

Histonas H2A e SETMAR de *Echinococcus granulosus*: Análise *in silico* da Potencialidade para Secreção e Expressão em *Escherichia coli*

Bruna Valandro Meneghetti¹, Aline Teichmann², Karina Mariante Monteiro¹, Henrique Bunselmeyer Ferreira², Arnaldo Zaha¹.

Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos¹ & Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional², Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

E-mail: bvalandromeneghetti@gmail.com

Introdução

A hidatidose cística é uma doença infecciosa causada pelo estágio larval do helminto parasita *Echinococcus granulosus*. O estabelecimento e a manutenção da infecção envolve a secreção e a exposição de muitas moléculas - possivelmente proteínas histonas e moléculas relacionadas. As histonas H2A de *E. granulosus* foram identificadas no líquido hidático [10] e em produtos de secreção/excreção de protoescolices (estágio pré-adulto) em cultura *in vitro* [12] por análises proteômicas. Histonas também foram descritas presentes em mitocôndrias [4], com propriedades antimicrobianas [1, 7, 8], e são candidatas à vacina contra infecção por *Leishmania* [3, 9].

Objetivos

- Buscar sequências de peptídeo sinal, sequências que indicassem secreção e localização diferente da nuclear em histonas e em proteínas relacionadas à modificação de histonas anotadas no genoma de *E. granulosus*;
- Clonar as sequências codificadoras das proteínas Histona H2A de código GeneDB EgrG_002060700 (**His20607**), a Histona H2A de código GeneDB EgrG_000927700 (**His9277**) e a Histona-lisina N-metiltransferase SETMAR de código GeneDB EgrG_001142300 (**SETMAR**);
- Expressar em *Escherichia coli* e purificar as proteínas recombinantes.

Material e Métodos

Análise do Potencial para Secreção

Foram realizadas buscas de sequências que indicassem secreção e de sequências que indicassem localização diferente do núcleo em histonas e em proteínas relacionadas à modificação de histonas anotadas no genoma de *E. granulosus* (GeneDB, <http://www.genedb.org>). Foram analisadas as sequências de 71 proteínas do genoma de *E. granulosus* depositadas no GeneDB, utilizando-se os programas ProtFun2.2, NetNES1.1, NucPred, SOSUisignal, SecretomeP1.0, SecretomeP2.0, SignalP4.0, TargetP1.1, PrediSi, TMHMM Server v.2.0, MitoProt II - v1.101, WoLF PSORT e iPSORT.

Clonagem das Sequências Codificadoras

A clonagem das sequências codificadoras das proteínas His9277, His20607 e SETMAR foi realizada no vetor plasmidial pGEX-TEV por recombinação homóloga *in vivo*, utilizando-se a cepa de *Escherichia coli* KC8. Foram projetados iniciadores para a amplificação da sequência codificadora de cada proteína correspondente, excetuando a região que continha a sequência codificadora de peptídeo sinal para as proteínas His20607 e SETMAR (conforme os dados obtidos pelos programas SOSUisignal, SignalP4.0, PrediSi e iPSORT, Tabela 1).

Expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*

As cepas de *E. coli* utilizadas para a expressão das proteínas His20607, His9277 e SETMAR foram BL21 Star (DE3), Rosetta (DE3) pLysS, e BL21 Codon Plus Ril (DE3). A expressão foi realizada pela indução com 0,05 mM de IPTG e 0,1 mM de IPTG por 16 horas em temperaturas de 20°C e 23°C.

Purificação das Proteínas Recombinantes

A purificação das proteínas recombinantes em fusão com a GST foi realizada por cromatografia de afinidade com a resina *Glutathione-Sepharose 4B*. As proteínas recombinantes foram liberadas da ligação com a GST por clivagem com a protease TEV e posterior eluição.

