) e com uma voltagem constante de 100V.

Às amostras a serem analisadas foi adicionada 0.2 volume de tampão de amostra 5X com β -mercaptoetanol (625 mM Tris-Cl; 0,2% azul de bromofenol; 2.3% SDS; 10% glicerol; 5% β -mercaptoetanol), para eletroforese em condições redutoras. As amostras foram fervidas a 100°C, por 5 min antes da aplicação no gel.

As estimativas de massa molecular das proteínas foram feitas por comparação com marcador de massa molecular (Promega) aplicado nos géis. Para visualização das proteínas após a eletroforese, os géis foram corados com *coomassie blue* (1% *coomassie brilliant blue* R-250; 10% ácido acético; 50%

metanol) por 20 min a 65°C. O excesso de corante foi removido com ácido acético 10% em banho-maria a 65°C.

4. Resultados

4.1. Clonagem da sequência codificadora Eg14-3-3 ϵ 1

A sequência codificadora da proteína Eg14-3-3 ϵ 1 foi eficientemente amplificada por PCR. Para amplificar a sequência para posterior clonagem em pGEX-TEV, foram gerados amplicons de 818 pb (Figura 6A). Para amplificação da sequência para posterior clonagem em pET-26b foi gerado fragmento de 811pb (Figura 6B).

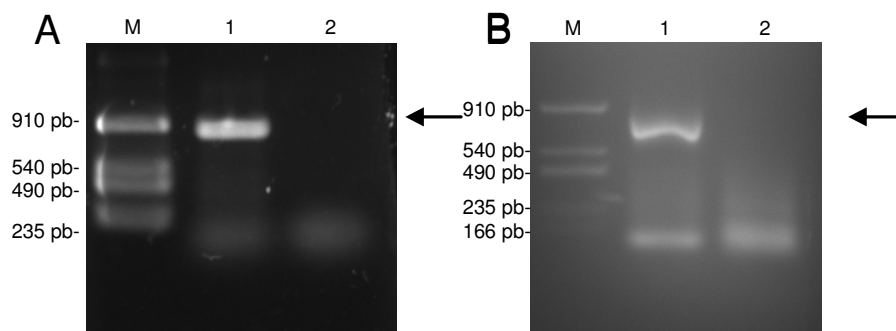


Figura 6: Amplicons gerados para clonagem da sequência codificadora da isoforma Eg14-3-3 ϵ 1 nos vetores pGEX-TEV e pET-26b. Eletroforese em géis de agarose 1%. (A) M: marcador de tamanho molecular; 1: produto da PCR amplificado para clonagem em pGEX-TEV (produto de 818 pb, indicado pela seta); 2: controle negativo – PCR sem DNA. (B) M: marcador de tamanho molecular (pb); 1: produto da PCR amplificado para clonagem em pET-26b (produto de 811 pb, indicado pela seta); 2: controle negativo – PCR sem DNA.

A clonagem por recombinação homóloga no vetor pGEX-TEV resultou em três colônias recombinantes do total de 22 colônias transformantes, confirmadas por PCR de colônia. Nessa reação de PCR, a região amplificada corresponde ao sítio múltiplo de clonagem onde as sequências são inseridas. Plasmídeos recombinantes apresentaram produtos de 1211 pb, enquanto os não

recombinantes apresentaram produtos de 393 pb (Figura 7A). A clonagem por recombinação homóloga no vetor pET-26b resultou em 13 colônias recombinantes do total de 17 colônias transformantes, confirmadas por PCR de colônia. Os plasmídeos recombinantes apresentaram fragmentos de 811 pb (Figura 7B). As clonagens da sequência codificadora da Eg14-3-3ε1 nas fases de leitura corretas para expressão foram confirmadas por sequenciamento.

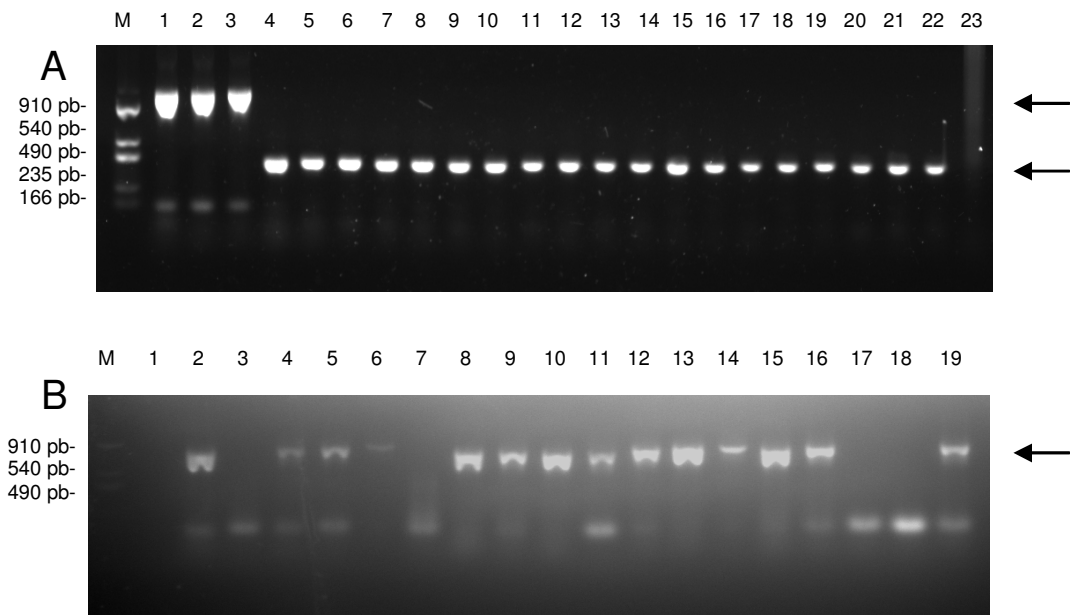


Figura 7: Análise dos clones obtidos para seleção dos recombinantes. Eletroforese em géis de agarose 1%. (A) PCR de colônia a partir da clonagem em pGEX-TEV. M: marcador de tamanho molecular; 1-3 produtos com 1211 pb (indicados pela seta) clonagem da sequência de interesse no vetor de expressão; 4-22: Produtos de 393 pb (indicados pela seta) plasmídeos não recombinantes; 23: controle negativo – PCR sem DNA. (B) PCR de colônia a partir da clonagem em pET-26b. M: marcador de tamanho molecular; 1,3,7,17: plasmídeos não recombinantes; 2, 4-6, 8-16: produtos com 811 pb (indicados pela seta) clonagem da sequência de interesse no vetor de expressão; 18: controle negativo – PCR sem DNA; 19: controle positivo- amplificação do cDNA.

