

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Caracterização estrutural de oligômeros de subunidades recombinantes do
antígeno B de *Echinococcus granulosus*

Karina Mariante Monteiro

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

Orientador: Dr. Henrique B. Ferreira

Co-orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre, outubro 2006

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biologia Molecular Estrutural do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e no Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela *Research and Training in Parasitic Diseases at the Southern Cone of Latin America* (RTPD Network - SIDA/SAREC)

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Dr. Henrique B. Ferreira e Dr. Arnaldo Zaha, pela oportunidade de realização deste trabalho e pela dedicação, auxílio, incentivo e amizade durante este período.

Ao Dr. Nilson Zanchin, por tornar esse trabalho possível (e em tempo record!), por sua colaboração fundamental, dedicação e amizade.

À Dra. Nádyá Pesce da Silveira e ao Mateus B. Cardoso, pelo interesse, disposição e dedicação nas primeiras medidas de espalhamento de luz.

Ao Dr. Hubert Stassen e ao Dr. Paulo Gonçalves, responsáveis pela parte de modelagem molecular, pelo interesse e colaboração.

Ao Dr. Marcos Navarro, pela ajuda com os ensaios de cristalização e difração de raios X.

A todos os colegas dos laboratórios 204/206, Alice, Veri, Pati, Mel, Adri, Newton, Tanise, Ana, Terry, Fernanda, Natália e Lari, pela constante colaboração, amizade e por terem tornado esses anos muito mais agradáveis.

Aos colegas do laboratório 210 (LAGEF), em especial ao Paulo, Luíza e Carol, pela colaboração, incentivo e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biologia Molecular do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em especial à Sandra Scapin, pela dedicação, paciência e amizade dispensadas durante três movimentadas semanas.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial à Sílvia Centeno e Luciano Saucedo.

À minha família, por todo amor, apoio, incentivo e dedicação.

Índice

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	5
Resumo	6
Abstract	7
1. Introdução	8
1.1. Espécies do gênero <i>Echinococcus</i>	8
1.1.1. <i>Echinococcus granulosus</i>	10
1.2. A hidatidose cística	17
1.2.1. Diagnóstico, tratamento e controle da hidatidose cística	19
1.3. O antígeno B de <i>E. granulosus</i>	21
1.3.1. A estrutura do AgB	24
1.3.2. Subunidades do AgB	25
2. Justificativa e objetivos	28
CAPÍTULO I	30
Self-assembly and structural characterization of <i>Echinococcus granulosus</i> antigen B recombinant subunit oligomers	31
Abstract	32
1. Introduction	33
2. Material and Methods	34
2.1. Protein expression and purification	34
2.2. Dynamic light scattering measurements	35
2.3. Size-exclusion chromatography	36
2.4. Cross-linking assay	36
2.5. Circular dichroism spectroscopy	36
2.6. Limited proteolysis assay	37
2.7. Fluorescence spectroscopy	37
2.8. Modeling of AgB subunits	38
3. Results and discussion	38
3.1. Self-assembly of AgB8 recombinant subunits	38
3.2. Secondary structure and thermostability of recombinant and purified oligomers	41
3.3. Insights into oligomer conformation	42

3.4. Possible electrostatic and hydrophobic interactions in oligomers formation	45
Acknowledgements	47
References	48
Legends	53
Figures	55
CAPÍTULO II	62
Tentativas de cristalização de oligômeros recombinantes de AgB8/3	62
1. Material e métodos	63
1.1. Produção e purificação de oligômeros de AgB8/3	63
1.2. Separação dos oligômeros de AgB8/3	63
1.3. Cristalização de oligômeros recombinantes de AgB8/3	63
1.4. Difração de raios X	64
2. Resultados	65
2.1. Produção e purificação de oligômeros de AgB8/3	65
2.2. Separação dos oligômeros de AgB8/3	65
2.3. Cristalização de oligômeros recombinantes de AgB8/3	65
2.4. Difração de raios X	66
3. Discussão geral e conclusões	68
4. Perspectivas	72
5. Referências bibliográficas	73
6. Curriculum vitae	87
7. Anexos	92

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

λ	comprimento de onda
Å	angstrom
AgB	antígeno B
AgB8	subunidades de 8 kDa do antígeno B
AgB8/1	subunidade 1 do antígeno B
AgB8/2	subunidade 2 do antígeno B
AgB8/3	subunidade 3 do antígeno B
CD	dicroísmo circular
cDNA	DNA complementar
C-terminal	carboxi-terminal
DLS	espalhamento de luz dinâmico
ELISA	ensaio de imunoadsorção ligado à enzima
GST	glutathiona-S-transferase
HLBP	proteína que liga compostos hidrofóbicos
kDa	quilodalton (1000 daltons)
Nd:YAG	ítrio, alumínio e granada, dopado com neodímio
N-terminal	amino-terminal
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato-salino
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
R_h	raio hidrodinâmico
RT-PCR	transcrição reversa-reação de polimerização em cadeia
SDS	dodecilsulfato de sódio

Resumo

O antígeno B (AgB) de *Echinococcus granulosus* é um dos principais componentes do líquido hidático. O AgB é uma proteína oligomérica de 120-160 kDa composta de subunidades de 8 kDa, que em SDS-PAGE dissocia-se em componentes de 8, 16, 24 e 32 kDa. Embora diferentes subunidades do AgB tenham sido isoladas, pouco se sabe sobre a estrutura da proteína e do seu mecanismo de oligomerização. Neste trabalho foi realizada a caracterização estrutural de homo-oligômeros de três subunidades recombinantes do AgB, AgB8/1, AgB8/2 e AgB8/3, expressadas a partir de seqüências previamente clonadas. Essas subunidades associam-se em homo-oligômeros com características semelhantes às da proteína purificada de líquido hidático, como massa molecular, conteúdo de estrutura secundária, tendência agregativa e termoestabilidade, fazendo deles ferramentas importantes para o estudo da estrutura do AgB. Diferentes graus de estabilidade e compactação foram verificados entre os oligômeros recombinantes, com o oligômero de AgB8/3 apresentando-se mais estável e compacto. Através da modelagem molecular das subunidades do AgB, foi possível calcular a superfície de potencial eletrostático das moléculas e propor um mecanismo de oligomerização envolvendo interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Foram também realizadas tentativas de cristalização de oligômeros de AgB8/3 para ensaios de difração de raios X, e cristais foram obtidos em três condições do *screening* inicial. Estes cristais difrataram à resoluções máximas de 8 Å, não permitindo a coleta de dados estruturais da proteína. Entretanto, estas condições podem ser refinadas para a obtenção de cristais com melhor qualidade.

Abstract

Echinococcus granulosus antigen B is one of the major components of the hydatid fluid. AgB is a oligomeric protein of 120-160 kDa composed by 8 kDa subunits, that in SDS-PAGE dissociates in components of 8, 16 , 24 and 32 kDa. Although different AgB subunits have been isolated, little is known about AgB structure and its oligomerization mechanism. In this work we have performed the homo-oligomers structural characterization of three AgB recombinant subunits, AgB8/1, AgB8/2 and AgB8/3, expressed from previously cloned genes. These subunits self-assemble in homo-oligomers with similar characteristics to that of hydatid fluid purified protein, such as molecular mass, secondary structure content, aggregative tendency and thermostability, making them valuable tools for AgB structure study. Different degrees of stability and compactness were verified between the recombinant oligomers, with the AgB8/3 one showing a more stable and compact structure. Using molecular modelling it was possible to calculate the surface electrostatic potencial of AgB subunits and to propose a mechanism of oligomerization involving electrostatic and hydrophobic interactions. Also crystallization attempts had been carried through with AgB8/3 oligomer to X-ray diffraction, and crystals have been obtained in three conditions of initial *screening*. These crystals diffracted to maximum resolutions of 8 Å, and it was not possible to collect protein structural data. However, these crystallization conditions can be refined in order to obtain crystals of better quality.

1. Introdução

1.1. Espécies do gênero *Echinococcus*

O gênero *Echinococcus* Rudolphi, 1801 pertence ao filo Platyhelminthes, classe Cestoda, família Taeniidae, e como todos os platelmintos, seus membros são animais triploblásticos, acelomados e achatados dorso-ventralmente. Os membros do gênero *Echinococcus* são endoparasitos que possuem um corpo, ou estróbilo, caracteristicamente alongado e segmentado em unidades reprodutivas (proglótides) em vários estágios de desenvolvimento. Na sua porção anterior, apresentam um órgão especializado para fixação no hospedeiro, chamado de escólex. Apesar de serem semelhantes às espécies do gênero *Taenia*, vermes adultos do gênero *Echinococcus* possuem apenas alguns milímetros de comprimento e raramente apresentam mais de 5 proglótides.

Existem seis espécies atualmente reconhecidas no gênero *Echinococcus* (Jenkins *et al.*, 2005), com uma sétima, *Echinococcus shiquicus*, tendo sido recentemente proposta (Xiao *et al.*, 2005). Das seis espécies já reconhecidas, quatro correspondem às espécies clássicas, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus oligarthrus* e *Echinococcus vogeli*. As espécies *Echinococcus equinus* e *Echinococcus ortleppi*, anteriormente conhecidas como linhagem eqüina (G4) e bovina (G5) de *E. granulosus*, respectivamente, foram validadas mais recentemente, com base, principalmente, em características moleculares (Thompson & McManus, 2002).

Como outros tenídeos, as espécies do gênero *Echinococcus* necessitam de dois hospedeiros mamíferos para completar seus ciclos vitais: um

hospedeiro definitivo, que é sempre um carnívoro, no qual se desenvolve o verme adulto; e um hospedeiro intermediário, que podem ser herbívoros ou onívoros, em cujas vísceras se desenvolve a larva (ou metacestódeo). O ciclo vital é indireto, com o adulto hermafrodita e a larva, ou cisto hidático, proliferando assexualmente.

Enquanto a presença do verme adulto de *Echinococcus* no intestino delgado dos hospedeiros definitivos é virtualmente assintomática, o desenvolvimento da fase larval do parasito nas vísceras dos hospedeiros intermediários causa uma doença severa e até mesmo fatal, chamada hidatidose (Thompson, 1995). Das três formas de hidatidose que ocorrem em humanos, a hidatidose cística e alveolar causadas por *E. granulosus* e *E. multilocularis*, respectivamente, são de especial importância devido à sua ampla distribuição geográfica e seu impacto médico e econômico (Eckert & Deplazes, 2004). A hidatidose policística, causada por *E. vogeli* e *E. oligarthrus*, é menos freqüente e restrita às Américas Central e do Sul. Nenhuma infecção em seres humanos causada por *E. shiquicus* foi descrita até o momento (Xiao *et al.*, 2006). Nenhum caso em humanos foi também relatado para a infecção causada por *E. equinus*, e evidências epidemiológicas sugerem que esta espécie pode ser não-patogênica para humanos (Thompson & McManus, 2001). Para *E. ortleppi*, apenas um isolado de paciente humano foi descrito (Bowles *et al.*, 1992), sugerindo que esta espécie possa ser menos patogênica para humanos.

1.1.1. *Echinococcus granulosus*

O verme adulto de *E. granulosus* é uma pequena tênia, com 2 a 7 mm de comprimento (Fig. 1.1). Na sua porção anterior, o adulto apresenta um escólex ou cabeça, que possui quatro ventosas musculares e um rostelo armado com duas fileiras de ganchos, envolvidos na fixação do parasito no hospedeiro. O corpo ou estróbilo é composto de três segmentos ou proglótides (raramente apresentam até 6 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.

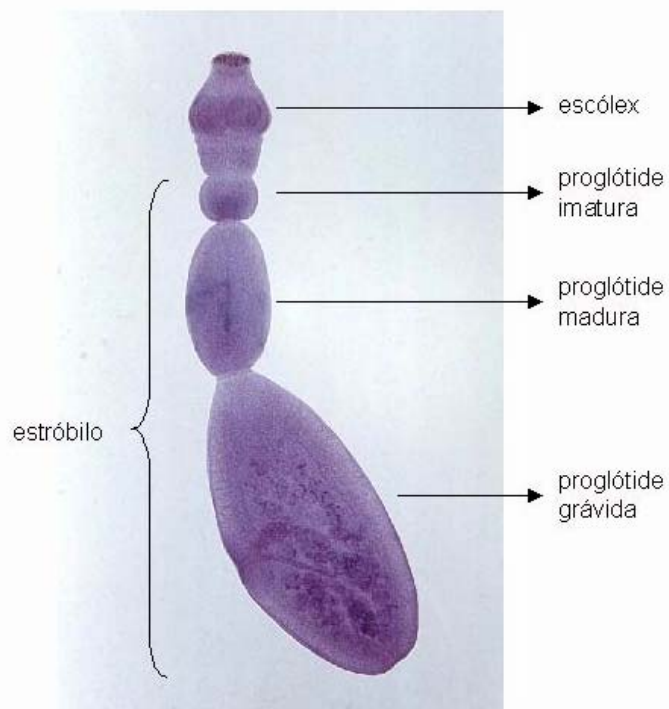


Figura 1.1. Adulto de *Echinococcus granulosus*. O parasito adulto é constituído de um escólex globular, onde encontram-se estruturas de adesão e fixação, e um estróbilo composto por três segmentos (proglótides). O primeiro segmento do estróbilo é a proglótide imatura, o segundo é a proglótide madura e o último segmento é a proglótide grávida, que contém os ovos do parasito.

