

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS SUBUNIDADES Beta2 e Beta7 DO COMPLEXO PROTEOLÍTICO PROTEASSOMA 20S DE *Biomphalaria glabrata*

Leonardo Alvarez Junger, Renato Graciano de Paula, Henrique Oliveira Frank, Janiele Marinato, Rafaela Guerra Neves, Fabiano Costa Santiliano, Mariana Drummond Costa Ignacchiti, Olavo dos Santos Pereira Júnior

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, UFES. Alto Universitário s/nº Alegre, ES – 29.500-000, olavouspjr@uol.com.br.

Resumo-: O complexo proteolítico proteassoma 26S é responsável por inúmeras funções celulares. Sendo formado por uma estrutura denominada de proteassoma 20S, responsável pela atividade proteolítica e por reguladores, denominados de 19S, que auxiliam no reconhecimento das proteínas a serem degradadas. Assim, esse trabalho teve como objetivo, avaliar a expressão das subunidades Bgbeta2 e Bgbeta7, pertencentes ao complexo 20S do molusco *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário para o parasito *Schistosoma mansoni*, bem como suas homologias com sequências ortólogas. Análises de bioinformática permitiram a identificação de 17 sequências com alto valor de confiabilidade à Bgbeta2 e Bgbeta7, sendo que a análise de expressão permitiu a amplificação de transcritos de aproximadamente 300 e 350 pares de bases para Bgbeta2 e Bgbeta7, respectivamente. As análises de homologia demonstraram alto grau de similaridade entre as sequências Bgbeta2 e Bgbeta7 com seus ortólogos, sendo que a análise de expressão revelou a presença de apenas um transcrito para cada uma das subunidades.

Palavras-chave: *Biomphalaria glabrata*; proteassoma 20S; esquistossomose.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

A esquistossomose é uma doença que afeta mais de 250 milhões de indivíduos, distribuídos em 76 países, na África, Ásia e América (ENGELS et al., 2002). No Brasil, estima-se a existência de 8 a 10 milhões de indivíduos infectados, o que faz desta doença um dos mais sérios problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento (COURA & AMARAL, 2004). Caracterizada como infecto parasitária, é causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, sendo o homem seu hospedeiro definitivo (JANNOTTI-PASSOS et al., 2006).

Com relação ao hospedeiro intermediário, três espécies são caracterizadas como de importância epidemiológica no Brasil - *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*, sendo as três encontradas em território nacional (COURA & AMARAL, 2004).

Assim, o conhecimento biológico e molecular do hospedeiro intermediário pode contribuir para o entendimento de muitos aspectos da relação parasito-hospedeiro. Dentro desse contexto, inúmeras proteases de uma grande variedade de organismos, sobretudo de parasitos e de seus hospedeiros vêm sendo caracterizadas de forma molecular e celular. Com acentuado grau de destaque entre as proteases, foi demonstrado que o complexo proteolítico proteassoma 26S

contribui diretamente para o desenvolvimento do parasito *S. mansoni*, e que seu bloqueio interfere com a capacidade de proliferação do parasito no hospedeiro vertebrado (GUERRA-SÁ et al., 2005).

Pouco se sabe sobre este complexo e sua importância no desenvolvimento do hospedeiro intermediário de *S. mansoni*. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi iniciar a caracterização molecular do complexo proteolítico proteassoma 20S (proteassoma 20S - PC20S) de *B. glabrata*.

Metodologia

Foram realizadas análises *in silico* através da base de dados de EST (*Expressed Sequence Tags*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> com o objetivo de encontrar sequências homólogas à sequências já depositadas neste banco de dados e que codificam para as subunidades *Bgbeta2* (nº de acesso) e *Bgbeta7* (nº de acesso) do complexo proteolítico proteassoma 20S de *Biomphalaria glabrata*. Após a localização destas sequências a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, foi utilizada para realizar o estudo de homologia com outras sequências, empregando como base a sequência predita de aminoácidos. Em seguida realizou-se a tabulação das sequências identificadas como homólogas levando em

consideração os seguintes critérios: valor-E, porcentagem de identidade, porcentagem de positividade, porcentagem de cobertura, tamanho da sequência e organismo pertencente.

As sequências foram então alinhadas através do programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>) e as análises moleculares e filogenéticas foram realizadas utilizando o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 4 (www.megasoftware.net), no qual árvores filogenéticas foram montadas, através do Método de Máxima Parcimônia (MP) para inferências evolutivas.

Extração de RNA total

Para extração de RNA total foram utilizados caramujos do gênero *Biomphalaria* sp. coletados no município de Guaçuí na região Sul do estado do Espírito Santo. Foram utilizadas 100mg de hepatopâncreas de caramujos homogeneizadas através do método do TRIZOLRLS, de acordo com o boletim técnico do fabricante (INVITROGEN).