4.2. Expressão da proteína Eg14-3-3ε1 em *E. coli* a partir de pGEX-TEV

Os vetores recombinantes obtidos da clonagem em pGEX-TEV foram utilizados para transformação em células de *E. coli*, para a expressão das proteínas recombinantes. Para todas as diferentes cepas testadas houve a expressão da proteína recombinante em fusão com a GST (massa molecular de 54 kDa). Não houve diferença de expressão utilizando diferentes concentrações de IPTG (0,1 mM e 0,5 mM), assim como não houve diferença utilizando diferentes tempos de indução (3 h e 16 h). Como não houve diferença significativa no nível de expressão da Eg14-3-3ε1 nas diferentes linhagens testadas (BL21 Codon Plus RIL, BL21 Star (DE3), BL21 pLysE (DE3), BL21 Codon Plus RP e Rosetta (DE3) pLysS) (dados não mostrados), optou-se por utilizar a indução com 0,1 mM de IPTG por 3 h a 37°C e a cepa BL21 codon Plus RIL, pois esta linhagem possui os genes que codificam tRNAs para códons Arginina, Isoleucina e Leucina, sendo que 19,4% da sequência da Eg14-4-4ε1 é constituída por esses aminoácidos (Figura 8).

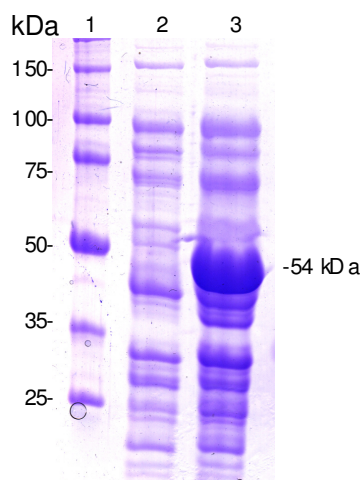


Figura 8: Expressão da proteína Eg14-3-3ε1 em *E. coli*. SDS-PAGE 12% para análise da expressão da proteína recombinante a partir da clonagem em pGEX-TEV. 1: marcador de massa molecular; 2: cultura não induzida; 3 cultura induzida. A massa molecular da proteína em fusão com a GST (54 kDa) está indicada.

Também durante a padronização da expressão da proteína em fusão com a GST, foi verificado que a proteína estava na fração insolúvel em todas as cepas que foram utilizadas na expressão. Com isso foi realizada a expressão da proteína em diferentes temperaturas (28 °C, 23 °C e a 20 °C), mas mesmo com a diminuição da temperatura a proteína ainda se encontrava na fração insolúvel.

4.3. Purificação da proteína recombinante fusionada a GST

Os testes de solubilização mostraram que não foi possível solubilizar a proteína utilizando triton X-100 e tween 20. Mas utilizando sarcosil foi possível solubilizar a proteína com todas as concentrações de sarcosil testadas (Figura 9A). Após a solubilização a fração solubilizada com 0,5% de sarcosil foi incubada com a resina para posterior eluição. O tampão de eluição inicialmente utilizado foi 20 mM Glutathione reduzida e 50 mM Tris-HCl - pH 8,0 mas a proteína não eluiu. Testamos a adição de sal com o tampão 20 mM Glutathione reduzida, 120 mM de NaCl e 100 mM Tris-HCl - pH 8,0 e a mudança de pH com os tampões 20 mM Glutathione reduzida e 50 mM Tris-HCl - pH 9,0 e 2% Ácido fórmico e 150 mM de NaCl, pH 2,0 mesmo assim a proteína não eluiu. Com isso optamos pela clivagem da proteína de fusão a fim de liberar a 14-3-3. Foi utilizada a protease TEV e a clivagem da fusão foi parcial (Figura 9B). Mesmo após a proteína de fusão ter sido clivada a 14-3-3 continuava retida na resina, assim como o restante da fusão e a GST.

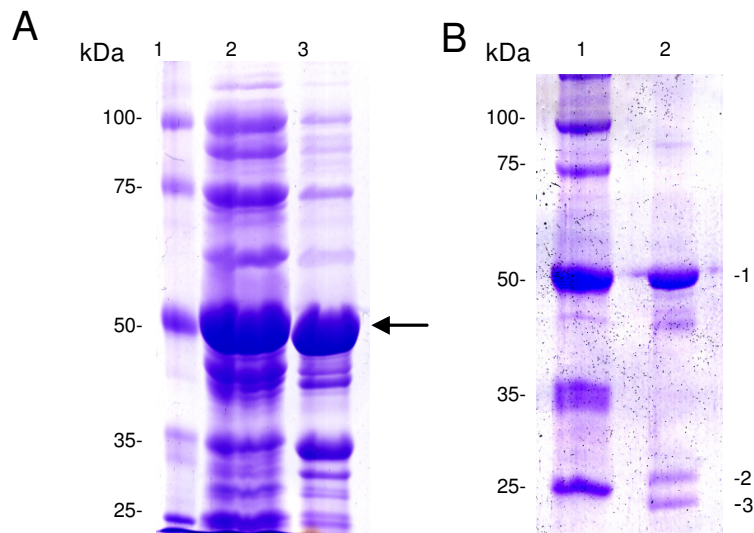


Figura 9: Solubilização e clivagem da proteína recombinante - SDS-PAGE 12%. (A) Solubilização da proteína recombinante. 1: marcador de massa molecular; 2: fração solúvel; 3 fração insolúvel. (B) Clivagem da proteína recombinante. 1: marcador de massa molecular; 2: clivagem da fusão (1: proteína de fusão, 2: 14-3-3 ϵ 1 (28 kDa), 3: GST (26kDa)).

Depois da clivagem eluímos a proteína com o tampão 75 mM Hepes, 150 mM de NaCl, 5mM de DTT e 0,1% de SDS - pH7,4, mas como este tampão é desnaturante não é viável esta eluição pois a proteína será utilizada para ensaios funcionais necessitando estar na forma mais nativa possível. Devido a isso não foi possível a purificar a proteína Eg14-3-3 ϵ 1, estando sua sequência clonada no vetor pGEX-TEV.

4.4. Expressão da proteína Eg14-3-3 ϵ 1 em *E. coli* a partir do vetor pET-26b

Os vetores recombinantes obtidos da clonagem em pET-26b foram utilizados para transformação em células de *E. coli* BL21 Codon Plus RIL (DE3). A massa molecular esperada é de 28 kDa. Não houve diferença de expressão utilizando diferentes concentrações de IPTG (0,1 mM e 0,5 mM), assim como não

houve diferença utilizando diferentes tempos de indução (3 h e 16 h). Como não houve diferença de expressão entre as condições testadas optamos pela indução com 0,1 mM de IPTG por 3 h a 30°C (Figura 10).

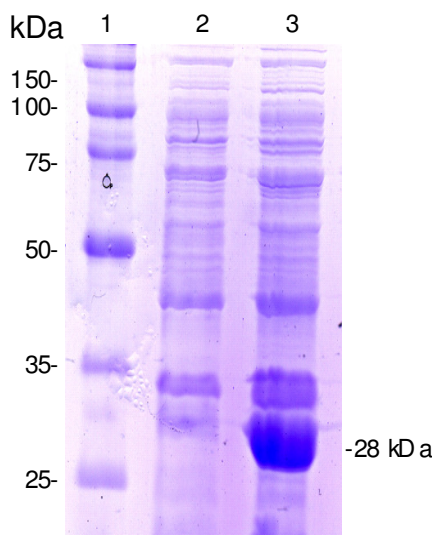


Figura 10: Expressão da proteína Eg14-3-3ε1 em *E. coli*. SDS-PAGE 12% para análise da expressão da proteína recombinante a partir da clonagem em pET-26b. 1: marcador de massa molecular; 2: cultura não induzida; 3 cultura induzida. A massa molecular da proteína com cauda de histidina (28 kDa) está indicada.