Os vermes adultos se localizam no intestino delgado do hospedeiro definitivo, principalmente o cão doméstico, fixando-se nas criptas de Lieberkühn. A reprodução do verme adulto pode se dar por autofecundação, uma vez que são hermafroditas, ou por fecundação cruzada. A autofecundação é a forma de reprodução predominante, mas a fecundação cruzada também ocorre (Haag *et al.*, 1998), sendo possível devido ao comportamento agregativo dos vermes adultos no intestino do hospedeiro (Lymbery *et al.*, 1989). Após a fecundação, ocorre a produção dos ovos, podendo a proglótide grávida conter até 1500 ovos (Thompson, 1995). A proglótide grávida se destaca do estróbilo por um fenômeno denominado apólise, e se desintegra no intestino grosso, liberando os ovos juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo.

Quando liberados no ambiente, os ovos são presumivelmente maduros e, portanto, possuem capacidade infectiva (Thompson, 1995). Morfologicamente, o ovo de *E. granulosus* é semelhante ao de outros membros da família Taeniidae, apresentando forma esférica a elipsóide, e medindo entre 30 e 60 μm e 22 e 44 μm , nos seus dois diâmetros. Os ovos contêm um único embrião ou oncosfera, que encontra-se circundado por várias camadas e membranas, sendo o embrióforo a principal camada protetora, espessa e queratinizada ela confere proteção física para a oncosfera. Essa estrutura confere grande resistência ao ovo de *E. granulosus*, o que permite que ele permaneça viável no ambiente mesmo em condições extremas de temperatura e umidade, sendo infectivo por ingestão a várias espécies de hospedeiros intermediários herbívoros ou onívoros, inclusive o homem. Após a liberação no ambiente, os ovos são dispersos pelo vento, pela água e por insetos, e 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 que desintegram o embrióforo, levando à liberação da oncosfera. A oncosfera sofre então um processo de ativação, onde os sais biliares parecem estar envolvidos, e atravessa a parede intestinal com o auxílio de secreções glandulares. Após a penetração na mucosa intestinal, a oncosfera é transportada passivamente via venosa ou linfática, atingindo 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. Cistos hidáticos de *E. granulosus* em humanos se desenvolvem principalmente no fígado (70%) e pulmões (20%), e 10% dos cistos podem ocorrer em outros locais do organismo, como cérebro, musculatura, coração, rins e ossos (Jenkins *et al.*, 2005).

O cisto hidático possui uma estrutura unilocular, subesférica, com uma cavidade interna preenchida por um fluido denominado líquido hidático (Cameron & Webster, 1969). O cisto consiste de uma camada interna, a camada germinativa, responsável pela proliferação assexual do parasito, que é suportada externamente por uma camada elástica, acelular e de espessura variável, a camada laminar. A camada laminar é, por sua vez, circundada por uma camada fibrosa de tecido conjuntivo produzida pelo hospedeiro em resposta à presença do parasito, chamada camada adventícia (Fig. 1.2) (Thompson, 1995).

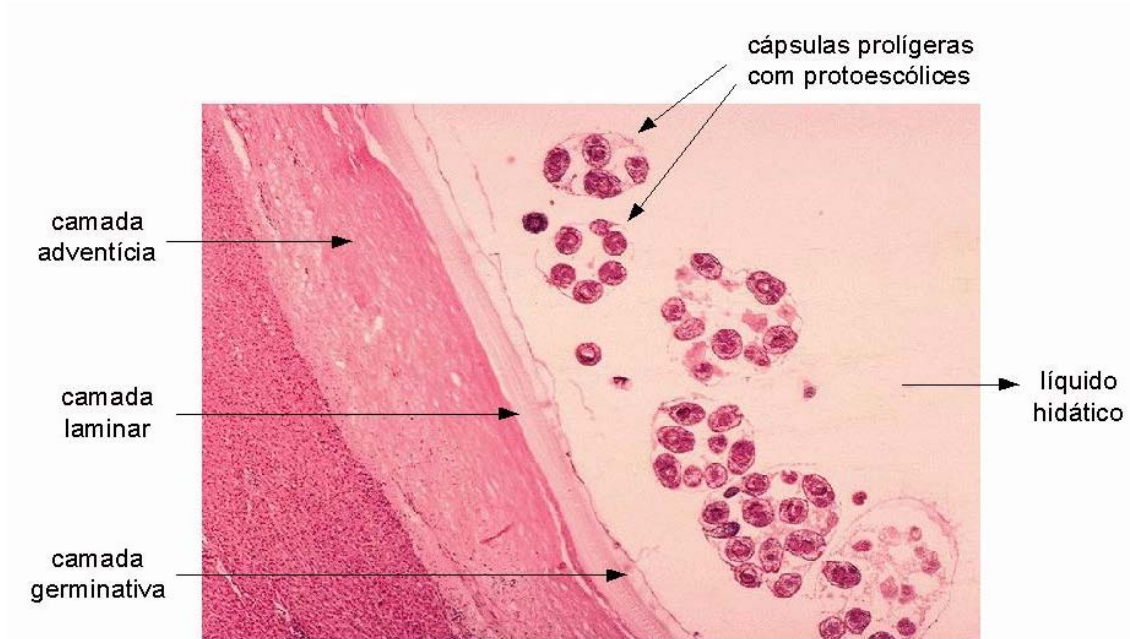


Figura 1.2. Metacestódeo de *E. granulosus*. Corte do cisto hidático mostrando os diferentes componentes do estágio larval do parasito.

A camada germinativa é similar em estrutura ao tegumento do verme adulto, consistindo de um sincício citoplasmático, do qual se projetam microtríquias que penetram na camada laminar. Na camada germinativa encontram-se vários tipos celulares, como células musculares, tegumentares, armazenadoras de glicogênio e células indiferenciadas (Thompson, 1995). Essas células indiferenciadas possuem grande capacidade proliferativa e são responsáveis pela formação das cápsulas prolíferas, as quais se originam como pequenas massas nucleadas que proliferam em direção à cavidade do cisto. As cápsulas prolíferas aumentam, vacuolizam e podem ficar presas por um pedúnculo curto à camada germinativa ou soltar-se no interior da cavidade cística (Thompson, 1995). No lúmen das cápsulas prolíferas, novos processos de proliferação assexual e diferenciação dão origem aos protoescólices. Os protoescólices surgem a partir de evaginações na face interna da membrana da cápsula prolígera, pela proliferação de células inicialmente indiferenciadas.

Nestas evaginações, logo aparecem duas constrições que delimitam no escólex, o rostelo e a região das ventosas. A diferenciação se completa com a formação dos acúleos e a invaginação do escólex para o interior da região somática (Thompson, 1995).

Os protoescólices são estruturas onde as principais regiões presentes na porção anterior do verme adulto já se apresentam diferenciadas. Quando estão no interior do cisto, permanecem num estado dormente, até que a integridade do cisto seja afetada (Thompson & Lymbery, 1990). Quando ocorre a ruptura do cisto no interior do hospedeiro intermediário, espontânea ou induzida por trauma, os protoescólices podem se vesicularizar e formar novos cistos, chamados cistos secundários (Thompson & Lymbery, 1990). O ciclo vital de *E. granulosus* se completa quando protoescólices são ingeridos por um hospedeiro definitivo adequado, onde evaginam, fixam-se à mucosa intestinal e diferenciam-se em vermes adultos (Fig. 1.3) (Thompson, 1995).

A camada laminar é secretada pela camada germinativa e é constituída principalmente de mucopolissacarídeos e de uma pequena fração protéica. Ela confere uma importante proteção ao parasito, uma vez que é capaz de inibir a ativação do sistema complemento do hospedeiro (Díaz *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2000) e regular negativamente a produção de óxido nítrico pelos macrófagos *in vitro* e *in vivo* (Steers *et al.*, 2001).

A camada adventícia é um produto da reação inflamatória do hospedeiro, iniciada nos estágios iniciais de diferenciação da oncosfera (Cameron & Webster, 1969) e caracterizada pela produção de tecido conjuntivo e por uma massiva infiltração celular (Zhang *et al.*, 2003). Se esta reação inicial for suficientemente intensa, pode levar à degeneração e eventual morte do

parasito. Porém, normalmente a reação inflamatória aguda desaparece, deixando uma espessa camada de tecido conjuntivo fibroso envolvendo o cisto, o que corresponde à camada adventícia (Thompson, 1995; Zhang *et al.*, 2003). A camada adventícia pode representar uma barreira de proteção ao hospedeiro, uma vez que parece estar envolvida no controle da liberação de substâncias tóxicas pelo cisto hidático (Janssen *et al.*, 1992).

O líquido hidático possui composição química variável, consistindo numa mistura de componentes bioquímicos, orgânicos e inorgânicos, que vão desde íons até proteínas (Frayha & Haddad, 1980). Além dos componentes do parasito, estão também presentes proteínas séricas do hospedeiro (Coltorti & Varela-Diaz, 1972), representando mais de 90% da quantidade total de proteínas do líquido hidático (Frayha & Haddad, 1980). O mecanismo de penetração destas moléculas no cisto não é totalmente conhecido, mas pode envolver difusão passiva, através de fissuras nas camadas do cisto, endocitose ou outros mecanismos de transporte mais específicos (Shapiro *et al.*, 1992; Thompson, 1995).

O líquido hidático contém produtos de secreção e excreção da camada germinativa e dos protoescólices que são capazes de interagir com o sistema imune do hospedeiro. Apesar de conter moléculas capazes de ativar o sistema complemento e induzir uma resposta celular e humoral (Hammerberg *et al.*, 1977; Zhang *et al.*, 2003), o líquido hidático possui a capacidade de evadir a resposta imune do hospedeiro através de efeitos citotóxicos em macrófagos (Janssen *et al.*, 1997) e neutrófilos (Annen *et al.*, 1981) e da regulação do crescimento de linfócitos B e T (Macintyre *et al.*, 2001).

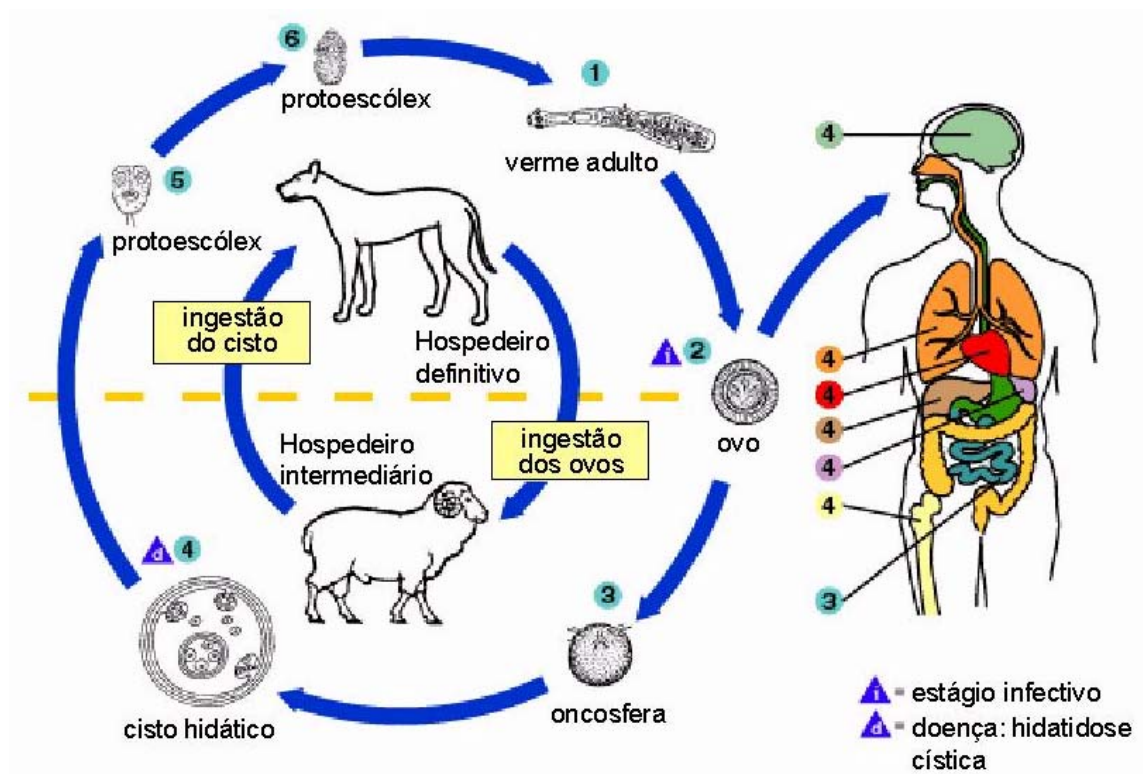


Figura 1.3. Ciclo vital de *E. granulosus*. O verme adulto (1) vive no intestino delgado do hospedeiro definitivo (canídeos). Os ovos (2) são liberados no ambiente juntamente com as fezes do hospedeiro, sendo infectivos para os hospedeiros intermediários (ovinos, bovinos, suínos, cavalos, camelos, humanos, etc.). Ao serem ingeridos pelo hospedeiro intermediário, os ovos liberam a oncosfera (3), que penetra na parede intestinal e é transportada pelo sistema circulatório ou linfático até atingir um órgão, principalmente fígado e pulmões. Neste órgãos, a oncosfera diferencia-se num cisto hidático (4), que aumenta gradualmente de tamanho e produz protoescólices (5) assexualmente. O hospedeiro definitivo contamina-se através da ingestão de vísceras do hospedeiro intermediário contendo cistos do parasito. Após a ingestão, os protoescólices evaginam (6), fixam-se na mucosa intestinal e transformam-se em vermes adultos (1), fechando o ciclo vital do parasito. Modificado do Centro para o Controle e Prevenção de Doenças Infecciosas (www.dpd.cdc.gov)

1.2. A hidatidose cística

A hidatidose cística é a doença causada pelo metacestódeo de *E. granulosus* nos hospedeiros intermediários, entre eles humanos. A hidatidose cística apresenta distribuição cosmopolita, tendo alta prevalência em regiões da Europa, Ásia, África, Austrália e América do Sul (Budke *et al.*, 2006).