Resultados e Discussão

Análise do Potencial para Secreção

As proteínas His9277, His20607 e SETMAR apresentaram resultados positivos em um maior número de programas e, por isso, foram escolhidas para estudos experimentais (Tabela 1). Proteínas secretadas tipicamente possuem uma extensão amino-terminal, denominada de peptídeo sinal [2]. Além disso, a proteína His9277 já foi encontrada presente no líquido hidático de *E. granulosus* por análises proteômicas [10]. A função de histonas e de proteínas relacionadas à modificação de histonas é bem descrita quanto à organização do DNA e regulação da expressão gênica [5, 6]. Entretanto, esses dados de predição podem evidenciar para essas proteínas novas funções e localização distinta do núcleo em outros compartimentos celulares.

Tabela 1: Resultados obtidos a partir de programas para a predição da presença de sequência de peptídeo sinal, de secreção e de localização celular das proteínas His9277, His20607 e SET MAR.

Programas	His20607	His9277	SET metiltransferase
ProtFun 2.2	Metabolismo energético, enzima, resposta imune	Tradução, proteína estrutural	Metabolismo energético, enzima, isomerase, resposta imune
NetNES1.1	-	89-97 sequência rica em leucina (exportação núcleo p/ citoplasma)	-
NucPred	Não nuclear	Não nuclear	Não nuclear
SOSUisignal	Peptídeo sinal (36aa) e 1 hélice transmembrana (23aa)	Proteína solúvel	Peptídeo sinal (20aa)
SecretomeP1.0	Secreção	-	Secreção
SecretomeP2.0	Secreção	-	Secreção
SignalP4.0	Peptídeo sinal	-	-
TargetP1.1	Secreção	-	Secreção
PrediSi	Peptídeo sinal, secreção	-	-
TMHMM Server v.2.0	1 hélice transmembrana	-	-
WoLF PSORT	Secreção	Núcleo	Extracelular
iPSORT	Peptídeo sinal	-	-
MitoProt II - v1.101	-	Exportação p/ mitocôndria	Exportação p/ mitocôndria

Clonagem das Sequências Codificadoras

Para as proteínas His20607 e SETMAR as sequências clonadas correspondiam às sequências codificadoras, excluindo-se a região codificadora do peptídeo sinal devido ao seu caráter hidrofóbico, o que poderia acarretar na insolubilidade das proteínas recombinantes ao serem expressas em *E. coli* (Figura 1).

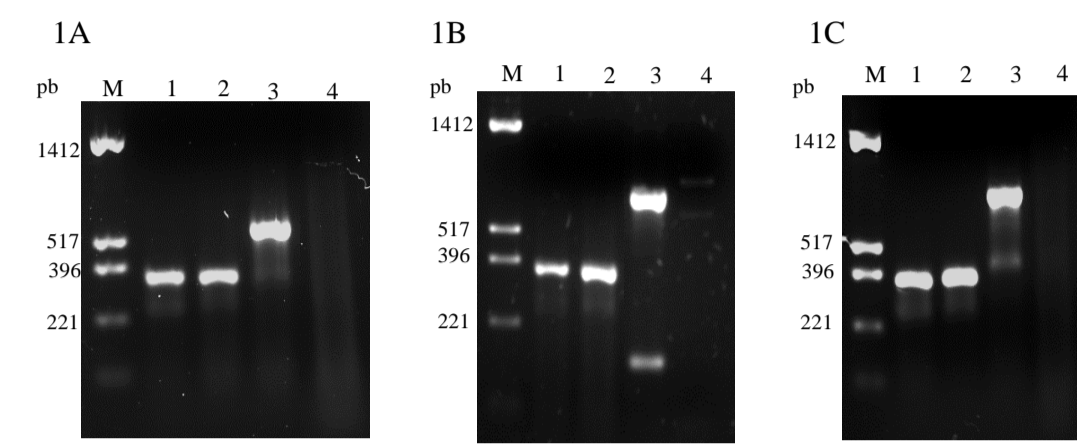


Figura 1: Clonagem das sequências codificadoras das proteínas His20607 (A), His9277 (B) e SETMAR (C) no vetor pGEX-TEV. M - Marcador de tamanho molecular (pb); 1 - Vetor pGEX-TEV íntegro (fragmento de 393 pb); 2 - Colônia não-recombinante (fragmento de 393 pb); 3 - Colônia recombinante (fragmento de 615 pb para His20607, de 786 pb para His9277 e de 855 pb para SETMAR); 4 - Controle negativo da reação de PCR, sem adição de DNA.

Expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*

Após a indução da expressão das proteínas recombinantes, as células bacterianas foram rompidas por sonicação e o lisado foi centrifugado para obtenção da fração solúvel (Figura 2).

Purificação das Proteínas Recombinantes

As proteínas His20607 e SETMAR não puderam ser purificadas devido à presença em suas eluições de proteínas contaminantes de *E. coli* (Figura 3A e 3C). A proteína contaminante para a SETMAR foi identificada por espectrometria de massas como a chaperonina groEL (HSP60) de *E. coli*. Foram realizados testes com lavagens em presença de ATP na tentativa de remover a chaperonina groEL de *E. coli* da associação com a proteína SETMAR, uma vez que ATP é descrito como ligante alostérico da chaperonina GroEL [11]. No entanto, as lavagens com ATP não se mostraram eficientes para a remoção da proteína contaminante para SETMAR, e para His20607, somente na segunda eluição foi possível a obtenção de uma fração com melhor grau de pureza da proteína. Após a clivagem com a protease TEV, não foi possível purificar a proteína recombinante His9277, visto que ela se ligou com alta afinidade à resina *Glutathione-Sepharose 4B*. Foram feitas lavagens da resina utilizando o detergente Triton X-100, a fim de romper possíveis interações hidrofóbicas não específicas entre a resina e a proteína His9277, mas a proteína continuou aderida à resina (Figura 3B).

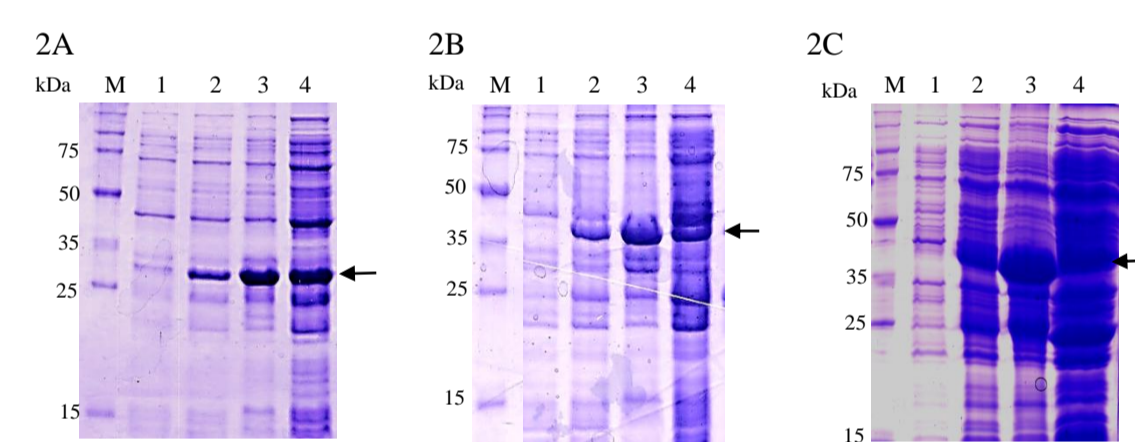


Figura 2: Expressão das proteínas recombinantes His20607 (A), His9277 (B) e SETMAR (C) em *E. coli* BL21. M - Marcador de massa molecular (kDa); 1 - Cultura não-induzida; 2 - Cultura induzida com IPTG; 3 - Fração solúvel de proteínas; 4 - Fração insolúvel de proteínas; 5 - Resina após a fração solúvel. As proteínas His20607 (32 kDa), His9277 (37 kDa) e SETMAR (41 kDa) em fusão com a GST estão indicadas pelas setas.