4.5. Purificação da proteína recombinante com cauda de histidina

Após a extração da fração periplasmática foi possível visualizar a presença de uma proteína na mesma massa molecular da Eg14-3-3ε1 assim como a presença de outras proteínas (Figura 11 A). O protocolo de choque osmótico demonstrou melhor resultado quando associado a lisozima. A incubação da fração periplasmática com as diferentes resinas demonstrou que as nas três resinas utilizadas (Hislink, NI-NTA, e Talom), houve a ligação da proteína de interesse, bem como outras proteínas da fração periplasmática. No entanto a

resina HisLink, além de ser aquela onde houve ligação mais eficiente da proteína Eg14-3-3ε1 foi a resina que apresentou menos ligações inespecíficas, com isso a resina HisLink foi escolhida para posteriores purificações. Para a eluição da proteína, foram testadas 7 diferentes concentrações de imidazol (10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 100 mM e 150 mM), no entanto a proteína já pode ser eluída da resina com a menor concentração de imidazol utilizada (10 mM) (Figura 11B).

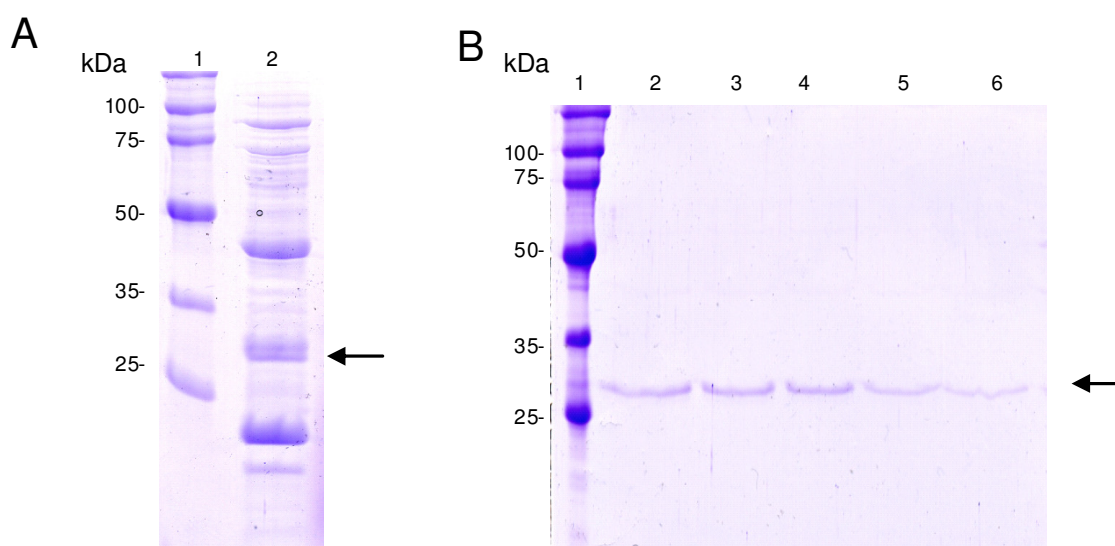


Figura 11: Extração da fração periplasmática e purificação da proteína Eg14-3-3ε1 - SDS-PAGE 12%. (A) Resultado da extração da fração periplasmática. 1: marcador de massa molecular; 2: fração periplasmática. (B) Purificação da Eg14-3-3ε1. 1: marcador de massa molecular; 2-6: Eluições da proteína Eg14-3-3ε1 recombinante (indicada pelas setas).

Foram utilizados 200 ml de cultura para essa purificação sendo obtidos 100 µg de proteína. Para a produção em maior escala da proteína recombinante foi utilizada as mesmas condições inicialmente padronizadas. No entanto foi identificado que a além da proteína de interesse, uma proteína inespecífica com uma massa molecular próxima a 50 kDa estava presente ligada a resina e nas

eluições (Figura 12). A fim de minimizar as ligações inespecíficas foi adicionado ao tampão de equilíbrio 300mM de NaCl também foi adicionado 300 mM de NaCl no tampão de lavagem com o objetivo eluir a proteína inespecífica da resina durante a lavagem. Também utilizamos um filtro Amicon Ultra (Millipore) com um corte de 50 kDa com o objetivo de separar as duas proteínas, no entanto mesmo a proteína de interesse tendo uma massa molecular de 28 kDa as duas proteínas se mantiveram na parte superior do filtro, não sendo possível separá-las.

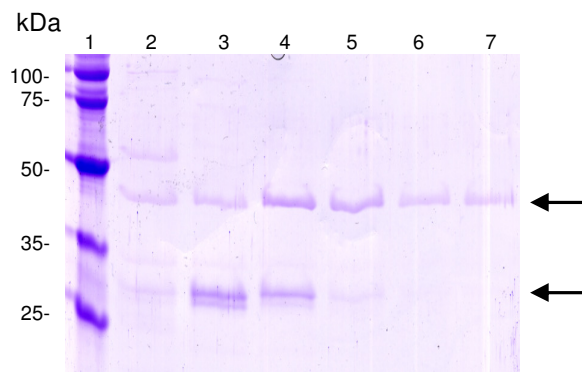


Figura 12: Purificação da proteína Eg14-3-3 ϵ 1 - SDS-PAGE 12%. 1: marcador de massa molecular; 2: resina Hislink após incubação com a fração periplasmática. 3-7: Eluições da proteína (indicada pelas setas).

5. Discussão

A caracterização de proteínas 14-3-3 em *E. granulosus* pode auxiliar na compreensão de aspectos biológicos básicos do parasito e nos mecanismos moleculares utilizados para o desenvolvimento e manutenção do cisto hidático nas vísceras do hospedeiro intermediário por longo período de tempo. As proteínas 14-3-3 já foram diretamente relacionadas a importantes processos celulares em eucariotos, através de interação com diversas moléculas reguladoras. Interagem por exemplo, com domínios citosólicos de fatores de crescimento, são capazes também de atuar como inibidores de apoptose via interação com proteínas reguladoras deste processo (Aitken 2006). Muitos desses padrões de interação descritos também foram observados em organismos do gênero *Echinococcus*. Assim, apesar de interações entre 14-3-3 e moléculas reguladoras, como fatores de crescimento, ainda não terem sido completamente elucidadas, parece que estas associações poderiam estar envolvidas na regulação da proliferação celular, sobrevivência e invasão em *Echinococcus* (Siles-Lucas *et al.* 2008). Deste modo, com base em algumas evidências experimentais, proteínas pertencentes à família 14-3-3 já foram apontadas como moléculas de grande relevância em parasitos, sendo também estudadas em *E. granulosus* e *E. multilocularis*.

No presente estudo, a isoforma proteína 14-3-3 ϵ 1 de *E. granulosus* foi expressada em *E. coli* a partir de sua clonagem em dois diferentes vetores de expressão. As clonagens foram realizadas por recombinação homóloga *in vivo*.

