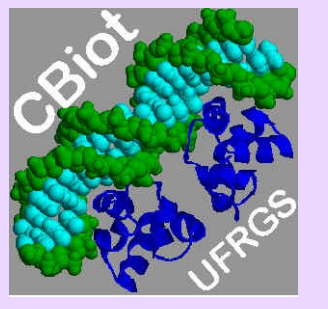


Estudo dos oligômeros recombinantes das subunidades 4 e 5 do antígeno B de *Echinococcus granulosus*



Edileuza Danieli da Silva*, Martín Cancela, Karina M. Monteiro, Arnaldo Zaha (orient)
Centro de Biotecnologia, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

*(edidanieli@cbiot.ufrgs.br)



Introdução

▣ *Echinococcus granulosus*

Helminto parasita cuja fase larval (cisto hidático) causa a hidatidose cística (Fig. 1).

▣ Antígeno B (AgB)

- Proteína imunodominante no cisto hidático.
- Lipoproteína oligomérica de 120-160 kDa (Oriol *et al.*, 1971) formada por subunidades de 8 kDa codificadas por uma família multigênica (Chemale *et al.*, 2001).

- Cinco subunidades foram identificadas: AgB8/1, AgB8/2, AgB8/3, AgB8/4 e AgB8/5.

- A função biológica do AgB ainda não é totalmente compreendida.

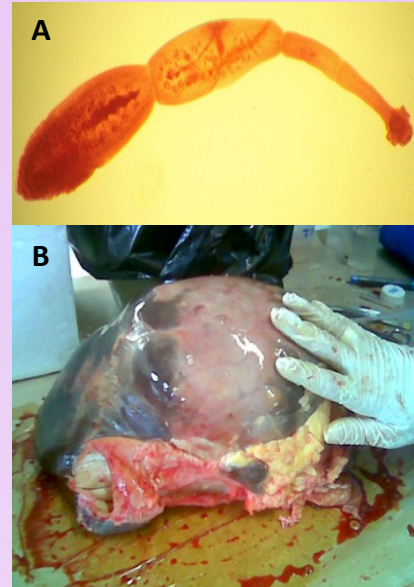


Figura 1. *Echinococcus granulosus*. (A) Adulto, vive no intestino do hospedeiro definitivo, cães e outros canídeos. (B) Cisto hidático, fase larval que se desenvolve nas vísceras dos hospedeiros intermediários, ungulados domésticos e seres humanos

→ Estudos demonstraram que o AgB é capaz de inibir o recrutamento de neutrófilos (Shepherd *et al.*, 1991) e promover uma resposta imune Th2 não-protetora (Riganò *et al.*, 2001), sugerindo um importante papel na relação parasito-hospedeiro.

→ Embora seja a proteína mais estudada na biologia de *E. granulosus*, pouco se sabe sobre a sua estrutura oligomérica e composição de subunidades.

Objetivo

Caracterizar estruturalmente as subunidades AgB8/4 e AgB8/5 recombinantes para possibilitar um melhor entendimento da estrutura do AgB de *E. granulosus*.

Material e Métodos

▣ A sequência codificadora de AgB8/5 foi clonada no vetor pGEX-4T1-TEV

1. Extração de DNA genômico de protozoários de *E. granulosus*

2. PCR com iniciadores específicos cujas extremidades 5' são complementares ao vetor

3. Clonagem, em vetor pGEX-4T1-TEV, por recombinação homóloga utilizando-se a cepa *E. coli* KC8 (Parrish *et al.*, 2004).

▣ A sequência codificadora de AgB8/4 clonada em vetor pET151 foi cedida pelo aluno do PPGBM Daniel Graichen.

▣ Expressão e purificação das subunidades recombinantes

Otimização das condições de expressão: concentração de IPTG e tempo de indução

AgB8/5

AgB8/4

Proteína recombinante expressa em fusão com a glutatona-S-transferase (GST)

Proteína recombinante expressa em fusão com a Green Fluorescent Protein (GFP) e cauda de histidinas

Purificação por cromatografia de afinidade em resina Glutaciona-Sepharose 4B (GE).

Purificação por cromatografia de afinidade em resina de níquel (HisLink-Promega).