No Brasil, a hidatidose cística tem ocorrência praticamente restrita ao estado do Rio Grande do Sul. Todavia, casos de hidatidose policística já foram descritos em estados do norte do Brasil, indicando a presença de outras espécies do gênero *Echinococcus* no país, como *E. vogeli* e *E. oligarthrus* (Rodrigues-Silva *et al.*, 2002; De la Rue *et al.*, 2004).

O Rio Grande do Sul é considerado zona altamente endêmica da hidatidose, que constitui um grave problema de saúde pública, especialmente nos municípios que fazem fronteira com Uruguai e 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.

Uma vez que a presença do verme adulto no hospedeiro definitivo é assintomática (Thompson, 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 conseqüências sócio-econômicas em áreas endêmicas (Schantz *et al.*, 1995; Torgerson, 2003). 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 (Torgerson, 2003). 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, 2003).

As manifestações clínicas da hidatidose resultam do crescimento de uma massa cística ou de reações de hipersensibilidade (Schantz, 1989). 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 (Ammann & Eckert, 1995; Pawlowski *et al.*, 2001; 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 (Werczberger *et al.*, 1979; McManus *et al.*, 2003).

A manutenção do ciclo doméstico da doença se dá através de práticas condenáveis, como a alimentação de cães com vísceras contaminadas com cistos hidáticos, e devido à falta de condições e educação sanitária (Torgerson

& Budke, 2003). Os humanos são considerados hospedeiros acidentais, pois não completam o ciclo biológico do parasito.

1.2.1. Diagnóstico, tratamento e controle da hidatidose cística

O diagnóstico da hidatidose cística é baseado na identificação do cisto através de técnicas de imagem, principalmente ultra-sonografia, tomografia computadorizada, radiologia e ressonância magnética (Pawlowski *et al.*, 2001; Teggi & DiVico, 2002). Entretanto, estes testes são inespecíficos e pouco eficientes no diagnóstico precoce, uma vez que detectam apenas uma lesão cística, que pode corresponder ou não a um cisto hidático. Portanto, a confirmação do diagnóstico é realizada por testes imunodiagnósticos, mais sensíveis e específicos, predominantemente ELISA e *immunoblotting* (Eckert & Deplazes, 2004). O imunodiagnóstico é útil não apenas no diagnóstico primário, mas também no monitoramento de pacientes após o tratamento cirúrgico ou farmacêutico (Pawlowski *et al.*, 2001).

A maioria dos testes imunológicos detecta a presença de anticorpos específicos contra antígenos do parasito no soro de pacientes. O líquido hidático tem sido utilizado como a principal fonte de antígenos para o imunodiagnóstico da hidatidose humana (Ortona *et al.*, 2003). Porém, este extrato apresenta problemas de baixa especificidade e dificuldades de padronização da sua utilização, devido à falta de reprodutibilidade das preparações antigênicas (Zhang *et al.*, 2003). Antígenos purificados do líquido hidático juntamente com antígenos recombinantes e sintéticos de *E. granulosus* estão sendo utilizados na melhoria do imunodiagnóstico da hidatidose, pois conferem maior sensibilidade e especificidade aos testes (Rott *et al.*, 2000;

González-Sapienza *et al.*, 2000; Virginio *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Carmena *et al.*, 2006).

O antígeno B (AgB) representa cerca de 10% do conteúdo total do líquido hidático e é altamente imunogênico em infecções humanas (Maddison *et al.*, 1989), características que levam à sua ampla utilização no imunodiagnóstico da hidatidose cística (Lightowlers & Gottstein, 1995; Zhang & McManus, 2006). Tanto o AgB purificado do líquido hidático, como subunidades recombinantes e peptídeos sintéticos derivados dessa molécula, apresentam alta sensibilidade e especificidade no imunodiagnóstico da doença (Mamuti *et al.*, 2005; Carmena *et al.*, 2006).

O tratamento da hidatidose é, principalmente, cirúrgico e quimioterápico. Atualmente, a terapia mais eficaz no tratamento de indivíduos com hidatidose cística é a remoção cirúrgica do cisto, podendo levar à cura completa da doença (Morris & Richards, 1992; Pawlowski *et al.*, 2001). Todavia, o procedimento é delicado, pois a remoção do cisto intacto é difícil, podendo ocorrer o rompimento do mesmo na cavidade abdominal do paciente, o que pode levar à formação de inúmeros cistos secundários. Também a cirurgia pode ser impraticável em alguns casos, principalmente em pacientes com múltiplos cistos em vários órgãos, ou em regiões ou órgãos inoperáveis, e em pacientes com alto risco cirúrgico (Eckert & Deplazes, 2004). Nestas situações, a quimioterapia é a opção mais adequada para o tratamento.

A quimioterapia com benzimidazoles (albendazol ou mebendazol) pode levar à cura em até 30% dos casos e degeneração ou redução do tamanho do cisto em 50 a 70% dos casos. Em aproximadamente 30% dos casos, a quimioterapia não induz nenhuma mudança morfológica nos cistos (Eckert &

Deplazes, 2004). Embora a eficácia da quimioterapia não seja satisfatória e os custos sejam elevados, ela é uma opção importante de tratamento, principalmente em casos inoperáveis. A quimioterapia é também muito utilizada em conjunto com a cirurgia, para evitar o surgimento de cistos secundários após a intervenção cirúrgica (Pawlowski *et al.*, 2001).

Medidas preventivas empregadas no controle da hidatidose incluem, principalmente, evitar contato com fezes de canídeos, saneamento básico, tratamento de cães infectados com antihelmínticos como praziquantel, incineração de órgãos infectados e educação sanitária (McManus *et al.*, 2003; Torgerson & Budke, 2003). Também a vacinação de um ou de ambos hospedeiros pode diminuir, ou até mesmo eliminar, a infecção em humanos e animais domésticos. Por isso, progressos têm sido realizados no desenvolvimento de vacinas, principalmente para os hospedeiros intermediários (Zhang & McManus, 2006). A vacina recombinante EG95 produziu altos níveis de proteção, em termos da redução no número de cistos hidáticos, em ovinos, caprinos e bovinos, em diversos países (Gauci *et al.*, 2005). Os altos custos impedem a utilização dessa vacina em larga-escala e por isso ela ainda não foi introduzida como parte de nenhum programa de controle governamental em áreas endêmicas (Zhang & McManus, 2006). Neste contexto, um processo comercial foi recentemente descrito para produção de uma vacina recombinante em *E. coli* (Manderson *et al.*, 2006).

1.3. O antígeno B de *Echinococcus granulosus*

O antígeno B (AgB) foi originalmente descrito como o principal componente lipoprotéico do líquido hidático de *E. granulosus* (Oriol *et al.*,

1971), representando aproximadamente 90% da massa dos antígenos dele purificados (Musiani *et al.*, 1978).

Diversos experimentos de imuno-histoquímica e imunocitoquímica demonstraram a presença do AgB nas camadas germinativa e laminar do cisto hidático, nas cápsulas prolíferas e nos protoescólices (Yarzabal *et al.*, 1977; Rickard *et al.*, 1977; Sánchez *et al.*, 1991). Yarzabal *et al.* (1977) e Rickard *et al.* (1977) demonstraram a presença do AgB no tegumento de protoescólices, ao contrário de Sánchez *et al.*, (1991) que identificaram o AgB apenas em células parenquimáticas de protoescólices. Sendo assim, os resultados disponíveis até agora não confirmam o exato local da síntese do AgB no metacestódeo.

Sánchez *et al.* (1991) não identificaram o AgB em protoescólices em degeneração, corroborando os resultados que indicam que a presença do AgB no líquido hidático é resultado de um processo de secreção ativa, e não devido à sua liberação decorrente de morte celular e degeneração de tecidos do metacestódeo. A natureza secretória do AgB foi posteriormente reforçada pela identificação de peptídeos sinais potenciais nas seqüências dos genes que codificam subunidades desta proteína (Ferreira *et al.*, 2004).

A presença de grandes quantidades do AgB no líquido hidático, protoescólices e camadas do cisto (Musiani *et al.*, 1978; Sánchez *et al.*, 1991), sugere um importante papel para esta proteína na sobrevivência do parasito. Apesar do AgB ser uma das proteínas de *E. granulosus* mais estudadas do ponto de vista da imunologia aplicada, a sua função na biologia do parasito permanece indeterminada, no entanto, alguns trabalhos sugerem o seu envolvimento em mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro.

Shepherd *et al.* (1991) demonstraram que a subunidade menor (8kDa) do AgB foi capaz de inibir a serino-protease elastase e a quimiotaxia de neutrófilos em experimentos *in vitro*. Também através de experimentos *in vitro*, Riganò *et al.* (2001) demonstraram que o AgB atua como uma molécula imunorreguladora, possivelmente envolvida em interações parasito-hospedeiro. Os autores mostraram que células mononucleares de sangue periférico estimuladas com o AgB produziram citocinas que induzem uma resposta celular do tipo Th2, menos eficiente na eliminação do parasito. O AgB parece também induzir a apoptose de células do sistema imune em pacientes com a doença ativa (Riganò *et al.*, 2002).

O AgB é ortólogo de moléculas pertencentes ao grupo de proteínas ricas em α -hélice (HLBPs - *helix rich hydrophobic ligand binding proteins*) de outros cestódeos, que se ligam a compostos hidrofóbicos, entre eles lipídeos e ácidos graxos (Saghir *et al.*, 2000). Essas proteínas são intracelulares e muitas delas são imunogênicas e parecem estar envolvidas no transporte e metabolismo de lipídeos (Barrett *et al.*, 1997; Saghir *et al.*, 2000). Chemale *et al.* (2005) demonstraram que o AgB possui, aparentemente, diferentes propriedades de ligação a compostos hidrofóbicos quando comparado com HLBPs de outros cestódeos, não apresentando capacidade de trocar ácidos graxos, o que indica que o AgB não está relacionado aos mecanismos de metabolismo e transporte de moléculas hidrofóbicas, podendo estar envolvido em diferentes papéis para a sobrevivência do parasito. A detoxificação, através do seqüestro de compostos tóxicos (compostos xenobióticos, como anti-helmínticos) presentes no líquido hidático, é sugerida pelos autores como um destes possíveis papéis.

1.3.1. A estrutura do AgB

Desde que foi primeiramente purificado por Oriol *et al.* (1971), através da gel-filtração de uma fração de líquido hidático enriquecida de componentes parasitários, vem se tentando elucidar a estrutura do AgB. O AgB foi inicialmente descrito como uma lipoproteína antigenicamente termoestável de 120-160 kDa, pois mesmo após ser aquecida a 100°C, ela mantinha a sua antigenicidade em experimentos de imunoeletroforese (Oriol *et al.*, 1971; Oriol & Oriol, 1975).

As primeiras análises do AgB em SDS-PAGE realizadas por Piantelli *et al.* (1977), mostraram que a proteína se dissociava em pelo menos três subunidades, com massas moleculares entre 10 e 20 kDa. Porém, mais tarde, através de experimentos de *immunoblotting* e imunoprecipitação com anticorpos monoclonais, Lightowlers *et al.* (1989) mostraram que, na verdade, o AgB se dissocia em subunidades regularmente espaçadas em 8 kDa (8, 16, 24 e 32 kDa), todas imunologicamente relacionadas à subunidade menor. O fato do AgB se dissociar em bandas múltiplas de 8 kDa, com abundância relativa diminuindo à medida que aumenta a massa molecular, levou os autores a sugerirem que o AgB é uma proteína oligomérica composta de subunidades de 8 kDa.