O material previamente congelado foi transferido para um gral de porcelana e macerado na presença de nitrogênio líquido até a formação de um pó bem fino. Este pó foi então transferido para tubos de microcentrifuga (1,5 mL) contendo 500 µl de TRIZOL, sendo as amostras em seguida homogeneizadas por 15 segundos em Politrón e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida adicionou-se 200 µl de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos, seguido por um passo de centrifugação à 10000rpm/4°C por 10 minutos. Logo após, a fase aquosa foi transferida para outro tubo de microcentrifuga, acrescido de 250 µl de isopropanol. A mistura foi invertida cuidadosamente por três vezes, permanecendo em gelo por 15 minutos.

Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos a 10000 g/4°C. O sobrenadante foi desprezado e o RNA lavado com 1 mL de etanol 70% para a precipitação. Após esta etapa, a mistura foi centrifugada a 10000 g/4°C. Por fim, o RNA foi ressuspenso em 20µl de H₂O DEPC e armazenado a -30°C, até o momento do uso.

RT-PCR

Para confecção do DNA complementar (cDNA) através de reações de RT-PCR, foi utilizado um iniciador OligoDT (20 nt) com auxílio do KIT RevertAid™ H-Minus - 1ST, de acordo com o boletim técnico do fabricante (FERMENTAS). Para um volume final de 20 µL, as reações de RT-PCR continham: 1 µL de *primer* oligoDT (0,5 µg/µl), 1 µl de RNA total, 4 µl de tampão de reação

(5X), 1 µl de inibidor de ribonuclease (20 u/µl), 2 µl de DNTP mix (10 mM), 1 µl de transcriptase reversa (200 u/µl) e 10 µl de H₂O DEPEC. Para síntese da primeira fita de cDNA foram seguidos os seguintes passos de PCR: 70°C/5 minutos, 37°C/5 minutos, 42°C/1hora e 70°C/10 minutos. Após a síntese, as amostras foram guardadas a -30°C.

PCR e análise de expressão das subunidades BgBeta2 e BgBeta7

As reações de amplificação para um volume final de 50µL, contendo: 2 µL de cDNA, 20 pmols dos oligonucleotídeos iniciadores Beta2F: GCCAGTAACATCCACAAC e Beta2R: GCTCCCTGTGTTGAACTAC; Beta7F: TCTCTGATGATGGGCAATG e Beta7R: GTAAACCCAATAGTGACAGG; 1,5 mmols de MgCl₂, 10 mmols de DNTPs, tampão de reação 10X, foram realizadas, conforme descrito abaixo: 40 ciclos de amplificação, composto de 94°C/1minuto, 52°C/1minuto, 72°C/1minuto. O resultado foi avaliado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL). Como controle negativo foi utilizada a proteína ribossomal S19 (S19R 5'-ACGCCCTTGTGGTGTGATC-3' e S19F 5'-TGCTCGCCACTTGTACATTC-3').

Resultados

A tabela 1 mostra a relação dos organismos utilizados para realizar a reconstrução filogenética, o número de acesso das sequências na base de dados do NCBI, assim como, o tamanho das sequências preditas de aminoácidos para as subunidades Bgbeta 2 e Bgbeta 7

Utilizando o programa MEGA (versão 4), foram geradas 1000 árvores filogenéticas, sendo a árvore consenso *bootstrap* adotada para representar a evolução dos táxons. O método utilizado para reconstrução da filogenia foi de máxima parcimônia, empregando o algoritmo de Busca exaustiva (Max-mini Branch-&-bound) e teste de *bootstrap* com 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985). A figura 1 ilustra a história evolutiva referente à subunidade Beta7 enquanto a figura 2 demonstra os resultados referentes à Beta2.

Tabela 1 - Informações referentes às sequências depositadas na base de dados do NCBI escolhidas para realização de inferência evolutiva. Sequências homólogas à Beta2

Nº acesso	Organismo	(aas*)
148234532	<i>Xenopus laevis</i>	277
227116345	<i>Mus musculus</i>	284
8394079	<i>Rattus norvegicus</i>	277
4506195	<i>Homo sapiens</i>	277
50540284	<i>Danio rerio</i>	277
260793493	<i>Branchiostoma floridae</i>	276
20129563	<i>Drosophila melanogaster</i>	272
157128593	<i>Aedes aegypti</i>	280
118791132	<i>Anopheles gambiae</i>	279
109940125	<i>Oryza sativa</i>	272
17380179	<i>Arabidopsis thaliana</i>	247
29841035	<i>Schistosoma japonicum</i>	281
256084819	<i>Schistosoma mansoni</i>	281
118101652	<i>Gallus gallus</i>	277
209730324	<i>Salmo salar</i>	277
66519157	<i>Apis mellifera</i>	277
149635265	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	281