Clivagem com a protease TEV

Subunidades recombinantes (rAgB8/4 e rAgB8/5) livres da fusão

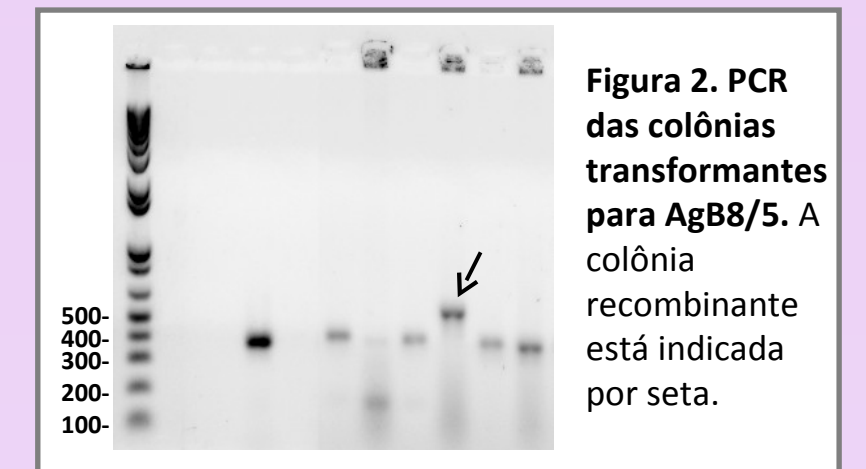
▣ Cross-Linking

- 80 µl de uma solução 2 mg/ml de cada subunidade recombinante foram incubados com 0,1% de glutaraldeído à temperatura ambiente;
- Alíquotas de 10 µL foram removidas em diferentes intervalos de tempo e analisadas em SDS-PAGE 15%.

Resultados e Discussão

▣ Clonagem da sequência codificadora da subunidade AgB8/5

A clonagem da sequência codificadora da subunidade AgB8/5 foi confirmada por PCR das colônias transformantes (Fig. 2) e, posteriormente, por sequenciamento do plasmídeo recombinante.



▣ Expressão e purificação das subunidades rAgB8/4 e rAgB8/5

As subunidades recombinantes 4 e 5 foram expressas em *E. coli* BL21 (DE3) *Codon Plus Ril* e *E. coli* BL21 *Codon Plus Ril* respectivamente, nas condições indicadas na figura 3.

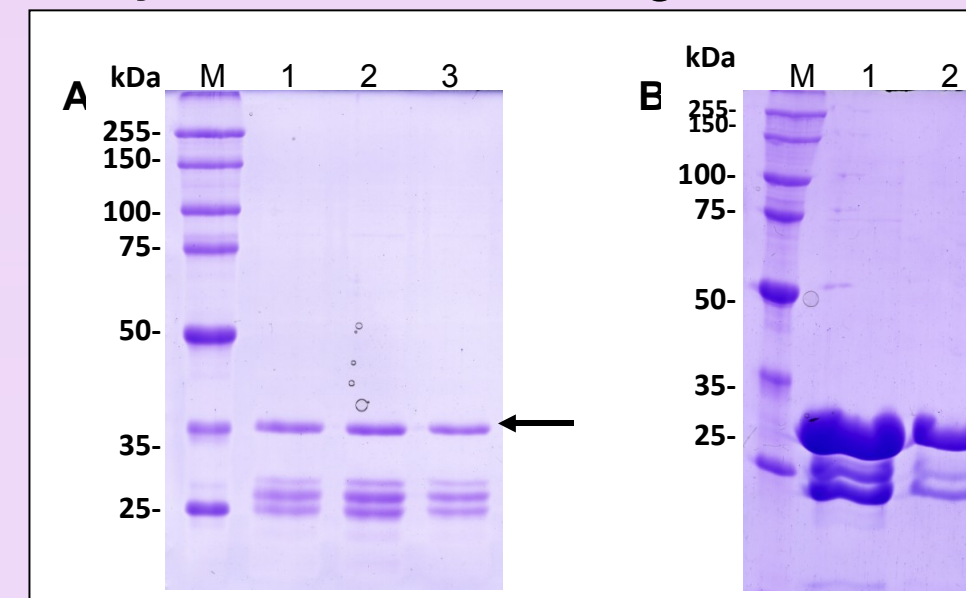


Figura 3. Purificação das proteínas em fusão. (A) rAgB8/4 fusionado a GFP e cauda de histidinas. Expressão induzida com 0,05 mM de IPTG por 4h à 20°C. Purificação em resina de níquel (HisLink). (B) rAgB8/5 fusionado a GST. Expressão induzida com 0,05 mM de IPTG por 3h à 37°C. Purificação em resina glutaciona-sepharose 4B (GE). M: marcador de massa molecular. As setas indicam as bandas correspondentes as proteínas em fusão.