Essa técnica foi escolhida como metodologia para clonar a proteína-alvo devido à sua praticidade e eficiência. É possível, por meio dela, a obtenção de clones com os produtos corretos com boa eficiência a partir de apenas 20 nucleotídeos homólogos ao vetor em cada extremidade (Parrish *et al.* 2004). De forma a aumentar a eficiência da clonagem, nesse estudo foram projetados iniciadores que inseriram 50 nucleotídeos homólogos ao vetor pGEX-TEV e 35 nucleotídeos homólogos ao vetor pET-26b em cada extremidade da sequência alvo ao final da PCR. Outro fator que influencia na eficiência da clonagem é o tratamento do vetor com a enzima SAP, remove grupamentos fosfato e impede a religação do DNA. A desfosforilação das extremidades do plasmídeo após sua linearização aumenta significativamente a eficiência, diminuindo o número de falsos positivos (Oliner *et al.* 1993).

Dois sistemas de expressão baseados em vetores plasmidiais foram utilizados: pGEX-TEV e pET-26b. O vetor pGEX-TEV, tem as mesmas vantagens de outros vetores comerciais da série pGEX, como ter um promotor forte, que permite um elevado nível de transcrição da sequência clonada e ser fortemente regulado para minimizar cargas metabólicas durante a multiplicação da célula hospedeira (Weickert *et al.* 1996). Além disso, expressa a proteína de interesse em fusão com a GST (Smith & Johnson 1988), o que torna possível a sua purificação por cromatografia de afinidade a partir de extratos de *E. coli*. O diferencial da construção realizada foi a adição da sequência codificadora do sítio de clivagem da protease TEV (Kapust & Waugh 1999). Isso viabilizou a liberação da proteína de interesse expressada como fusão com GST por clivagem com a protease TEV em substituição à trombina, normalmente utilizada para clivagem de

proteínas de fusão expressas em vetores comerciais da série pGEX-4T. A TEV é produzida em nosso laboratório, utilizando vetor pRK508 TEV, que contém sua sequência codificadora clonada, o que reduz os custos da produção de proteínas recombinantes. A alta especificidade da protease TEV e sua atividade na presença de inibidores de proteases e sob uma ampla gama de condições torna uma ferramenta ideal para a remoção de tags de fusão a partir de proteínas recombinantes (Fang *et al.* 2007).

A insolubilidade de proteínas recombinantes representa uma dificuldade para estudos estruturais e funcionais de proteínas. Apenas cerca de metade de todas as proteínas recombinantes, mesmo aquelas de origem bacteriana, são solúveis quando expressas em *E. coli* (Christendat *et al.* 2000). A expressão de proteínas em um sistema heterólogo pode conduzir à formação de corpos de inclusão, e conseqüentemente a insolubilidade do produto proteico. Os corpos de inclusão são agregados de proteínas e essa agregação está ligada a conformação e a estabilidade da proteína (Fink 1998). A insolubilidade pode ser sido gerada por inúmeros fatores, como a auto-agregação de intermediários conformacionais e a agregação com os componentes da membrana plasmática durante ou após a lise da célula (Frankel *et al.* 1991).

A expressão da proteína Eg14-3-3 ϵ 1 recombinante estando a sua sequência codificadora clonada em pGEX-TEV se demonstrou insolúvel. Proteínas insolúveis clonadas em vetores que continham a adição do sítio de clivagem da TEV já foram observadas anteriormente (Kurz *et al.* 2006). Sendo que as proteínas foram avaliadas expressas em *E. coli* através de vetores convencionais e vetores com a inclusão do sítio de clivagem TEV. Os resultados

obtidos demonstraram que a inclusão de um sítio de clivagem TEV teve um impacto negativo sobre a solubilidade de todas as proteínas expressas avaliadas.

Devido a insolubilidade da Eg14-3-3ε1 recombinante fez-se necessário o uso de detergente sarcosil para a solubilização, sendo que foi possível observar em torno de 60% da proteína na fração solúvel. O sarcosil é um detergente iônico amplamente utilizado na solubilização de proteínas, (Frangioni & Neel 1993, Tao *et al.* 2010). O uso do sarcosil é capaz de afetar as interações que se formam com os agregados de proteína (Frankel *et al.* 1991).

Após a solubilização da Eg14-3-3ε1 com sarcosil 0,5% e clivagem com a protease TEV, não foi possível purificar a proteína Eg14-3-3ε1 recombinante, porque ela se ligou diretamente à resina glutationa-Sepharose 4B. Com isso, não foi possível eluir a proteína sem utilizar agentes desnaturantes. É possível que possa ter havido alterações na conformação da proteína, pois esta ficou retida na resina mesmo após sua liberação da fusão. Foi possível eluir a proteína utilizando agentes desnaturantes, no entanto a proteína recombinante se destina a estudos funcionais não sendo possível utilizar esta proteína desnaturada. Para a imunização de animais e produção de anti-soros é possível utilizar a proteína desnaturada, mas como não foi possível a separação da Eg14-3-3ε1 da GST, optamos por não utilizar a proteína para imunização. Em nosso laboratório foi realizada a expressão de outras proteínas recombinantes em vetor pGEX-TEV, sendo que as proteínas que estavam na fração solúvel, não necessitando de nenhum tratamento adicional foi possível purificar até 7 mg de proteína por litro de cultura.

Com a dificuldade de purificar a Eg14-3-3ε1 recombinante, estando a sequência codificadora clonada em pGEX-TEV optamos por outra estratégia de purificação. A sequência codificadora da isoforma Eg14-3-3ε1 foi então clonada no vetor de expressão o pET-26b. O pET-26b apresenta a sequência *pelB leader* o que pode proporcionar a exportação das proteínas para o espaço periplasmático. Essa exportação pode promover a conformação apropriada a proteína e proteger a proteína de clivagens proteolíticas (Makrides 1996). A secreção de proteínas recombinantes para o espaço periplasmático tem inúmeras vantagens sobre a expressão de proteínas no citoplasma (Gholipour *et al.* 2010). O espaço periplasmático contém em torno de 4% das proteínas totais celulares, o que facilita sua purificação também o ambiente oxidante do periplasma facilita a dobradura adequada das proteínas (Makrides 1996).

A extração da fração periplasmática por uso de choque osmótico é uma metodologia simples que permite que as proteínas que se encontram no periplasma, sejam liberadas para o meio, este método depende diretamente da permeabilidade da membrana externa (Chen *et al.* 2004) Neste trabalho, a fim de aumentar a liberação das proteínas também usamos enzima lisozima associada ao choque osmótico sendo que há trabalhos que relatam o aumento da extração de proteínas com o uso de lisozima (French *et al.* 1996) e em nosso caso, também foi possível evidenciar que a adição de lisozima melhora a extração da fração periplasmática.

A purificação da proteína Eg14-3-3ε1 recombinante com cauda de histidina foi realizada em resina de níquel, sendo que o pET-26b possui uma cauda de 6

histidinas que possuem afinidade por íons metálicos como níquel e cobalto. Neste trabalho foram testadas três diferentes colunas, sendo duas de níquel e uma de cobalto com a finalidade de verificar qual apresentava menos ligações inespecíficas, bem como qual apresentava melhor ligação da proteína de interesse. A resina com melhor resultado foi a HisLink, portanto essa a escolhida. Essa purificação pode ser feita em uma única etapa, não necessitando a clivagem para a liberação da proteína-alvo. A ligação da Eg14-3-3 ϵ 1 com a resina não foi muito forte, pois a proteína se desliga da resina com concentrações mínimas de imidazol o que impossibilitou o uso do imidazol no tampão de lavagem. Um problema encontrado na metodologia de purificação utilizando resina de níquel, é que essa resina pode reter várias proteínas de *E. coli*, sendo que algumas dessas proteínas já estão bem caracterizadas, como a FKBP-peptidil-prolil-isomerase (Wülfing *et al.* 1994).