Com a identificação de diferentes subunidades de 8 kDa através do isolamento dos genes correspondentes (Frosch *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 1996; Chemale *et al.*, 2001; Arend *et al.*, 2004; Haag *et al.*, 2004), ou pelo seqüenciamento de peptídeos tripticos derivados das bandas do AgB resolvidas em SDS-PAGE (González *et al.*, 1996), surgiu a hipótese de que o AgB poderia ser um hetero-oligômero de diferentes subunidades de 8 kDa.

Porém, faltam evidências da interação direta entre as diferentes subunidades na formação de uma possível estrutura hetero-oligomérica.

1.3.2. Subunidades do AgB

A primeira seqüência nucleotídica relacionada ao AgB a ser isolada foi um cDNA parcial codificando a porção C-terminal de uma subunidade de 8 kDa do AgB (Shepherd *et al.*, 1991). A seqüência de cDNA completa, posteriormente isolada por Frosch *et al.* (1994), revelou, a partir da seqüência deduzida de aminoácidos do peptídeo maduro, uma massa molecular de 7,5 kDa, bem próxima da massa molecular aparente de 8 kDa das subunidades, previamente determinada por SDS-PAGE (Lightowlers *et al.*, 1989).

Fernández *et al.* (1996) isolaram uma seqüência de cDNA que possui uma identidade de 44% com a seqüência previamente descrita por Frosch *et al.* (1994). A seqüência deduzida de aminoácidos do peptídeo maduro apresentou uma massa molecular de 8,2 kDa. Experimentos de *Southern blot* genômico evidenciaram a presença de várias seqüências parálogas no genoma do parasito. A partir de então, a subunidade codificada pela primeira seqüência de cDNA isolada passou a ser denominada *EgAgB8/1*, enquanto a segunda foi denominada de *EgAgB8/2* (Fernández *et al.*, 1996).

Recentemente, mais dois clones de cDNA relacionados à subunidades de 8 kDa do AgB, *EgAgB8/3* e *EgAgB8/4*, foram isolados por Chemale *et al.* (2001) e Arend *et al.* (2004), respectivamente.

Chemale *et al.* (2001) isolaram, a partir de protoescólices de um único cisto (clones), diferentes seqüências genômicas e de cDNA relacionadas ao AgB, confirmando que as subunidades do AgB são codificadas por uma família

multigênica. Estes resultados foram corroborados e expandidos por Haag *et al.* (2004), através da análise comparativa de várias seqüências genômicas relacionadas ao AgB, sugerindo que a família de genes que codifica o AgB possui pelo menos cinco loci (*EgAgB8/1-EgAgB8/5*), cada um apresentando cópias (ou alelos) ligeiramente diferentes. Os mesmos autores propõem, ainda, que os genes que codificam subunidades do AgB representariam uma família de genes de contingência, descritos para espécies de microparasitos (bactérias, fungos e protozoários), apresentando expressão diferencial nos indivíduos ou ao longo do desenvolvimento, mecanismo que potencialmente levaria à evasão da resposta imune do hospedeiro.

Kamenetzky *et al.* (2005a) testaram a expressão dos genes do AgB em protoescólices únicos de cistos de diferentes hospedeiros, e os resultados sugerem que protoescólices de um mesmo cisto de origem ovina diferem na transcrição de algumas subunidades do AgB, enquanto o gene *EgAgB8/3* parece ter uma expressão constitutiva. Em *E. multilocularis*, análises de RT-PCR para cada um dos genes que codificam o AgB (*EmAgB8/1-EmAgB8/5*), revelaram que estes genes são diferencialmente transcritos ao longo do desenvolvimento deste parasito (Mamuti *et al.*, 2006).

As seqüências genômicas dos genes que codificam subunidades do AgB possuem a mesma estrutura característica, apresentando dois éxons separados por um pequeno íntron (Ferreira *et al.*, 2004). O éxon 1 codifica uma região hidrofóbica N-terminal, seguida de potenciais sítios de clivagem para proteases, indicando um potencial peptídeo sinal responsável pela secreção do peptídeo maduro codificado pelo éxon 2.

Uma grande quantidade de variações nucleotídicas e/ou de aminoácidos é observada nas subunidades do AgB (Shepherd *et al.*, 1991; Frosch *et al.*, 1994; Haag *et al.*, 1998; Haag *et al.*, 1999; Haag *et al.*, 2004; Kamenetzky *et al.*, 2005b). Essas variações são normalmente consideradas formas alélicas polimórficas, que ocorrem entre diferentes isolados ou linhagens de *E. granulosus* (Kamenetzky *et al.*, 2005b), existindo um excesso de substituições não-sinônimas, levando a troca de aminoácidos (Haag *et al.*, 1998). Além disso, existem evidências da ocorrência de heterogeneidade de seqüências intralocus entre protoescólices individuais de um único cisto, a qual é considerada resultado de possíveis mecanismos de hipermutação, recombinação e/ou conversão gênica atuando em nível de um único protoescólex (Haag *et al.*, 2004).

O seqüenciamento de peptídeos trípticos derivados das bandas do AgB resolvidas em SDS-PAGE mostrou que as subunidades AgB8/1 e AgB8/2 fazem parte dos componentes de 8, 16 e 24 kDa do AgB (González *et al.*, 1996). Estes resultados demonstraram que a subunidade menor do AgB é composta por no mínimo duas proteínas diferentes, as quais estão envolvidas na formação dos multímeros observados em condições desnaturantes. Porém, não foi determinado se estes multímeros possuem natureza homo ou hetero-oligomérica. Alguns peptídeos não puderam ser diretamente relacionados com a seqüência deduzida de aminoácidos de AgB8/1 e AgB8/2, os únicos cDNAs relacionados ao AgB disponíveis na época da realização dos experimentos. Posteriormente, foi possível correlacionar estes peptídeos com a seqüência deduzida de aminoácidos da subunidade AgB8/4, demonstrando que esta proteína também está envolvida na formação da estrutura oligomérica do AgB

(Mamuti *et al.*, 2005). Nenhuma seqüência de aminoácidos entre os peptídeos trípticos pôde ser correlacionada com a subunidade AgB8/3, sugerindo que estes genes não sejam sempre expressados, sejam seletivamente expressados em alguma fase específica do desenvolvimento do parasito ou, talvez, somente em algumas espécies de hospedeiros (Mamuti *et al.*, 2006).

2. Justificativa e Objetivos

Embora exista um importante progresso na caracterização do AgB através da clonagem de genes, pouco se sabe acerca da estrutura dessa proteína. Mesmo com o isolamento de genes que codificam para diferentes subunidades do AgB, não existe nenhuma evidência experimental da interação entre as subunidades na formação da estrutura oligomérica do antígeno.

Estudos que avaliem a composição de subunidades do AgB, assim como a interação entre elas, são necessários para estabelecer se o AgB é um hetero ou homo-oligômero, e quantas e quais subunidades compõe a sua estrutura. Estudos anteriores com componentes do AgB, embora tenham gerado importantes informações sobre a estrutura e composição da proteína, não foram capazes de responder a essas perguntas (Lightowers *et al.*, 1989; González *et al.*, 1996). Neste contexto, subunidades recombinantes podem ser importantes modelos para análises estruturais do AgB, permitindo superar alguns dos problemas associados à caracterização da proteína nativa, como o desconhecimento a respeito do conteúdo de modificações pós-traducionais e da composição de subunidades do oligômero.

Nosso laboratório já clonou e expressou em *E. coli* três cDNAs que codificam subunidades do AgB, AgB8/1 (Rott *et al.*, 2000), AgB8/2 (Fernández

et al., 1996) e AgB8/3 (Chemale *et al.*, 2001). A partir da disponibilidade destas três subunidades recombinantes, e considerando-se os aspectos acima citados, o presente trabalho teve como principais objetivos:

1. analisar o estado oligomérico das subunidades recombinantes AgB8/1, AgB8/2 e AgB8/3;
2. caracterizar comparativamente a estrutura dos oligômeros nativo e recombinantes na tentativa de validar estes últimos como ferramentas para o estudo da estrutura do AgB;
3. obter cristais dos oligômeros recombinantes para ensaios de difração de raios X.

CAPÍTULO I

Manuscrito submetido à *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*.

Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers

Karina M. Monteiro, Sandra M. N. Scapin, Marcos V. A. S. Navarro, Nilson I. T. Zanchin, Mateus B. Cardoso, Nádyá P. da Silveira, Paulo F. B. Gonçalves, Hubert K. Stassen, Arnaldo Zaha, Henrique B. Ferreira

O manuscrito apresenta o monitoramento do estado oligomérico de três subunidades recombinantes do AgB, AgB8/1, AgB8/2 e AgB8/3, e a caracterização estrutural dos homo-oligômeros formados pelas mesmas. Os oligômeros recombinantes apresentam características semelhantes às da proteína purificada de líquido hidático, fazendo destes oligômeros importantes modelos para o estudo estrutural do AgB. A modelagem molecular das subunidades permitiu sugerir, a partir do cálculo da superfície eletrostática, a participação de interações anfifílicas na oligomerização das moléculas.

A carta de submissão e a resposta dos *referees* encontra-se em anexo

Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus*
antigen B recombinant subunit oligomers

Karina M. Monteiro^a, Sandra M. N. Scapin^b, Marcos V. A. S. Navarro^b, Nilson I.
T. Zanchin^b, Mateus B. Cardoso^c, Nádyá P. da Silveira^c, Paulo F. B.
Gonçalves^{d,e}, Hubert K. Stassen^d, Arnaldo Zaha^a, Henrique B. Ferreira^{a,*}

^a Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Cx. Postal 15005, 91501-970,
Porto Alegre, RS, Brazil

^b Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz
Síncrotron, LNLS, Campinas, SP, Brazil

^c Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular, Instituto de Química,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Grupo de Química Teórica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^e Present address: Unilasalle, Canoas, RS, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3316-7768; fax: +55 51 3316-7309

E-mail address: henrique@cbiot.ufrgs.br

Abstract

Echinococcus granulosus antigen B is an oligomeric protein of 120-160 kDa composed by 8 kDa (AgB8) subunits. Here, we demonstrated that the AgB8 recombinant subunits AgB8/1, AgB8/2 and AgB8/3 are able to self-associate into high order homo-oligomers, showing similar properties to that of parasite-produced AgB, making them valuable tools to study AgB structure. Dynamic light scattering, size exclusion chromatography and cross linking assays revealed ~120-160 kDa recombinant oligomers, with a tendency to form populations with different aggregation states. Recombinant oligomers showed helical circular dichroism spectra and thermostability similar to those of purified AgB. Cross-linking and limited proteolysis experiments indicated different degrees of stability and compactness between the recombinant oligomers, with the AgB8/3 one showing a more stable and compact structure. We have also built AgB8 subunit structural models in order to predict the surfaces possibly involved in electrostatic and hydrophobic interactions during oligomerization.

Keywords: *Echinococcus granulosus*; antigen B; recombinant subunits; oligomerization; thermostability; protease sensitivity.

1. Introduction

Echinococcus granulosus (Cestoda, Taeniidae) is the causative agent of cystic hydatid disease (CHD), a worldwide prevalent cestodiasis in humans and domestic ungulates [1]. The antigen B (AgB) is one of the major antigenic components of the metacestode hydatid fluid (HF) and was first characterized as a lipoprotein of 120-160 kDa [2,3]. This antigen is highly immunogenic in human infections and its use has been proposed for the improvement of CHD immunodiagnosis [4,5]. The biological roles of AgB are not clear, but several lines of evidence suggest its involvement in key parasite-host interactions. For instance, it has been described as a protease inhibitor that impairs neutrophil recruitment in vitro [6], and as a factor able to skew Th1/Th2 cytokine ratios towards a nonprotective Th2 cell response [7] and induce immune cells apoptosis in patients with active disease [8]. Moreover, a possible role for AgB in lipid uptake and/or detoxification mechanisms has also been suggested [9].

Structurally, AgB is an oligomeric protein that, under reducing conditions, dissociates into components of 8, 16, 24 e 32 kDa, with their relative abundance decreasing proportionally to the increase of the molecular mass [10]. The components with higher molecular masses correspond to multimers (dimers, trimers, etc.) of monomeric 8 kDa related subunits (AgB8) [11], which are encoded by a multigene family [12]. The existence of at least five AgB8 gene loci has been proposed for *E. granulosus* and it has been suggested that they would constitute a family of contingency genes [13].

Studies on AgB subunit composition and interaction are required to establish whether AgB is a homo or a hetero-oligomer, and which or how many different AgB8 subunits are present in an AgB oligomer. Previous studies with

AgB components have failed to answer these questions [10,11]. In this context, recombinant AgB8 subunits can be important models for AgB structural analyses.