Sequências homólogas à Beta7

Nº acesso	Organismo	Tamanho (aas*)
147906595	<i>Xenopus laevis</i>	199
148694875	<i>Mus musculus</i>	201
38051889	<i>Rattus norvegicus</i>	201
12653475	<i>Homo sapiens</i>	201
157909841	<i>Danio rerio</i>	199
260803067	<i>Branchiostoma floridae</i>	201
24664391	<i>Drosophila melanogaster</i>	201
157136298	<i>Aedes aegypti</i>	206
118789882	<i>Anopheles gambiae</i>	207
46275847	<i>Oryza sativa</i>	212
21593337	<i>Arabidopsis thaliana</i>	204
226471392	<i>Schistosoma japonicum</i>	201
256084599	<i>Schistosoma mansoni</i>	201
45383366	<i>Gallus gallus</i>	201
209733846	<i>Salmo salar</i>	200
66519842	<i>Apis mellifera</i>	207
211939903	<i>Helicoverpa armigera</i>	285

*aas: aminoácidos.

Para confecção das árvores filogenéticas foram selecionadas 17 sequências homólogas para

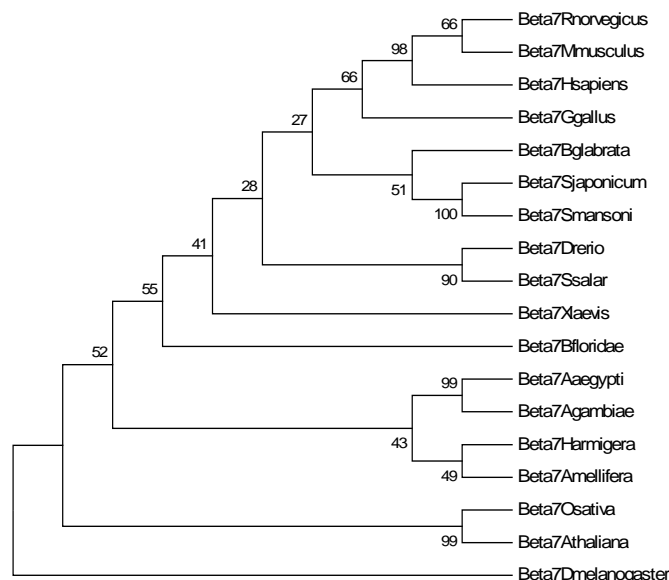


Figura 1 - Relações evolutivas de 18 táxons referentes à subunidade protéica Beta7 do complexo proteolítico proteassoma 20S de *B. glabrata*.

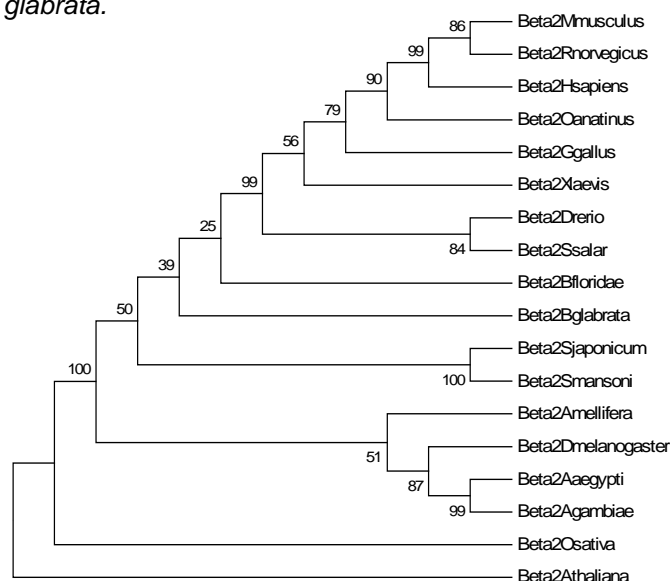


Figura 2 - Relações evolutivas de 18 táxons referentes à subunidade protéica Beta2 do complexo proteolítico proteassoma 20S de *B. glabrata*.