Após, as proteínas recombinantes foram submetidas à clivagem com a protease TEV para liberação da fusão (Fig. 4). O rendimento obtido por litro de cultura foi de 1,65 mg de proteína para rAgB8/4 e 5,3 mg de proteína para rAgB8/5.

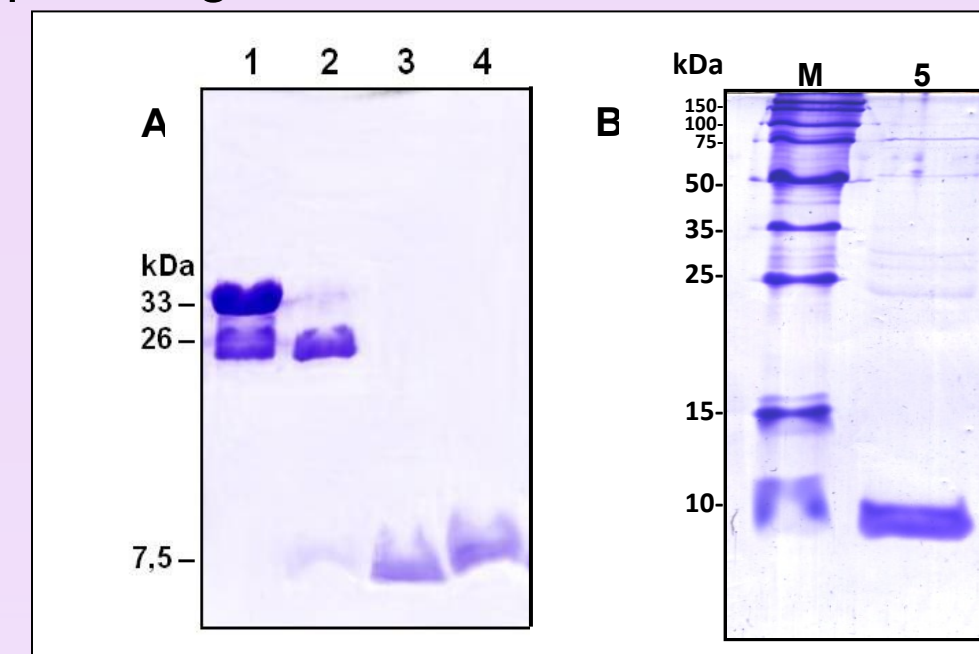


Figura 4. Purificação das proteínas recombinantes livres da fusão. rAgB8/5 (A) e rAgB8/4 (B). Foi feita clivagem com a protease TEV para separação das subunidades recombinantes da sua respectiva proteína em fusão (GFP e GST). A reação de clivagem foi conduzida a 34°C, por 3 h na presença de 1 mM de DTT. (1) rAgB8/5 em fusão; (2) GST; (3 e 4) AgB8/5 recombinante; (5) AgB8/4 recombinante. M: Marcador de massa molecular

▣ Verificação da capacidade agregativa das subunidades recombinantes

As formas monoméricas das subunidades do AgB possuem uma massa molecular de 8 kDa (rAgB8/4) e 7,5 kDa (rAgB8/5). Através da técnica de *cross-linking* foi possível observar a formação de oligômeros de alta massa molecular com o passar do tempo de incubação com glutaraldeído (Fig. 5). Isto demonstra que as subunidades recombinantes se associam espontaneamente, quando em solução, como já descrito para as subunidades rAgB8/1, rAgB8/2 e rAgB8/3 (Monteiro *et al.*, 2007). Entretanto, a cinética de oligomerização foi diferente, oligômeros de rAgB8/5 aparecem nos tempos iniciais de incubação (Fig. 5B). Para rAgB8/4 observa-se claramente a transição monômeros → multímeros → oligômeros (Fig. 5A).