Our group has produced three AgB8 recombinant subunits (AgB8/1, AgB8/2, AgB8/3) by cloning and expressing their corresponding genes in *Escherichia coli* [12,14,15]. In this work, we present experimental evidences of the self-association of these recombinant subunits into higher molecular mass homo-oligomers, as determined by dynamic light scattering, size-exclusion chromatography and cross-linking assays. Spectroscopic characterization showed that recombinant oligomers and purified AgB present similar properties, validating the recombinant oligomers as models for the investigation of AgB structural aspects, such as subunit composition and oligomerization. We have also built AgB8 subunit structural models that allowed the identification of molecular surfaces possibly involved in electrostatic and hydrophobic interactions during oligomerization.

2. Materials and methods

2.1. Protein expression and purification. AgB8/1 [14], AgB8/2 [15] and AgB8/3 [12] subunits were expressed in *E. coli* as fusion proteins with glutathione-S-transferase, purified by affinity chromatography on immobilized glutathione and recovered by thrombin cleavage, as previously described [4]. Expression in *E. coli* yielded 4, 6 and 10 mg of protein per liter of culture for AgB8/1, AgB8/2 and AgB8/3, respectively. On reducing SDS-PAGE, these proteins appear as single bands of ~8 kDa (data not shown). In non-reducing conditions, AgB8/2 and

AgB8/3, which contain single cysteine residues, absent in AgB8/1, also appeared as dimers [12, 15, data not shown]. AgB was purified from a parasite enriched HF fraction, obtained from a single fertile cyst of cattle lung as described by Oriol et al. [2]. Rabbit polyclonal antibodies raised against recombinant AgB8/2 were coupled to a cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (Amersham Biosciences) and AgB purification by immunoaffinity chromatography was carried out as described by Chemale et al. [9]. SDS-PAGE analysis of purified AgB generated the previously described [10] ladder-like pattern of 8, 16, 24 and 32 kDa components (data not shown).

2.2. Dynamic light scattering measurements (DLS). Light scattering was performed on a DynaPro instrument (Protein Solutions Inc.) that monitors the scattered light intensity at 90° from the incident light beam. A Nd:YAG laser ($\lambda = 883$ nm) was used as light source. The intensity fluctuation of the scattered light was recorded by single-photon-counting electronics. Under the assumption of Brownian motion and a hard sphere model for the particle, the apparent diffusion coefficient (D) was converted to the hydrodynamic radius (R_h) by using the Stokes-Einstein relation:

$R_h = \kappa_B T / 6\pi\eta_o D$, where κ_B is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, and η_o is the viscosity of the solvent.

The molecular mass (MM) of proteins was estimated assuming a spherical shape for the proteins in solution, using the algorithm $MM = (1.549R_h)^{2.426}$. The linear calibration curves ($\log R_h$ versus $\log MM$) were obtained from 18 different standard proteins solutions. Data analysis was performed with the Dynapro V.5 software.

Proteins samples at 0.8 mg/ml in PBS were centrifuged (14,000 rpm for 10 minutes at 4°C) before DLS analysis at 20°C. At least 50 measurements of 10 seconds were acquired for each protein sample.

2.3. Size-exclusion chromatography. One milligram of each AgB8 recombinant protein in PBS was individually loaded onto a Superdex 200 HR 10/30 column (Amersham Biosciences) previously equilibrated in PBS. Chromatography was performed on an Äkta FPLC system (Amersham Biosciences) at a flow rate of 0.3 ml/min at room temperature and the absorbance was monitored at 280 nm. The column was calibrated using protein molecular mass standards under the same conditions.

2.4. Cross-linking assay. Cross-linking experiments were carried out as previously described [16]. Briefly, 80 µl of a 2 mg/ml solution of each recombinant protein in PBS were incubated with 0.1% glutaraldehyde (v/v) at room temperature. Ten-microliter aliquots were withdrawn at different times and reactions were stopped by adding SDS sample buffer and boiling for 5 min. Cross-linked products were analyzed under reducing conditions on 15% SDS-PAGE and detected by Coomassie blue staining.

2.5. Circular dichroism spectroscopy. Circular dichroism (CD) spectra were acquired on a Jasco J810 spectropolarimeter at 20°C in 1 mm path-length cells, using a 50 nm/min scanning rate and a spectral bandwidth of 0.5 nm. Protein CD spectra were recorded at 2.5 µM, 40 µM, 35 µM and 45 µM for AgB, AgB8/1, AgB8/2 and AgB8/3, respectively, over the range of 195-260 nm in

buffer containing 10 mM of Na₂HPO₄ and 5.5 mM of NaCl, pH 7.2. Ellipticity was reported as the mean residual ellipticity [θ] (deg cm² dmol⁻¹). For the recombinant proteins, the number of residues used corresponded to that of individual monomers. For the purified AgB, the number of residues was estimated as for a 120 kDa protein. The CDNN deconvolution program [17] was employed to estimate the ratio of secondary structure elements in CD spectra. Proteins were also subjected to thermal unfolding from 20°C at 95°C, with a scan rate of 1°C/min. Thermal stability was measured at 222 nm using 0.5°C intervals and CD spectra were collected at 5°C intervals over the ranges of 195-260 nm and 200-260 nm for recombinant proteins and purified AgB, respectively. Refolding assays were started at 95°C and the temperature was lowered to 20°C, with concomitant monitoring of ellipticity at 222 nm.

2.6. Limited proteolysis assay. Recombinant AgB8 subunits were subjected to proteolysis using trypsin, chymotrypsin and proteinase K at ratios of 1:100, 1:100 and 1:1000 (w/w), respectively. Digestion was performed with 1 mg/ml of recombinant AgB8 oligomers in PBS at 37°C. Aliquots were removed at different time intervals and the reactions were stopped with the addition of loading buffer containing 1 mM PMSF, followed by boiling for 5 min. Proteolysis products were resolved on Tricine-SDS-PAGE gels.

2.7. Fluorescence spectroscopy. Fluorescence emission spectra were collected on an Aminco Bowman Series II Luminescence Spectrometer (SLM Aminco, Spectronic Instruments) using a protein concentration of 10 μ M in PBS. For tryptophan intrinsic fluorescence, the samples were excited at 280 nm and the

emission spectra were recorded from 300 to 400 nm. An excitation wavelength of 274 nm was used in tyrosine fluorescence measurements and the emission spectra were recorded from 285 to 400 nm. Proteins denatured with 6 M guanidine hydrochloride were used as experimental controls.

2.8. Modeling of AgB subunits. The primary sequences were assembled using the Swiss PDB-Viewer software (<http://www.expasy.org/spdbv>). The structures obtained were independently heated to 1000 K for 5 ps in vacuum and subsequently cooled slowly to 310 K. Each structure was solvated in boxes containing SPC water [18], Na⁺ and Cl⁻ ions in physiological concentration. The systems were equilibrated for 2.0 ns and subsequently simulated using the GROMACS software [19] for 3.0 ns. The simulation temperature was 310 K at a pressure of 1 bar for weak coupling of a Berendsen thermostat [20] with coupling constant of $\tau_p=1.0$ ps. The LINCS [21] and SETTLE [22] methods allowed the use of an integration step of 2 fs. A cut-off of 1.4 nm was used with periodic conditions. The electrostatic interactions were calculated using the PME method [23]. The average configuration obtained in the last nanosecond of simulation was used for surface electrostatic potential calculation with the APBS software [24], which resolves the Poisson-Boltzmann equation for the system.

3. Results and discussion

3.1. Self-assembly of AgB8 recombinant subunits

The oligomeric state of individual AgB8 recombinant subunits in solution was monitored by DLS, size exclusion chromatography and glutaraldehyde cross-linking. DLS yields the hydrodynamic radius of a species in solution and

thus reflects its state of oligomerization [25]. DLS measurements showed radii of 3.8 nm, 4.8 nm, and 5.3 nm for AgB8/1, AgB8/2 and AgB8/3, respectively, which are larger than the radius expected for a monomeric 8 kDa protein. This clearly indicated that these proteins spontaneously associate into high order multimers. The apparent molecular masses, estimated from hydrodynamic radii of particles, were 96 kDa, 193 kDa and 266 kDa for AgB8/1, AgB8/2 and AgB8/3, respectively.

Subsequently, we examined the oligomeric state of recombinant AgB8 subunits by size exclusion chromatography (Fig. 1). The elution profiles revealed major components of 125 kDa, 164 kDa and 113 kDa for AgB8/1, AgB8/2 and AgB8/3, respectively. Secondary peaks containing oligomers of higher molecular masses were observed for the three proteins, that, in the case of AgB8/3, corresponds to approximately 227 kDa, and are less defined in AgB8/1 e AgB8/2 size-exclusion chromatography profiles. The molecular masses estimated from the chromatography analysis were consistent with those estimated from DLS and the deviations were probably due to the non-spherical shape of AgB8 oligomers. Based on the molecular masses calculated from size-exclusion chromatography, the homo-oligomers would consist of approximately 16 AgB8/1, 20 AgB8/2 and 14-29 AgB8/3 monomers.

The two peaks observed in size exclusion chromatography suggest the existence of two major populations, with different states of oligomerization. In agreement with this scenario, Oriol et al. [2] reported that the Sephadex G-200 separation profile of an parasite enriched HF fraction showed three major peaks, corresponding to ≥ 320 kDa, ~ 240 kDa and ~ 160 kDa. AgB was found in all of them, although it was obtained in a more purified form from the third one

(~160 kDa). When this ~160 kDa fraction was reloaded on the column, it again produced the three peaks of the original profile, which was suggestive of the existence of AgB in several distinct forms of aggregation that would be in reversible equilibrium. This situation is mimicked, at least in a certain extent, by the recombinant AgB8 subunits.

The self-association of AgB subunits was further confirmed by glutaraldehyde cross-linking experiments. Fig. 2 shows a time course where a progressive transition of the monomeric form of AgB subunits into high molecular mass oligomers took place with increasing times of cross-linking. The cross-linked products presenting molecular masses of approximately 100 kDa and >200 kDa, probably represent the major populations resolved by size-exclusion chromatography. The kinetics of multimer cross-linking was different for the three proteins, with oligomers starting to appear after 30, 5, and 1 min of cross-linking for AgB8/1 (Fig. 2A), AgB8/2 (Fig. 2B), and AgB8/3 (Fig. 2C), respectively. Shorter cross-linking times denote closer interactions, indicating a relation $\text{AgB8/3} > \text{AgB8/2} > \text{AgB8/1}$ regarding the association affinity between subunits within the corresponding homo-oligomers.

DLS, size exclusion chromatography and cross-linking analyses indicated that AgB8 recombinant subunits in solution are able to self-assemble into high molecular mass oligomers, in a non-covalent manner, with molecular masses close to that of purified AgB (120-160 kDa). The recombinant proteins apparently have an intrinsic tendency to form populations with different states of aggregation, as the purified AgB. However, unlike purified AgB, the recombinant oligomers completely dissociate in monomers on SDS-PAGE. Post-translational modifications, previously suggested for AgB subunits, such as lipidation [2], and

unavailable for their recombinant counterparts could be responsible for the stability of the AgB multimers with low molecular masses (16, 24 or 32 kDa) under SDS-PAGE denaturing conditions. Differential non-covalent interactions with hydrophobic ligands, demonstrated for both purified AgB and recombinant AgB subunits [9] may also play a role in different levels of oligomer stabilization and deserve future investigation.

3.2. Secondary structure and thermostability of recombinant and purified oligomers

In order to obtain information about oligomer structure and stability, the proteins were analyzed by CD. The CD spectra were indicative of a high α -helical content, with double minima at 208 and 222 nm (Fig. 3), both for the recombinant oligomers and purified AgB. Spectra deconvolution with CDNN indicated a secondary structure ratio of ~35-40% α -helix, ~33% random coil and ~17% β -turn, which are consistent with values previously described [3,26]. Under thermal denaturation, the CD signal at 222 nm showed a relatively small loss of signal, indicating that proteins maintained most of their secondary structures (Fig. 4). Refolding assays demonstrated that even the small loss of secondary structure content under thermal denaturation was reversible (data not shown). The oligomer stability is most probably due to the highly organized quaternary structure. These data support previous studies which described AgB as an antigenically thermostable lipoprotein [2] and demonstrate that the recombinant and purified oligomers are very similar in secondary structure content and thermostability. Such degree of similarity with purified AgB, make the recombinant AgB8 homo-oligomers useful models to study structural and

functional aspects of AgB. The availability of these recombinant AgB8 homo-oligomers can be helpful to overcome problems associated to structural and functional characterization of parasite-produced oligomers, with unknown and probably heterogeneous subunit composition [13, 27] and post-translational modifications.