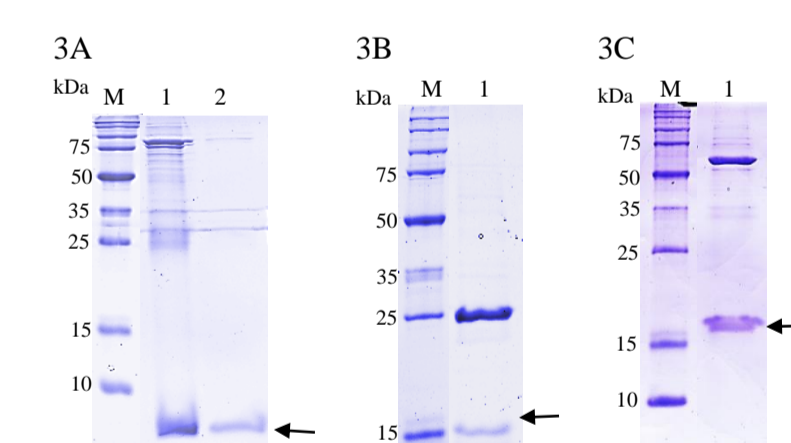


Figura 3: Purificação das proteínas recombinantes His20607 (A), His9277 (B) e SETMAR (C) após clivagem. Em A e C: M - Marcador de massa molecular (kDa); 1 - Eluição; 2 - Eluição. Em B: M - Marcador de massa molecular (kDa); 1 - Resina. As proteínas His20607 (8kDa), His9277 (14kDa) e SETMAR (17 kDa) livres da fusão com a GST estão indicadas pelas setas.

Perspectivas

- Purificar as proteínas His20607, His9277 e SETMAR de *E. granulosus*;
- Utilizar proteínas recombinantes para imunização de animais, a fim de produzir antissoros policlonais;
- Determinar o padrão de expressão espacial das proteínas nativas correspondentes em organelas celulares e em diferentes componentes do cisto hidático (fase larval), por experimentos de imunoblot e de imuno-histoquímica;
- Verificar efeito da exposição dessas proteínas a células do sistema imune quanto à viabilidade celular e à secreção de citocinas.

Referências Bibliográficas

- [1] ANAND, P. et al. A novel role for lipid droplets in the organismal antibacterial response. *Elife*, 2012.
- [2] BRIGGS, M. S. et al. Conformations of signal peptides induced by lipids suggest initial steps in protein export. *Science*, 1986.
- [3] CARRIÓN, J. Mechanisms of immunity to *Leishmania* major infection in mice: the contribution of DNA vaccines coding for two novel sets of histones (H2A-H2B or H3-H4). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2011.
- [4] CHOI, Y. S. et al. Shot-gun proteomic analysis of mitochondrial D-loop DNA binding proteins: identification of mitochondrial histones. *Mol Biosyst*, 2011.
- [5] FISCHLE, W. Talk is cheap—cross-talk in establishment, maintenance, and readout of chromatin modifications. *Genes Dev*, 2008.
- [6] FNU, S. et al. Methylation of histone H3 lysine 36 enhances DNA repair by nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011.
- [7] KIM, H. S. et al. Endotoxin-neutralizing antimicrobial proteins of the human placenta. *J Immunol*, 2002.
- [8] LEE, D. Y. et al. Histone H4 is a major component of the antimicrobial action of human sebocytes. *J Invest Dermatol*, 2009.
- [9] MEDDEB-GARNAOUI, A. et al. Cellular and humoral responses induced by *Leishmania* histone H2B and its divergent and conserved parts in cutaneous and visceral leishmaniasis patients, respectively. *Vaccine*, 2010.
- [10] MONTEIRO, K. M. et al. Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacystode during infection of its intermediate host. *Proteomics*, 2010.
- [11] RADFORD, S. E. GroEL: More than Just a folding cage. *Cell*, 2006.
- [12] VIRGINIO, V. G. et al. Excretory/secretory products from *in vitro*-cultured *Echinococcus granulosus* protoscolices. *Mol Biochem Parasitol*, 2012.

Apoio