Apesar de conseguirmos purificar a proteína Eg14-3-3 ϵ 1 recombinante com um rendimento final de 100 μ g em 200ml de cultura encontramos várias vezes a presença de uma proteína inespecífica que purifica juntamente com a proteína recombinante. Entre as alternativas para resolver este problema estão a expressão da proteína recombinante em outras linhagens de *E. coli* (BL21 Star (DE3), BL21 pLysE (DE3), e Rosetta (DE3)) ou utilizar uma segunda técnica de purificação como a gel filtração, que possa separar as duas proteínas por massa molecular.

A proteína Eg14-3-3 ϵ 1 recombinante será utilizada em diferentes estratégias para a caracterização do repertório de proteínas que interage com a isoforma 14-3-3 ϵ 1 de *E. granulosus*. Para isso serão realizados experimentos de

gel-overlay (Tabunoki *et al.* 2008) e também ensaios de *cross-linking*. Essas técnicas nos permitirão evidenciar possíveis funções desempenhadas por esta proteína no parasito. Experimentos de *gel-overlay* foram utilizados em nosso laboratório para identificar proteínas que interagem com as isoformas 14-3-3 ζ 2 e 14-3-3 ζ 3. E como resultados preliminares foram identificadas algumas proteínas de interação, como as enzimas da via glicolítica (enolase, GAPDH, aldolase, fosfoglicerato-mutase e malato-desidrogenase) e proteínas de resposta a estresse (HSP 20, HSP70 e HSP90). A proteína Eg14-3-3 ϵ 1 recombinante também será utilizada para a imunização de animais com o objetivo de verificar potencial imunogênico da proteína, e também deverá proporcionar a produção de anti-soro policlonal a ser utilizado em experimentos de imunoblot e de imuno-histoquímica, em diferentes componentes do cisto hidático utilizando amostras de líquido hidático, de camada germinativa e de protoescolices com o objetivo de analisar o padrão de expressão da proteína Eg14-3-3 ϵ 1 nativa correspondente.

6. Referências bibliográficas

- ACEVEDO, S., K. TSIGKARI, S. GRAMMENOUDI, and E. SKOULAKIS. 2007. *In vivo* functional specificity and homeostasis of *Drosophila* 14-3-3 proteins. *Genetics* 177: 239-253.
- AITKEN, A. 2006. 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* 16: 162-172.
- ANDRADE, M., M. SILES-LUCAS, E. ESPINOZA, J. PÉREZ ARELLANO, B. GOTTSTEIN, and A. MURO. 2004. *Echinococcus multilocularis* laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages *in vitro*. *Nitric Oxide* 10: 150-155.
- BATTELLI, G. 2009. Echinococcosis: costs, losses and social consequences of a neglected zoonosis. *Vet Res Commun* 33 Suppl 1: 47-52.
- BENZINGER, A., G. POPOWICZ, J. JOY, S. MAJUMDAR, T. HOLAK, and H. HERMEKING. 2005. The crystal structure of the non-liganded 14-3-3sigma protein: insights into determinants of isoform specific ligand binding and dimerization. *Cell Res* 15: 219-227.
- BERDICHEVSKY, A., M. VISWANATHAN, H. HORVITZ, and L. GUARENTE. 2006. *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell* 125: 1165-1177.
- BRIDGES, D., and G. MOORHEAD. 2005. 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE* 2005: re10.
- BUDKE, C., P. DEPLAZES, and P. TORGERSON. 2006. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis* 12: 296-303.
- BUDKE, C., A. J. WHITE, and H. GARCIA. 2009. Zoonotic larval cestode infections: neglected, neglected tropical diseases? *PLoS Negl Trop Dis* 3: e319.
- CHAITHIRAYANON, K., R. GRAMS, S. VICHASRI-GRAMS, A. HOFMANN, G. KORGE, V. VIYANANT, E. UPATHAM, and P. SOBHON. 2006. Molecular and immunological characterization of encoding gene and 14-3-3 protein 1 in *Fasciola gigantica*. *Parasitology* 133: 763-775.
- CHEMALE, G., K. HAAG, H. FERREIRA, and A. ZAHA. 2001. *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Mol Biochem Parasitol* 116: 233-237.
- CHEMALE, G., A. VAN ROSSUM, J. JEFFERIES, J. BARRETT, P. BROPHY, H. FERREIRA, and A. ZAHA. 2003. Proteomic analysis of the larval stage of the parasite *Echinococcus granulosus*: causative agent of cystic hydatid disease. *Proteomics* 3: 1633-1636.

- CHEN, Y.C., CHEN, L.A., CHEN, S.J', CHANG, M.C., CHEN, T.L. 2004. A modified osmotic shock for periplasmic release of a recombinant creatinase from *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal* 19: 211–215.
- CHRISTENDAT, D., A. YEE, A. DHARAMSI, Y. KLUGER, M. GERSTEIN, C. ARROWSMITH, and A. EDWARDS. 2000. Structural proteomics: prospects for high throughput sample preparation. *Prog Biophys Mol Biol* 73: 339-345.
- CORTEZ-HERRERA, E., R. YAMAMOTO, J. RODRIGUES, S. FARIAS, H. FERREIRA, and A. ZAHA. 2001. *Echinococcus granulosus*: Cloning and Functional in Vitro Characterization of an Actin Filament Fragmenting Protein. *Exp Parasitol* 97: 215-225.
- CRAIG, P., D. MCMANUS, M. LIGHTOWLERS, J. CHABALGOITY, H. GARCIA, C. GAVIDIA, R. GILMAN, A. GONZALEZ, M. LORCA, C. NAQUIRA, A. NIETO, and P. SCHANTZ. 2007. Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect Dis* 7: 385-394.
- DARLING, D., J. YINGLING, and A. WYNshaw-BORIS. 2005. Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development. *Curr Top Dev Biol* 68: 281-315.
- DE LA RUE, M. 2008. Cystic echinococcosis in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50: 53-56.
- DOUGHERTY, M., and D. MORRISON. 2004. Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* 117: 1875-1884.
- ECKERT, J., F. CONRATHS, and K. TACKMANN. 2000. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *Int J Parasitol* 30: 1283-1294.
- ECKERT, J., and P. DEPLAZES. 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* 17: 107-135.
- FANG, L., K. JIA, Y. TANG, D. MA, M. YU, and Z. HUA. 2007. An improved strategy for high-level production of TEV protease in *Escherichia coli* and its purification and characterization. *Protein Expr Purif* 51: 102-109.
- FARIAS, L., R. MALGOR, C. CASSARAVILLA, C. BRAGANÇA, and M. DE LA RUE. 2004. Echinococcosis in southern Brazil: efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 46: 153-156.
- FERNÁNDEZ, C., W. GREGORY, P. LOKE, and R. MAIZELS. 2002. Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Mol Biochem Parasitol* 122: 171-180.