3.3. Insights into oligomer conformation

In order to obtain information on oligomer conformation, we performed limited proteolysis and intrinsic fluorescence experiments. Limited proteolysis has been widely used to probe conformational features of proteins, such as compactness, and to identify protein domains [28,29]. We digested recombinant oligomers with trypsin and chymotrypsin, proteases with trypsin-like specificity, and proteinase K, a non-specific proteolytic enzyme. AgB susceptibility to proteolytic digestion was not assessed due to its unknown post-translation modification content, which would probably interfere with the digestion outcome. Fig. 5 shows the proteolytic products of the recombinant oligomers with the panel of proteases as a function of incubation time. AgB8/1 and AgB8/2 oligomers were partially or fully digested by protease treatment, while AgB8/3 remained mostly intact throughout the course of the experiment. The AgB8/3 oligomer higher resistance to proteolysis denotes a conformation more stable than that of the other two recombinant oligomers. Such a different stability is consistent with the observation that recombinant AgB8/3 yields in *E. coli* are higher than those of AgB8/1 and AgB8/2 (see Materials and methods section), since a direct relationship is expected between recombinant protein stability and its expression level [30]. Since all proteins are equally stable at higher

temperatures and show similar secondary structure content and number of cleavage sites, the proteolysis assays point to a higher compactness of the AgB8/3 oligomeric structure. AgB8/1, on the other hand, was the more labile oligomer, showing digestion products as soon as a protease was added (time 0 in Fig. 5) and full digestion at final times, reflecting a more loose association between subunits. The observed AgB8/1, AgB8/2 and AgB8/3 differential susceptibility to protease treatment is in agreement with our cross-linking results (see Fig. 2), reinforcing the idea that AgB8/3 oligomers would have a more compact structure.

Initial host responses to the establishment of hydatid cysts involve infiltration of innate immune system cells [31] and one of their effector mechanisms is the production and secretion of proteolytic enzymes. With that in mind and considering that AgB is a major component of the HF, the differential susceptibility of AgB8 subunits to protease digestion and their representativity and relative contribution to the structure of AgB oligomers would be of major concern to understand possible functional relationships between AgB and host proteases within the hydatid cyst. In the same context, intracellular proteolysis is a key step in antigen presentation events and an increase in protein stability is known to reduce the antigenicity of proteins [32,33]. Therefore, AgB8/3 three dimensional structure could potentially limit its processing and presentation to helper T-cells, which may explain, at least in part, why this subunit elicits a lower specific humoral response in hydatid disease patients than that elicited by AgB8/1 or AgB8/2 [4; our unpublished data].

To determine the tryptophan and tyrosine microenvironments in oligomer structures we performed intrinsic fluorescence experiments. AgB8/2

fluorescence presented a maximum emission near 330 nm, indicating that the single AgB8/2 Trp residue (Trp16 in mature protein) is in a hydrophobic environment (Fig. 6A). The same was observed for purified AgB oligomers, indicating that they include Trp-containing AgB8 subunits and that the AgB8 Trp residues would be also buried into the oligomer structure. Trp residues are not present in AgB8/1 and AgB8/3 proteins, but they contain Tyr residues, which can also be used to measure the intrinsic fluorescence of a protein. The AgB8/1 and AgB8/3 fluorescence emission spectra showed a maximum at 303 nm (Fig. 6B), which is consistent with the fluorescence emission of free or water-exposed Tyr residues. A single tyrosine residue (Tyr59 in mature protein) is found at the C-terminal end of AgB8/3, indicating that this region of the monomer is exposed to the solvent in oligomer conformation. On the other hand, the exposed single AgB8/1 Tyr residue (Tyr20 in mature protein) occupies a position near the N-terminal end of the subunit, close to that of Trp16 in AgB8/2, which, in contrast, was found to be buried in the oligomeric structure. To explain the solvent exposure of the immunogenic N-terminus of AgB8/1 (p38), González et al. [26] proposed a model in which there is an intramolecular bent of an α -helix over itself, due to the distribution of hydrophobic residues. In such conformation, the predicted epitope containing the Tyr20 residue (EVKYFFER, residues 17-24) would be fully solvent exposed. Based on our results with recombinant AgB8 oligomers, we now propose that intermolecular in addition to or instead of intramolecular hydrophobic interactions would be the determinants of the AgB8/1 subunit conformation in which its N-terminus, including Tyr20, is solvent exposed.

3.4. Possible electrostatic and hydrophobic interactions in oligomers formation

To help us to identify possible interactions involved in oligomer formation, we constructed structural models of AgB8/1, AgB8/2, and AgB8/3 subunits and calculated the electrostatic potential of their surfaces (Fig. 7). In our models, AgB8 subunits consist of an elongated α -helix with a short coil region determined by the Pro-X-Gly pair (DPLG region), as proposed in the p38 model [26]. For AgB8/1 (Fig. 7A), the model predicted a somewhat scattered charge density distribution, although a predominantly hydrophobic face could be defined. AgB8/2 presented, in its central portion, a region of low polarity, approximately neutral, but also restricted to only one face of the helix (Fig. 7B). For AgB8/3 (Fig. 7C), a similar configuration was observed, but with a more pronounced charge separation. Therefore, the molecules would behave as a facial amphiphile, hydrophilic in one face and hydrophobic in the other. From these models, we can infer that the amphiphilic subunits could self-assemble into oligomers accommodating their hydrophilic and hydrophobic surfaces, so that non-polar regions would be segregated from the solvent in a hydrophobic core and polar regions would be exposed to solvent. This would form a multimeric structure thermodynamically more stable than individual monomers. The hydrophobic effect is considered the principal driving force for all protein-protein associations [34,35], and amphiphilic α -helices, such as those predicted for AgB subunits, seem to be involved in the oligomerization of some proteins, such as eye lens α -crystallin [36,37] and dynamin [38].

Due to a more diffuse charge distribution in AgB8/1 surface, we can suggest that its oligomerization tendency would not be so pronounced as that of AgB8/2 or AgB8/3, in which aggregation would be favored. This prediction is in

agreement with our results from size exclusion chromatography, cross-linking and limited proteolysis experiments, which are indicative of a less aggregative character for AgB8/1 and a less compact structure for the corresponding oligomer.

In conclusion, the results reported here demonstrated, for the first time, that AgB8 recombinant subunits self-assembly into high molecular mass homo-oligomers with structural features similar to those of the parasite-produced AgB. Besides, the molecular modeling of AgB8 subunits helped us to identify surfaces possibly involved in electrostatic and hydrophobic interactions responsible for homo-multimers formation. Although our results helped to shed some light on AgB structural properties, other experimental approaches, including the analysis of mutagenized subunits, will be necessary to confirm theoretical predictions and to explain how different subunits could interact with each other and with other molecules (such as hydrophobic ligands) in the context of AgB oligomer. Studies on AgB oligomerization may help in the design of drugs that inhibit or interfere with protein-protein interactions [39,40], disturbing oligomer function and/or stability. The elucidation of the overall structure of an AgB8 oligomer is likely to require crystallographic studies, and, with that in mind, screenings to obtain crystals of the AgB8 recombinant oligomers have already been started by our group.

Acknowledgements

We thank Adriana C. Alves, for assistance with size-exclusion chromatography, and Dr. Célia Carlini, for the kind gift of chymotrypsin. This work was supported by CNPq, FAPERGS, RTPD Network (SIDA/SAREC), and FAPESP SMOIBNet (00/10266-8) and CEPID/CBME (98/14138-2) programs. K. M. M. is a recipient of a CNPq M.Sc. fellowship. S. M. N. S. and M. B. C. are recipients of Ph.D. fellowships from FAPESP and CAPES, respectively.

References

- [1] J. Eckert, P. Deplazes, Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern, *Clin. Microbiol. Rev.* 17 (2004) 107-135.
- [2] R. Oriol, J.F. Williams, M.V.P. Esandi, C. Oriol, Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20 (1971) 569-574.
- [3] C. Oriol, R. Oriol, Physiocochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24 (1975) 96-100.
- [4] V.G. Virginio, A. Hernández, M.B. Rott, K.M. Monteiro, A.F. Zandonai, A. Nieto, A. Zaha, H.B. Ferreira, A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease, *Clin. Exp. Immunol.* 132 (2003) 309-315.
- [5] C. Lorenzo, H.B. Ferreira, K.M. Monteiro, M. Rosenzvit, L. Kamenetzky, H. H. García, Y. Vasquez, C. Naquira, E. Sánchez, M. Lorca, M. Contreras, J.A. Last, G.G. González-Sapienza, Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study, *J. Clin. Microbiol.* 43 (2005) 2764-2770.
- [6] J.C. Shepherd, A. Aitken, D.P. McManus, A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis, *Mol. Biochem. Parasitol.* 44 (1991) 81-90.
- [7] R. Riganò, E. Profumo, F. Bruschi, G. Garulli, A. Azzara, S. Ioppolo, B. Buttari, E. Ortona, P. Margutti, A. Teggi, A. Siracusano, Modulation of human

immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses, *Infect. Immun.* 69 (2001) 288-296.

[8] R. Riganò, S. Ioppolo, E. Ortona, P. Margutti, E. Profumo, M.D. Ali, B. Di Vico, A. Teggi, A. Siracusano, Longterm serological evaluation of patients with cystic echinococcosis treated with benzimidazole carbamates, *Clin. Exp. Immunol.* 129 (2002) 485-492.

[9] G. Chemale, H.B. Ferreira, J. Barrett, P.M. Brophy, A. Zaha, *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties, *Biochim. Biophys. Acta.* 1747 (2005) 189-194.

[10] M.W. Lightowers, D. Liu, A. Haralambous, M.D. Rickard, Subunit composition and specificity of major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 37 (1989) 171-182.

[11] G. González, A. Nieto, C. Fernández, A. Örn, C. Wernstedt, U. Hellman, Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B, *Parasite Immunol.* 18 (1996) 587-596.

[12] G. Chemale, K.L. Haag, H. B. Ferreira, A. Zaha, *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family, *Mol. Biochem. Parasitol.* 116 (2001) 233-237.

[13] K.L. Haag, L. Alves-Junior, A. Zaha, F.J. Ayala, Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family, *Gene* 333 (2004) 157-167.

[14] M.B. Rott, V. Fernández, S. Farias, J. Ceni, H.B. Ferreira, K.L. Haag, A. Zaha, Comparative analysis of two different subunits of antigen B from

Echinococcus granulosus: gene sequence, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation, *Acta Trop.* 75 (2000) 331-340.

[15] V. Fernández, H.B. Ferreira, C. Fernández, A. Zaha, A. Nieto, Molecular characterization of a novel 8 kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B, *Mol. Biochem. Parasitol.* 77 (1996) 247-250.

[16] S. Darawshe, Y. Tsafadyah, E. Daniel, Quaternary structure of erythrocrucorin from the nematode *Ascaris suum*. Evidence for unsaturated haem-binding sites, *Biochem. J.* 242 (1987) 689-694.

[17] G. Böhm, R. Muhr, R. Jaenicke, Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks, *Protein Eng.* 5 (1992) 191-195.

[18] H.J.C. Berendsen, J.R. Grigera, T.P. Straatsma, The missing term in effective pair potential, *J. Chem. Phys.* 91(1987) 6269-6271.

[19] E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, GROMACS 3.0, *J. Mol. Model.* 7(2001) 306-317.

[20] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Potsma, W.F. van Gunsteren, A.D. Nola, J.R. Kaak, Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81(1984) 3684-3690.

[21] S.R. Hess, H. Bekker, H.J.C. Berendsen, J.G.E.M. Fraaije, LINCS: a linear constraint solver for molecular dynamics, *J. Comp. Chem.* 18 (1997) 1463-1472.

[22] S. Miyamoto, P.A. Kollmann, SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithms for rigid water models, *J. Comp. Chem.* 13 (1992) 952-962.

[23] T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle Mesh Ewald: an Nlog(N) method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 10089-10092.

- [24] N.A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M.J. Holst, J.A. McCammon, Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001) 10037-10041.
- [25] K.S. Schmitz, An introduction to dynamic light scattering by macromolecules, Academic Press, San Diego, California, 1990.
- [26] G. González, R.E. Cachau, Identification of critical residues of an immunodominant region of *Echinococcus granulosus* antigen B, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 20179-20184.
- [27] W. Mamuti, Y. Sako, N. Xiao, K. Nakaya, M. Nakao, H. Yamasaki, M.W. Lightowers, P.S. Craig, A. Ito, *Echinococcus multilocularis*: Developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa-subunits, *Exp. Parasitol.* 113 (2006) 75-82.
- [28] A. Fontana, P.P. de Laureto, B. Spolaore, E. Frare, P. Picotti, M. Zambonin, Probing protein structure by limited proteolysis, *Acta Biochim. Pol.* 51 (2004) 299-321.
- [29] C.M. Koth, S.M. Orlicky, S.M. Larson, A.M. Edwards, Use of limited proteolysis to identify protein domains suitable for structural analysis, *Methods Enzymol.* 368 (2003) 77-84.
- [30] M. Murby, M. Uhlén, S. Stahl, Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*, *Protein. Expr. Purif.* 7 (1996) 129-136.
- [31] W. Zhang, J. Li, D.P. McManus, Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease, *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (2003) 18-36.