A análise de expressão permitiu a amplificação de dois transcritos de aproximadamente 300 e 350 pares de bases para Bgbeta2 e Bgbeta7, respectivamente. (Figura 3) sendo que a análise de expressão permitiu a amplificação de transcritos

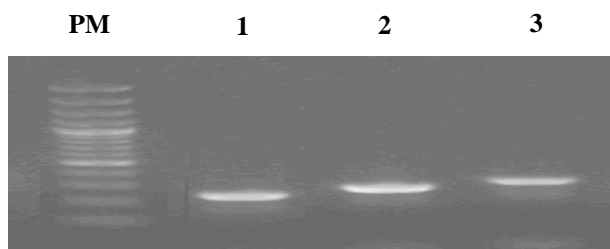


Figura 3. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL). Análise da expressão do transcrito codificando para a subunidade *BgBeta2* - 300pb(1) e *BgBeta7* - 350pb (2). Controle interno (proteína ribossomal S19) (3). (PM) Peso molecular (100pb)

Discussão

Analisando cada uma das sequências homólogas às subunidades protéicas Beta2 e Beta7 foi possível perceber um variável grau de homologia entre as mesmas. Para reconstrução da filogenia foram utilizadas 17 sequências homólogas à Beta2 e 17 sequências homólogas à Beta7. Para análise referente à Beta2 foram analisados 297 sítios, sendo 42 (14%) sítios altamente conservados em todas as sequências analisadas e 167 (56%) sítios variáveis. Observou-se também que a composição de aminoácidos predita em todas as sequências variou, sendo os resíduos de aminoácidos alanina, leucina, valina, lisina e ácido aspártico os mais conservados entre todas as sequências analisadas. Quanto à sequências homólogas à Beta7 foram avaliados 298 sítios, sendo 92 (30%) altamente conservados e 195 (65%) variáveis, sendo os resíduos de alanina, glicina, valina, leucina e treonina os mais conservados. Tanto para as sequências referentes à Beta2 como para as referentes à Beta7 o resíduo de triptofano foi menos conservado quando se comparou as sequências. A tabela 1 mostra a relação dos organismos utilizados para realizar a reconstrução filogenética, o número de acesso das sequências na base de dados do NCBI, assim como, o tamanho das sequências preditas de aminoácidos.

Conclusão

Ferramentas de bioinformática foram eficazes na realização de estudos de homologia entre sequências codificantes para as subunidades *BgAlfa2* e *BgAlfa5* pertencentes ao complexo protéico proteossoma 20S de *Biomphalaria glabrata*, demonstrando ser uma ferramenta muito útil para o caracterização destes organismos.

As análises evolutivas permitiram uma melhor compreensão acerca da conservação entre

diferentes sequências *BgAlfa2* e *BgAlfa5* pertencentes diferentes organismos ao longo da escala evolutiva.

Existe um alto grau de similaridade entre as sequências analisadas, sendo estas muito conservadas dentre todos os organismos analisados. Sendo assim, pode-ser sugerir que estas subunidades desempenham funções essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência destes organismos.

A análise de expressão permitiu a identificação de apenas um transcrito para a subunidade *BgAlfa2* e *BgAlfa5* pertencente à *B. glabrata*.

Referências

CALDEIRA, R. L.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; CARVALHO, O. S. Molecular epidemiology of Brazilian *Biomphalaria*: A review of the identification of species and the detection of infected snails. *Acta Tropica*, Basel, v. 111, p. 1-6. 2009.

CARVALHO, O. S.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; MENDONÇA, C. L. F. G.; CARDOSO, P. C. M.; CALDEIRA, R. L. Moluscos de importância médica no Brasil. Série Esquistossomose nº. 7. Belo Horizonte, Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz, 2005. 52p.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, v. 39, n. 4, p. 783-791, Jul., 1985.
FERNANDES-MATIOLI, F. M. C. Noções de filogenética molecular. *Biológico*. São Paulo, v. 63, n. 1/2, p. 37-38, 2001.

GLICKMAN, M. H.; RAVEH, D. Proteasome plasticity. *FEBS Letters*, v. 579, p. 3214–3223, 2005.

GOLDBERG, A. L., AKOPIAN, T. N., KISSELEV, A. F., LEE, D. H., ROHRWILD, M. New insights into the mechanisms and importance of the proteasome in intracellular protein degradation. *Biological Chemistry*, v. 378, p. 131–140, 1997.

GUERRA-SÁ, R.; CASTRO-BORGES, W.; EVANGELISTA, E. A. B.; KETTELHUT, I. C.; RODRIGUES, V. *Schistosoma mansoni*: Functional proteasomes are required for development in the vertebrate host. *Experimental Parasitology*, v. 109, n. 4, p. 228-236, 2005.

TELES, H. M. S. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo.

XIV INIC

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

X EPG

Encontro Latino Americano
de Pós Graduação

IV INIC Jr

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina
Tropical, Uberaba, v. 38, n. 5, p. 426-432, 2005.