- FERREIRA, H., and A. ZAHA. 1994. Expression and analysis of the diagnostic value of an *Echinococcus granulosus* antigen gene clone. *Int J Parasitol* 24: 863-870.
- FINK, A. 1998. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des* 3: R9-23.
- FRANGIONI, J., and B. NEEL. 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem* 210: 179-187.
- FRANKEL, S., R. SOHN, and L. LEINWAND. 1991. The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1192-1196.
- FRENCH, C., MOORE, E.K., WARD, J.M. 1996. Development of a simple method for the recovery of recombinant proteins from the *Escherichia coli* periplasm. *Enzyme and Microbial Technology* 19:332-338.
- FU, H., R. SUBRAMANIAN, and S. MASTERS. 2000. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 617-647.
- GARDINO, A., S. SMERDON, and M. YAFFE. 2006. Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Semin Cancer Biol* 16: 173-182.
- GAVIDIA, C., A. GONZALEZ, W. ZHANG, D. MCMANUS, L. LOPERA, B. NINAQUISPE, H. GARCIA, S. RODRÍGUEZ, M. VERASTEGUI, C. CALDERON, W. PAN, and R. GILMAN. 2008. Diagnosis of cystic echinococcosis, central Peruvian Highlands. *Emerg Infect Dis* 14: 260-266.
- GELPERIN, D., J. WEIGLE, K. NELSON, P. ROSEBOOM, K. IRIE, K. MATSUMOTO, and S. LEMMON. 1995. 14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport and Ras signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11539-11543.
- GHOLOPOUR, A., MOOSAVIAN, A., GALEHDARI, H., MAKVANDI, M., MEMARI H.R., ALVANDI, A. 2010. Cloning and periplasmic expression of peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) protein of *Legionella pneumophila* in *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology* 3: 1-9.
- GOTTSTEIN, B. 2005. [Vaccination against echinococcosis (?)]. *Ther Umsch* 62: 685-693.
- GOTTSTEIN, B., K. HAAG, M. WALKER, J. MATSUMOTO, N. MEJRI, and A. HEMPHILL. 2006. Molecular survival strategies of *Echinococcus multilocularis* in the murine host. *Parasitol Int* 55 Suppl: S45-49.

- GRIMM, E., R. PORTUGAL, M. DE OLIVEIRA NETO, N. MARTINS, I. POLIKARPOV, A. ZAHA, and H. FERREIRA. 2006. Structural analysis of an *Echinococcus granulosus* actin-fragmenting protein by small-angle x-ray scattering studies and molecular modeling. *Biophys J* 90: 3216-3223.
- HAAG, K., P. ZANOTTO, L. ALVES-JUNIOR, R. GASSER, A. ZAHA, and F. AYALA. 2006. Searching for antigen B genes and their adaptive sites in distinct strains and species of the helminth *Echinococcus*. *Infect Genet Evol* 6: 251-261.
- JENKINS, D., T. ROMIG, and R. THOMPSON. 2005. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.-a global update. *Int J Parasitol* 35: 1205-1219.
- KAPUST, R., and D. WAUGH. 1999. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* 8: 1668-1674.
- KURZ, M., N. COWIESON, G. ROBIN, D. HUME, J. MARTIN, B. KOBE, and P. LISTWAN. 2006. Incorporating a TEV cleavage site reduces the solubility of nine recombinant mouse proteins. *Protein Expr Purif* 50: 68-73.
- LI, Y., X. LIN, R. KILANI, J. JONES, and A. GHAHARY. 2007. 14-3-3 sigma isoform interacts with the cytoplasmic domain of the transmembrane BP180 in keratinocytes. *J Cell Physiol* 212: 675-681.
- LIGHTOWLERS, M. 2006. Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. *Parasitology* 133 Suppl: S27-42.
- LORENZO, C., J. LAST, and G. GONZÁLEZ-SAPIENZA. 2005. The immunogenicity of *Echinococcus granulosus* antigen 5 is determined by its post-translational modifications. *Parasitology* 131: 669-677.
- LOTTERSBERGER, F., A. PANZA, G. LUCCHINI, S. PIATTI, and M. LONGHESE. 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins are required for the G1/S transition, actin cytoskeleton organization and cell wall integrity. *Genetics* 173: 661-675.
- MAIZELS, R., and M. YAZDANBAKHS. 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol* 3: 733-744.
- MAKRIDES, S. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 60: 512-538.
- MAMUTI, W., Y. SAKO, N. XIAO, K. NAKAYA, M. NAKAO, H. YAMASAKI, M. LIGHTOWLERS, P. CRAIG, and A. ITO. 2006. *Echinococcus multilocularis*: developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa-subunits. *Exp Parasitol* 113: 75-82.
- MCMANUS, D., W. ZHANG, J. LI, and P. BARTLEY. 2003. Echinococcosis. *Lancet* 362: 1295-1304.

- MHAWECH, P. 2005. 14-3-3 proteins--an update. *Cell Res* 15: 228-236.
- MONTEIRO, K., M. DE CARVALHO, A. ZAHA, and H. FERREIRA. 2010. Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics* 10: 1985-1999.
- MONTEIRO, K., S. SCAPIN, M. NAVARRO, N. ZANCHIN, M. CARDOSO, N. DA SILVEIRA, P. GONÇALVES, H. STASSEN, A. ZAHA, and H. FERREIRA. 2007. Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochim Biophys Acta* 1774: 278-285.
- MORO, P., C. CAVERO, M. TAMBINI, Y. BRICEÑO, R. JIMÉNEZ, and L. CABRERA. 2008. Identification of risk factors for cystic echinococcosis in a peri-urban population of Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 75-78.
- MORO, P., and P. SCHANTZ. 2009. Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis* 13: 125-133.
- MORRISON, D. 2009. The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* 19: 16-23.
- NUNES, C., A. ZAHA, B. GOTTSTEIN, N. MÜLLER, and M. M. SILES-LUCAS. 2004. 14-3-3 gene characterization and description of a second 14-3-3 isoform in both *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*. *Parasitol Res* 93: 403-409.
- OLINER, J., K. KINZLER, and B. VOGELSTEIN. 1993. *In vivo* cloning of PCR products in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* 21: 5192-5197.
- PAWŁOWSKI, Z.S., ECKERT, J., VUITTON, D.A., AMMANN, R.W., KERN, P., CRAIG, P.S., DAR, K.F., DE ROSA, F., FILICE, C. GOTTSTEIN, B., GRIMM, F., MACPHERSON, C.N.L. SATO, N., TODOROV, T., UCHINO, J., VON SINNER, W. WEN, H. (2001). Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment. *in*: ECKERT, J., GEMMELL, M.A., MESLIN, F.X. PAWŁOWSKI, Z.S. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. World Organization for Animal Health and World Health Organization. Paris, France.
- PARRISH, J., T. LIMJINDAPORN, J. HINES, J. LIU, G. LIU, and R. J. FINLEY. 2004. High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by *in vivo* recombination in *Escherichia coli*. *J Proteome Res* 3: 582-586.
- PEDNEKAR, R., M. GATNE, R. THOMPSON, and R. TRAUB. 2009. Molecular and morphological characterisation of *Echinococcus* from food producing animals in India. *Vet Parasitol* 165: 58-65.
- RIGANÒ, R., BUTTARI, B., PROFUMO, E., ORTONA, E., DELUNARDO, F., MARGUTTI, P., MATTEI, V., TEGGI, A., SORICE, M., and SIRACUSANO, A. 2007. *Echinococcus*

granulosus antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun* 75: 1667-1678.