- [32] T. So, H. Ito, T. Koga, S. Watanabe, T. Ueda, T. Imoto, Depression of T-cell epitope generation by stabilizing hen lysozyme, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 32136-32140.
- [33] S. Carmicle, G. Dai, N.K. Steede, S.J. Landry, Proteolytic sensitivity and helper T-cell epitope immunodominance associated with the mobile loop in Hsp10s, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 155-160.
- [34] L. Young, R.L. Jernigan, D.G. Covell, A role for surface hydrophobicity in protein-protein recognition, *Protein Sci.* 3 (1994) 717-729.
- [35] C.J. Tsai, S.L. Lin, H.J. Wolfson, R. Nussinov, Studies of protein-protein interfaces: a statistical analysis of the hydrophobic effect, *Protein Sci.* 6 (1997) 53-64.
- [36] M.T. Walsh, A.C. Sen, B. Chakrabart, Micellar subunit assembly in a three-layer model of oligomeric α -crystallin, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 20079-20084.
- [37] T. Aerts, J. Clauwaert, P. Haezebrouck, E. Peeters, H. Van Dael, Interaction of detergents with bovine lens α -crystallin: evidence for an oligomeric structure based on amphiphilic interactions, *Eur. Biophys. J.* 25 (1997) 445-454.
- [38] J. Chugh, A. Chatterjee, A. Kumar, R.K. Mishra, R. Mittal, R.V. Hosur, Structural characterization of the large soluble oligomers of the GTPase effector domain of dynamin, *FEBS J.* 273 (2006) 388-397.
- [39] R. Zutshi, M. Brickner, J. Chmielewski, Inhibiting the assembly of protein-protein interfaces, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2 (1996) 62-66.
- [40] R. Pérez-Montfort, M.T. de Gómez-Puyou, A. Gómez-Puyou, The interfaces of oligomeric proteins as targets for drug design against enzymes from parasites, *Curr. Top. Med. Chem.* 2 (2002) 457-470.

Legends

Fig. 1. Gel filtration analysis of recombinant AgB8 oligomers. Elution profiles of AgB8/1 (solid line), AgB8/2 (dashed line) and AgB8/3 (dotted line) oligomers chromatographed on a Superdex 200 column. Blue dextran (BD), catalase (232 kDa), aldolase (158 kDa), albumin (66 kDa), ovalbumin (43 kDa), and ribonuclease (13.7 kDa) were used as molecular mass standards and their positions are indicated by arrowheads (*top*).

Fig. 2. Cross-linking of AgB8/1 (A), AgB8/2 (B) and AgB8/3 (C) recombinant oligomers. Proteins were cross-linked with 0,1% of glutaraldehyde for 0.5, 1, 5, 10, 20, 30 and 60 min, as indicated (*top*), and separated on 15% SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining. The gray and black arrows indicate the cross-linked products of approximately 100 and >200 kDa, respectively. Molecular mass standards (lane M) are indicated on the left.

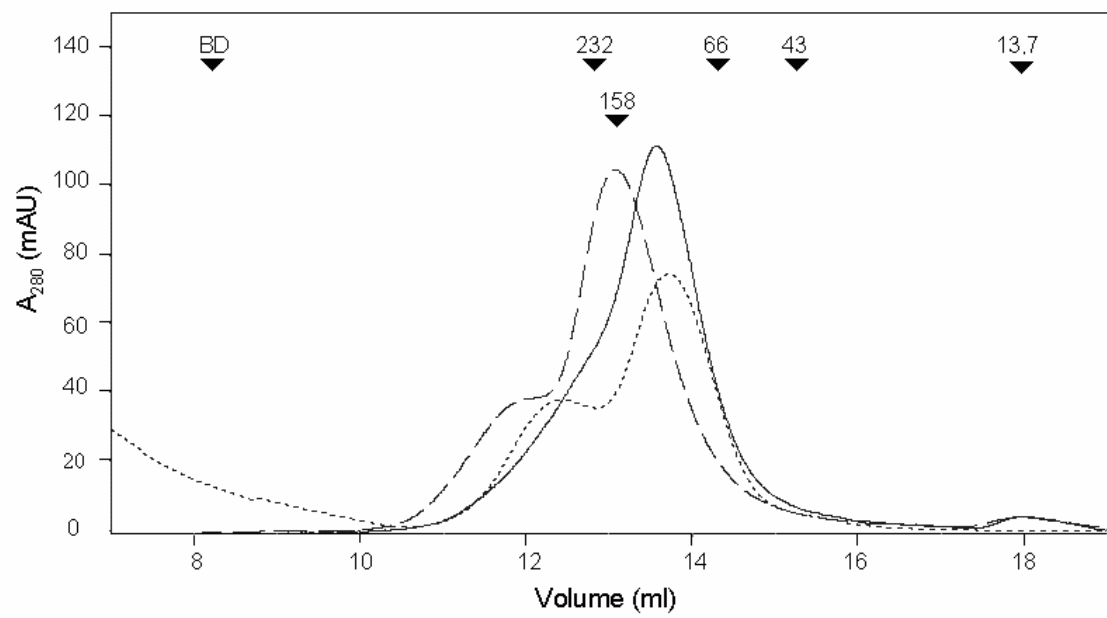
Fig. 3. Far UV CD spectra of recombinant AgB8 oligomers and purified AgB acquired at 20°C in buffer containing 10 mM Na₂HPO₄ and 5.5 mM NaCl, pH 7.2. CD spectra are typical of α -helical proteins with double minima at 208 and 222 nm.

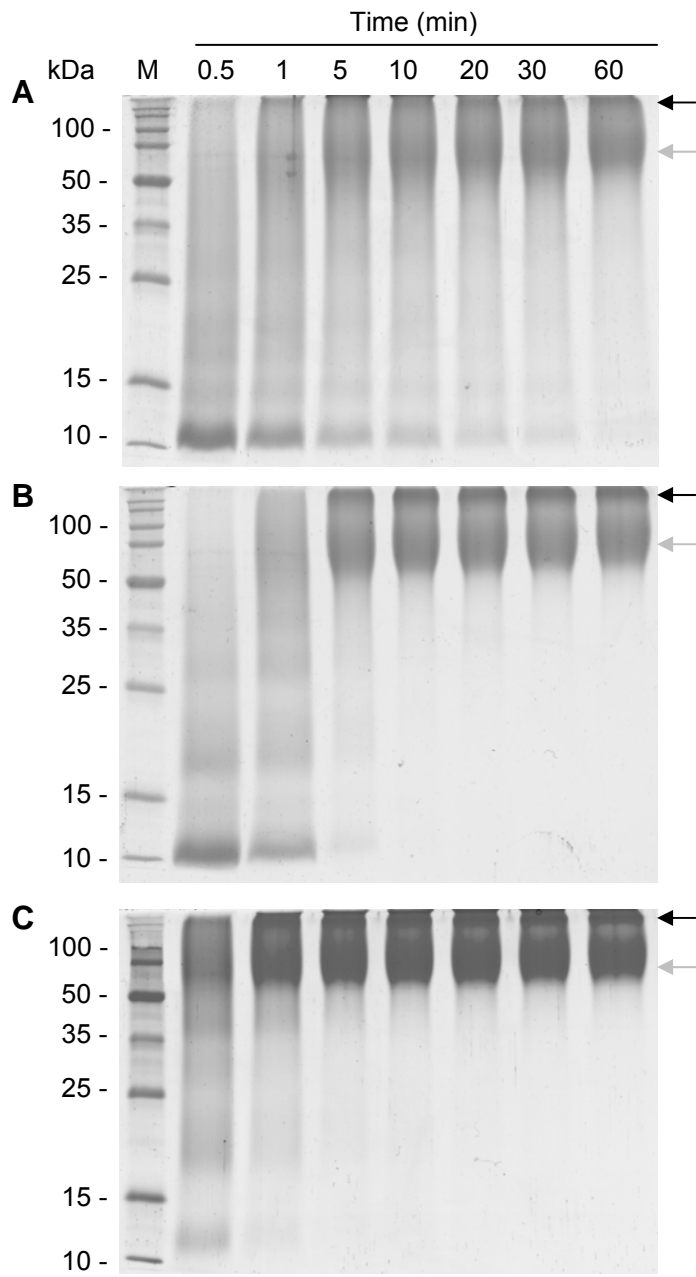
Fig. 4. Thermal denaturation of recombinant AgB8 oligomers and purified AgB monitored by circular dichroism. CD spectra of (A) 40 μ M AgB8/1, (B) 35 μ M AgB8/2, (C) 45 μ M AgB8/3, and (D) 2.5 μ M AgB are showed at 20°C (solid line) and 95°C (dashed line).

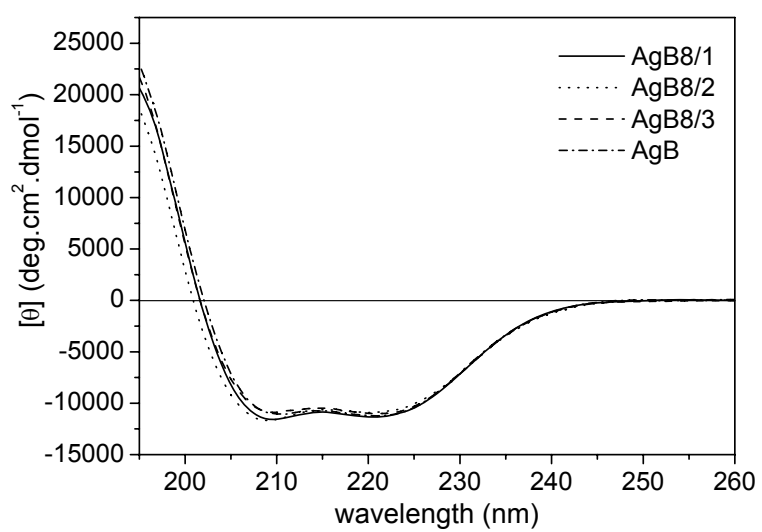
Fig. 5. Coomassie stained Tricine-SDS-PAGE gels of recombinant AgB8 proteolysis products following digestion with (A) trypsin 1:100 (w/w), (B) chymotrypsin 1:100 (w/w) and (C) proteinase K 1:1000 (w/w). Aliquots were removed at different time intervals and the reactions were stopped with the addition of 1mM PMSF and loading buffer, followed by boiling. The incubation times are indicated on the top of each lane and molecular mass standards (lane M) are indicated on the left.

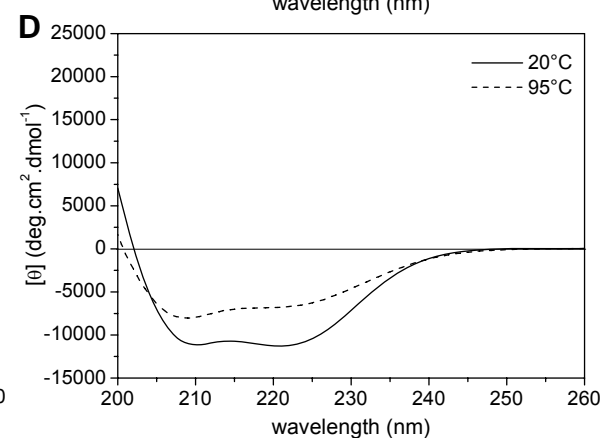
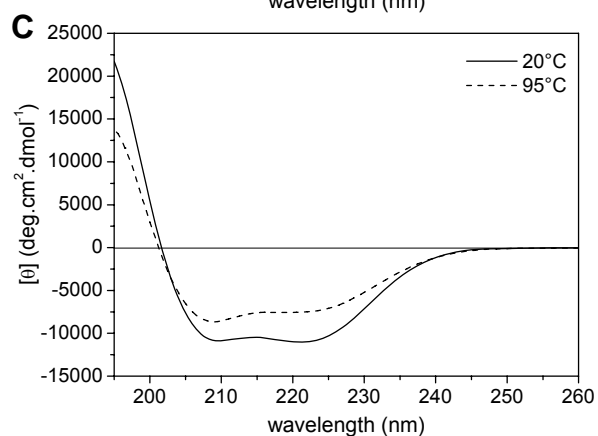
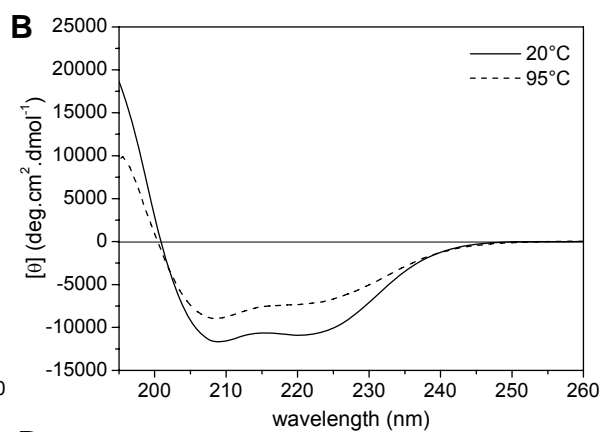
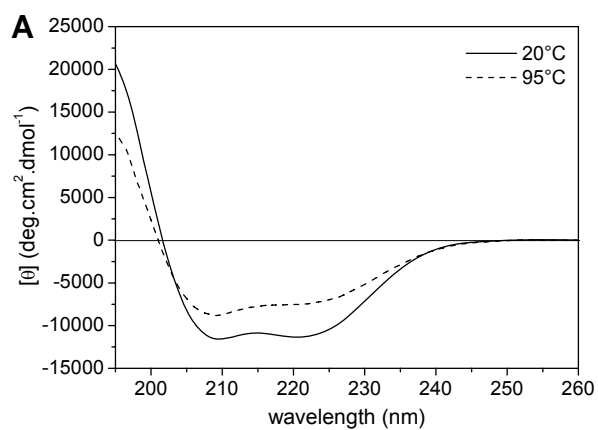
Fig. 6. Fluorescence analysis of AgB8 oligomers. (A) Intrinsic fluorescence of tryptophan excited at 280 nm was analyzed in the 300-400 nm range; AgB8/2 unf. (unfolded control, solid line); AgB8/2 (dashed line); AgB (dotted line). (B) Fluorescence emission spectra of AgB8/1 and AgB8/3, acquired at an excitation wavelength of 274 nm; AgB8/1 unf. (unfolded control, solid line); AgB8/1 (dashed line); AgB8/3 (dotted line). AgB8/2 or AgB8/1 oligomers denaturated with 6 M guanidine-HCl were used as unfolded controls.