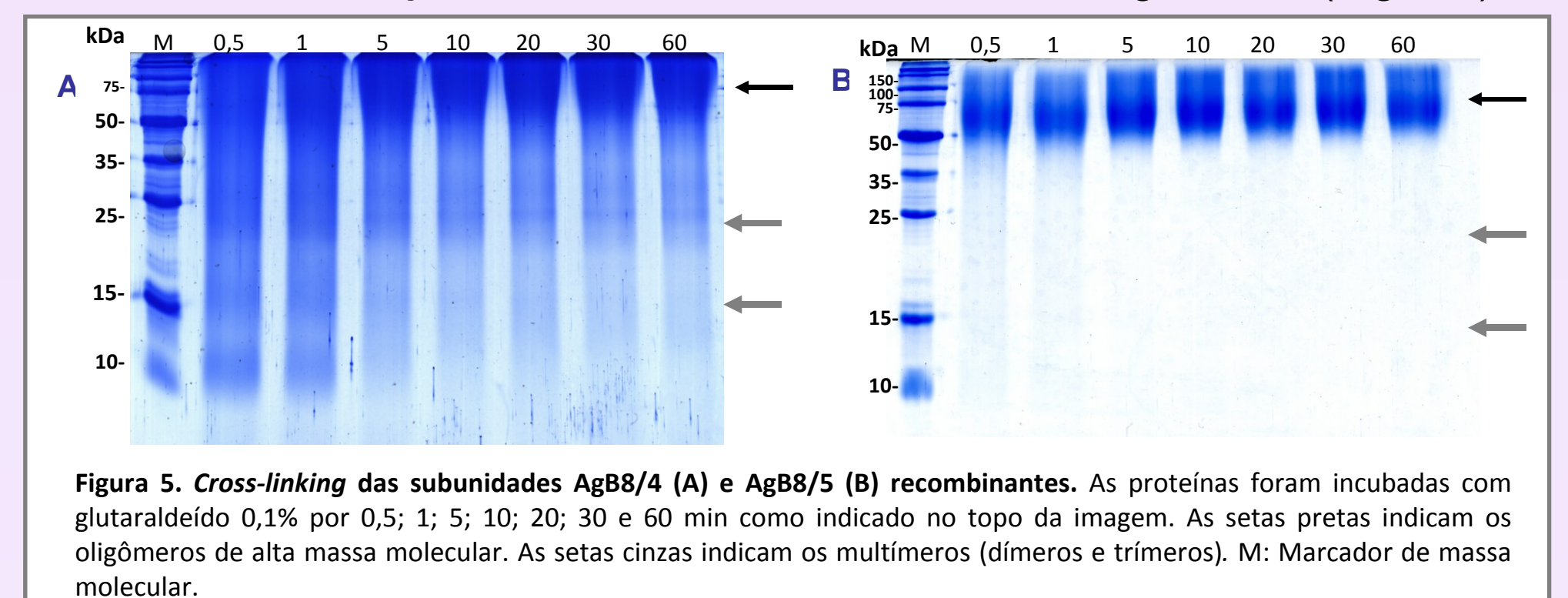


Figura 5. *Cross-linking* das subunidades AgB8/4 (A) e AgB8/5 (B) recombinantes. As proteínas foram incubadas com glutaraldeído 0,1% por 0,5; 1; 5; 10; 20; 30 e 60 min como indicado no topo da imagem. As setas pretas indicam os oligômeros de alta massa molecular. As setas cinzas indicam os multímeros (dímeros e trímeros). M: Marcador de massa molecular.

Monteiro *et al.* (2007) demonstraram que as subunidades AgB8/1, AgB8/2 e AgB8/3 possuem diferenças na sua distribuição de cargas de superfície, e aquelas cujas cargas estão bem separadas (AgB8/2-3) teriam sua oligomerização favorecida em relação aquelas cuja distribuição é difusa (AgB8/1). O mesmo pode estar ocorrendo para as subunidades estudadas neste trabalho, a diferença na distribuição de cargas poderia favorecer uma rápida agregação para rAgB8/5, enquanto rAgB8/4 necessitaria de passos graduais.

Perspectivas

Utilizar as subunidades recombinantes em estudos estruturais através de técnicas de gel filtração, dicroísmo circular, microscopia eletrônica e espalhamento de luz dinâmico.

Referências

- CHEMALE, G. *et al.* *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 116: 233-237 (2001).
MONTEIRO K. M. *et al.* Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1774: 278-285 (2007).
ORIOLO, R. *et al.* Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20: 569-574 (1971).
PARRISH, J. R. *et al.* High-Throughput Cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by *in vivo* Recombination in *Escherichia coli*. *J. Proteome Res.* 3:582-586(2004).
RIGANÒ, R. *et al.* Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect. Immun.* 69: 288-296 (2001).
SHEPHERD, J.C. A protein secreted *in vivo* by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44: p. 81-90, (1991).