SAMBROOK, J. E., D.W. RUSSEL . 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor. 3.

SCHOONHEIM, P., H. VEIGA, D. C. PEREIRA, G. FRISO, K. VAN WIJK, and A. DE BOER. 2007. A comprehensive analysis of the 14-3-3 interactome in barley leaves using a complementary proteomics and two-hybrid approach. *Plant Physiol* 143: 670-683.

SILES-LUCAS, M., R. FELLEISEN, A. HEMPHILL, W. WILSON, and B. GOTTSTEIN. 1998. Stage-specific expression of the 14-3-3 gene in *Echinococcus multilocularis*. *Mol Biochem Parasitol* 91: 281-293.

SILES-LUCAS, M., M. MERLI, and B. GOTTSTEIN. 2008. 14-3-3 proteins in *Echinococcus*: their role and potential as protective antigens. *Exp Parasitol* 119: 516-523.

SILES-LUCAS, M., M. MERLI, U. MACKENSTEDT, and B. GOTTSTEIN. 2003. The *Echinococcus multilocularis* 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis. *Vaccine* 21: 431-439.

SILES-LUCAS, M., C. NUNES, and A. ZAHA. 2001. Comparative analysis of the 14-3-3 gene and its expression in *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitology* 122: 281-287.

SILES-LUCAS, M., C. NUNES, A. ZAHA, and M. BREIJO. 2000. The 14-3-3 protein is secreted by the adult worm of *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunol* 22: 521-528.

SILES-LUCAS, M., N. URIBE, J. LÓPEZ-ABÁN, B. VICENTE, A. ORFAO, J. NOGAL-RUIZ, A. FELICIANO, and A. MURO. 2007. The *Schistosoma bovis* Sb14-3-3zeta recombinant protein cross-protects against *Schistosoma mansoni* in BALB/c mice. *Vaccine* 25: 7217-7223.

SILES-LUCAS, M. M., and B. GOTTSTEIN. 2003. The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. *Trends Parasitol* 19: 575-581.

SIRACUSANO, A., R. RIGANÒ, E. ORTONA, E. PROFUMO, P. MARGUTTI, B. BUTTARI, F. DELUNARDO, and A. TEGGI. 2008. Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. *Exp Parasitol* 119: 483-489.

SMITH, D., and K. JOHNSON. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31-40.

- TABUNOKI, H., T. SHIMADA, Y. BANNO, R. SATO, H. KAJIWARA, K. MITA, and J. SATOH. 2008. Identification of *Bombyx mori* 14-3-3 orthologs and the interactor Hsp60. *Neurosci Res* 61: 271-280.
- TAO, H., W. LIU, B. SIMMONS, H. HARRIS, T. COX, and M. MASSIAH. 2010. Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *Biotechniques* 48: 61-64.
- THOMAS, D., M. GUTHRIDGE, J. WOODCOCK, and A. LOPEZ. 2005. 14-3-3 protein signaling in development and growth factor responses. *Curr Top Dev Biol* 67: 285-303.
- THOMPSON, R., S. KUTZ, and A. SMITH. 2009. Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. *Int J Environ Res Public Health* 6: 678-693.
- THOMPSON, R., A. LYMBERY, and C. CONSTANTINE. 1995. Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Adv Parasitol* 35: 145-176.
- THOMPSON, R., and D. MCMANUS. 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* 18: 452-457.
- TORGERSON, P., and C. BUDKE. 2003. Echinococcosis-an international public health challenge. *Res Vet Sci* 74: 191-202.
- TORGERSON, P., C. CARMONA, and R. BONIFACINO. 2000. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income. *Ann Trop Med Parasitol* 94: 703-713.
- URIBE, N., M. SILES-LUCAS, J. LÓPEZ-ABÁN, A. ESTEBAN, L. SUAREZ, A. MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, E. DEL OLMO, and A. MURO. 2007. The Sb14-3-3zeta recombinant protein protects against *Schistosoma bovis* in BALB/c mice. *Vaccine* 25: 4533-4539.
- VARGAS, D. M., MONTEIRO, K. M., TEICHMANN, A., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. 2009. Characterization of 14-3-3 ζ Isoform from *Echinococcus granulosus* Larval Stage. XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- VIRGINIO, V., A. HERNÁNDEZ, M. ROTT, K. MONTEIRO, A. ZANDONAI, A. NIETO, A. ZAHA, and H. FERREIRA. 2003. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin Exp Immunol* 132: 309-315.
- VIRGINIO, V., L. TAROCO, A. RAMOS, A. FERREIRA, A. ZAHA, H. FERREIRA, and A. HERNÁNDEZ. 2007. Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. *Parasitol Res* 100: 935-942.

WEICKERT, M., D. DOHERTY, E. BEST, and P. OLINS. 1996. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 7: 494-499.

WÜLFING, C., J. LOMBARDEO, and A. PLÜCKTHUN. 1994. An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. *J Biol Chem* 269: 2895-2901.

YASMIN, L., J. VEESENMEYER, M. DIAZ, M. FRANCIS, C. OTTMANN, R. PALMER, A. HAUSER, and B. HALLBERG. 2010. Electrostatic interactions play a minor role in the binding of ExoS to 14-3-3 proteins. *Biochem J* 427: 217-224.

CURRICULUM VITAE resumido
Aline Teichmann

Dados Pessoais

Nome Aline Teichmann

Nascimento 04/06/1983 - Sobradinho/RS - Brasil

CPF 00190278005

Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia
Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421 salas 204/206
Agronomia - Porto Alegre
91501-970, RS - Brasil

Endereço eletrônico

e-mail para contato : alinet@cbiot.ufrgs.br

e-mail alternativo : ateichmann@bol.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

- 2010** Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Caracterização funcional das proteínas 14-3-3 ϵ 1 e 14-3-3 ϵ 2 de *Echinococcus granulosus*
Orientador: Henrique Bulselmeyer Ferreira
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2009** Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Expressão da proteína 14-3-3 ϵ 1 de *Echinococcus granulosus* em *Escherichia coli*
Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2003 - 2007** Graduação em Farmácia.
Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, Santa Cruz Do Sul, Brasil
Título: Análise do perfil de resistência de *Escherichia coli* uropatogênica aos antibióticos e identificação do gene sul2 em isolados ambulatoriais e hospitalares
Orientador: Andréia Rosane de Moura Valim

Formação complementar

2010 - 2010 Imunolocalização de proteínas.
Universidad Nacional Andrés Bello, UNAB, Chile

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2010 - Atual Vínculo: Estudante de doutorado , Enquadramento funcional: Estudante de doutorado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

2009 - Atual Vínculo: Estudante de mestrado , Enquadramento funcional: Estudante de mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

2008 - 2009 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

Atividades

2008 - 2011 Projetos de pesquisa, Centro de Biotecnologia
Participação em projetos:
Estudo de proteínas expressas em estágios larvais patogênicos de parasitos da classe Cestoda

2008 - Atual Projetos de pesquisa, Centro de Biotecnologia
Participação em projetos:
Estudo de proteínas relacionadas ao estabelecimento e desenvolvimento da forma larval patogênica de *Echinococcus granulosus*

2. Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC

Vínculo institucional

2005 - 2007 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Projetos

2009 - Atual Estudo de proteínas relacionadas ao estabelecimento e desenvolvimento da forma larval patogênica de *Echinococcus granulosus*

Descrição: Convênio de Cooperação Internacional entre o CNPq e a CONICYT (Chile). Processo CNPq 490923/2008-9

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2); Doutorado (1);

Integrantes: Aline Teichmann; Karina Mariante Monteiro; Henrique Bunselmeyer Ferreira (Responsável); Arnaldo Zaha; Karina Rodrigues Lorenzatto; Norbel Galanti; Rodolfo Paredes

2008 - 2011 Estudo de proteínas expressas em estágios larvais patogênicos de parasitos da classe Cestoda

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Integrantes: Aline Teichmann; Karina Mariante Monteiro; Daiane de Vargas; Henrique Bunselmeyer Ferreira (Responsável); Arnaldo Zaha; Karina Rodrigues Lorenzatto

Prêmios e títulos

2007 1º Lugar no Concurso Acadêmico de Pesquisa da Farmácia, Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. de VARGAS, D. M., Monteiro, K.M., TEICHMANN, A., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Binding Proteins from the *Echinococcus granulosus* Larval Pathogenic Stage. In: XXXIX Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu.

XXXIX Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. , 2010.

2. TEICHMANN, A., Monteiro, K.M., de VARGAS, D. M., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Characterization of an *Echinococcus granulosus* 14-3-3 epsilon isoform and identification of its interaction partners In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia.

Livros de Resumos da XXXVIII Reunião Anual da SBBq. , 2009.

3. de VARGAS, D. M., Monteiro, K.M., TEICHMANN, A., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Characterization of 14-3-3zeta2 Isoform from *Echinococcus granulosis* Larval Stage In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2009, 2009, Águas de Lindóia.

Livros de Resumos da XXXVIII Reunião Anual da SBBq. , 2009.

4. TEICHMANN, A., NUNES, L. S., Assunção, L. S., AGRA, H., RENNER, J. D. P., Benitez, L. B., Rocha, M. P., Rieger, A., Valim, A. R. M. Incidência de resistência aos antibióticos apresentada por *Escherichia coli* uropatogênica e identificação do gene sul2 em isolados ambulatoriais e hospitalares In: XVIII Congresso Mundial de Epidemiologia/ VII Congresso Brasileiro de Epidemiologia, 2008, Porto Alegre.

Anais do XVIII Congresso Mundial de Epidemiologia. , 2008.

5. TEICHMANN, A., KAUFFMANN, C, ROCHA, G. A., MORSCH, L. M., MACHADO, E. O., Valim, A. R. M., TODENDI, P. F.

Atenção farmacêutica a paciente hipertenso usuário da Farmácia Escola da UNISC. In: XIII Seminário de Iniciação Científica XII Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão, 2007, Santa Cruz do Sul.

Seminário de Iniciação Científica XII Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão. , 2007.

6. TEICHMANN, A., Assunção, L. S., AGRA, H., RENNER, J. D. P., Rocha, M. P., Benitez, L. B., Rieger, A., Valim, A. R. M.

Avaliação do perfil de suscetibilidade, genotipagem dos isolados de *Escherichia coli* e análise dos dados clínicos de pacientes com infecção do trato urinário In: XIII Seminário de Iniciação Científica e XII Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da UNISC, 2007, Santa Cruz do Sul.

Anais do XIII Seminário de Iniciação Científica e XII Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da UNISC. , 2007.

7. Assunção, L. S., TEICHMANN, A., Rieger, A., RENNER, J. D. P., Benitez, L. B., Rocha, M. P., Valim, A. R. M., AGRA, H.

Diferenciação intra-espécie de isolados de *Escherichia coli* provindos de pacientes ambulatoriais e hospitalizados In: XIII Seminário de Iniciação Científica e XII Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da UNISC, 2007, Santa Cruz do Sul.

Anais do XIII Seminário de Iniciação Científica e XII Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da UNISC. , 2007.

8. Valim, A. R. M., TEICHMANN, A., Lia Gonçalves Possuelo, AGRA, H., NUNES, L. S., Assunção, L. S., Schuch, B. N., Schwalbert, A. M., Goes, J. T., Lima, A. D., Rieger, A., Benitez, L. B., Rocha, M. P.

Genotipagem e caracterização do perfil de suscetibilidade de isolados uropatogênicos de *Escherichia coli* In: XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.

Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2007.

9. Valim, A. R. M., TEICHMANN, A., Assunção, L. S., Schuch, B. N., Schwalbert, A. M., Goes, J. T., Lima, A. D., AGRA, H., RENNER, J. D. P., Rocha, M. P., Benitez, L. B., Rieger, A.

Relação clonal de isolados de *Escherichia coli* resistentes a múltiplos fármacos causadores de infecção do trato urinário In: II Congresso Brasileiro sobre o uso racional de medicamentos, 2007, Florianópolis.

Anais do II Congresso Brasileiro sobre o uso racional de medicamentos. , 2007.

10. TEICHMANN, A., AGRA, H., Rieger, A., RENNER, J. D. P., Benitez, L. B., NUNES, L. S., Rocha, M. P., Valim, A. R. M.

Análise de dados epidemiológicos dos pacientes portadores de ITU e genotipagem de isolados uropatogênicos de *Escherichia coli* In: XII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E XI JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2006, SANTA CRUZ DO SUL.

CD do evento. , 2006.

11. TEICHMANN, A., Benitez, L. B., Rieger, A., RENNER, J. D. P., Rocha, M. P., AGRA, H., Valim, A. R. M.

Análise do perfil de resistência e genotipagem de isolados uropatogênicos de *Escherichia coli* In: X SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, I SIMPÓSIO DE TERAPIA CELULAR E II FÓRUM DE BIOÉTICA. INSTITUTO DE CARDIOLOGIA, 2006, PORTO ALEGRE.

Anais do X SIC. , 2006.

12. TEICHMANN, A., NUNES, L. S., AGRA, H., RENNER, J. D. P., Rocha, M. P., Benitez, L. B., Rieger, A., Valim, A. R. M.

Genotipagem de isolados uropatogênicos de *Escherichia coli* e análise de dados epidemiológicos dos pacientes In: XVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XV FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, I SALÃO UFRGS JOVEM, 2006, Porto Alegre.

Livro de Resumos do XVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XV FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, I SALÃO UFRGS JOVEM. , 2006.

13. TEICHMANN, A., Rocha, M. P., RENNER, J. D. P., AGRA, H., Valim, A. R. M. Caracterização de isolados de *Escherichia coli* uropatogênicos obtidos de pacientes ambulatoriais e hospitalizados In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005, SANTOS.

ANAIS DO XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. , 2005.

14. TEICHMANN, A., Valim, A. R. M.

Padronização de Metodologia para Extração e Amplificação de DNA de *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC) In: XI Seminário de Iniciação Científica e X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2005, Santa Cruz do Sul.

CD do evento. , 2005.