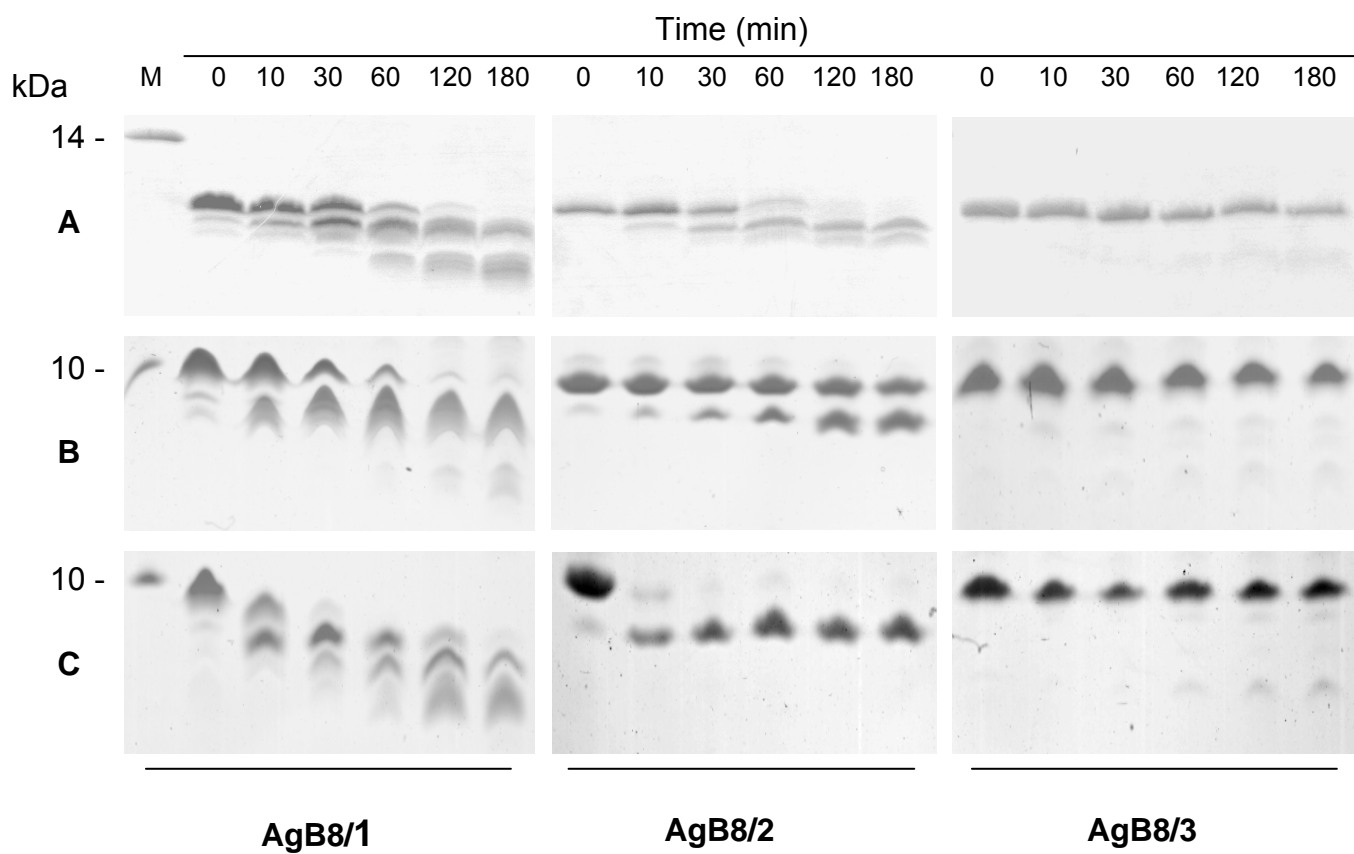
Fig. 7. Surface electrostatic potential calculations with the APBS software for AgB subunits (A) AgB8/1, (B) AgB8/2 and (C) AgB8/3. High (negative) and low (positive) electronic density surfaces are indicated by different tones, from light gray to black, respectively. Bubble volumes are proportional to electrostatic potential, with the smaller ones evidencing neutral (hydrophobic) regions. The models are oriented from their N to C-terminal ends from left to right, and in a view that favors the visualization of the hydrophobic face.

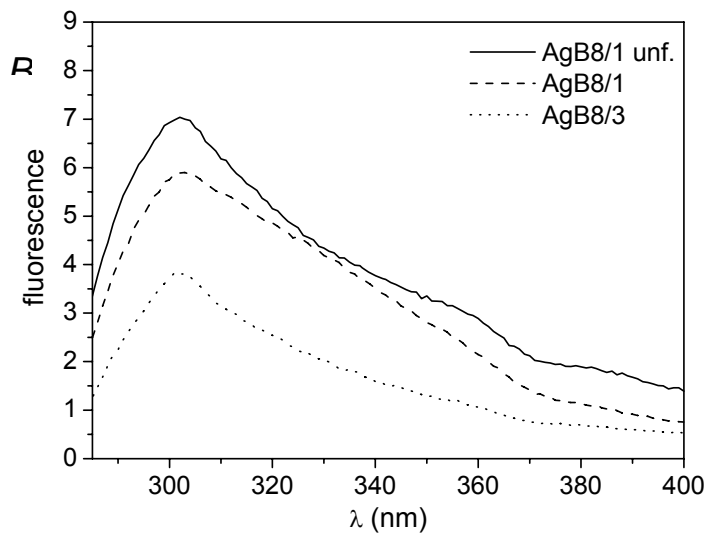
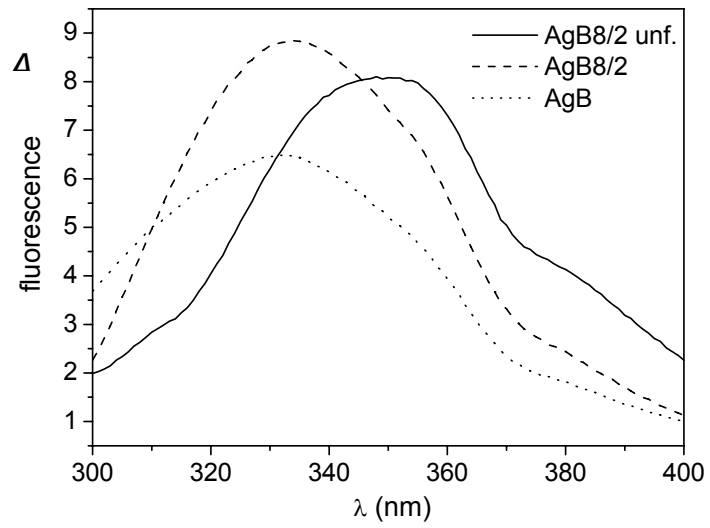


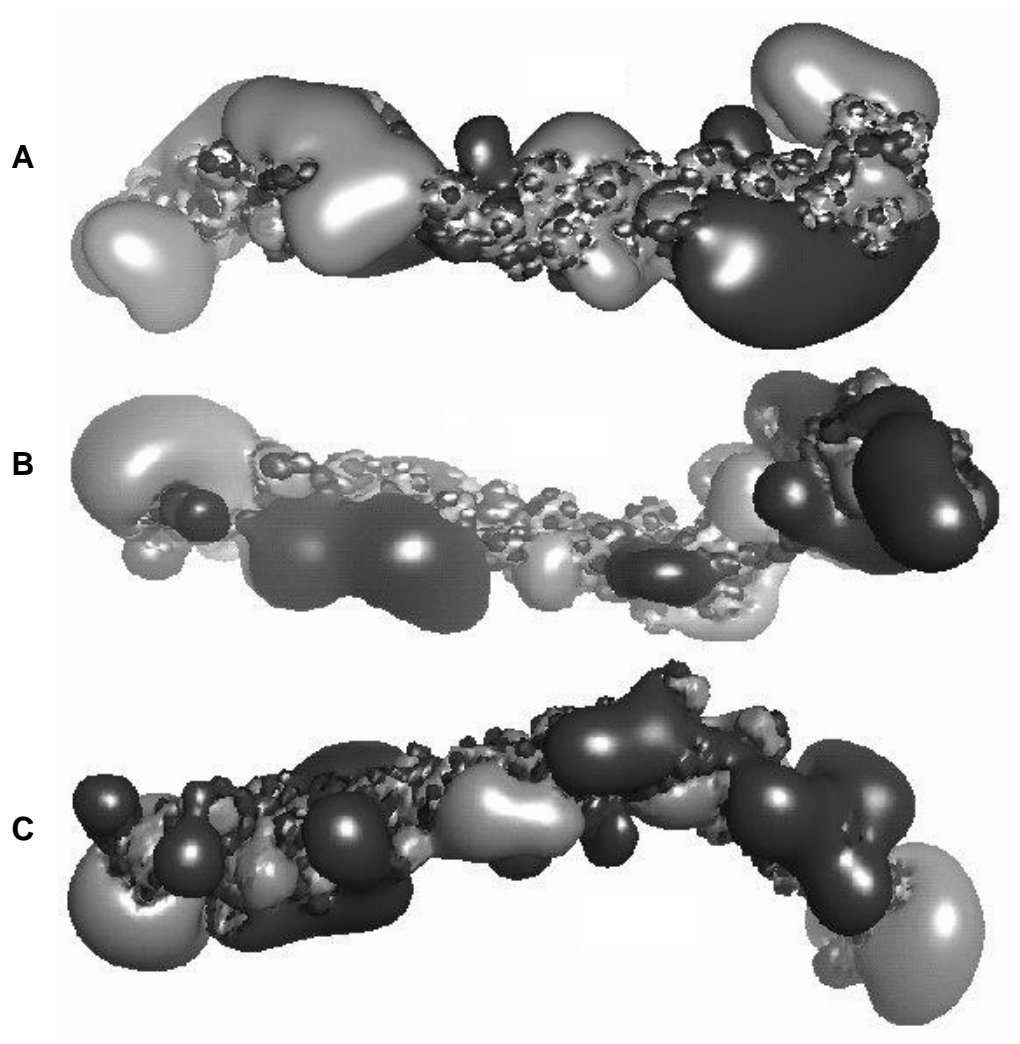












CAPÍTULO II

Tentativas de cristalização de oligômeros recombinantes de AgB8/3

Neste capítulo, são apresentadas as tentativas de cristalização de oligômeros recombinantes de AgB8/3. Nas triagens iniciais das condições de cristalização foram testadas 288 condições de *kits* comerciais, onde foram obtidos três cristais. Os cristais de melhor qualidade foram submetidos à difração de raios X, apresentando resoluções máximas de 8 Å. Embora não tenha sido possível a coleta de dados estruturais da proteína devido à baixa resolução da difração, as condições iniciais de cristalização podem ser refinadas para a obtenção de cristais de melhor qualidade.

1. Material e Métodos

1.1. Produção e purificação de oligômeros de AgB8/3

A metodologia referente à produção e purificação da subunidade recombinante AgB8/3 está descrito no CAPÍTULO I, seção *Material and Methods, Protein expression and purification*.

1.2. Separação dos oligômeros de AgB8/3

Os oligômeros foram, inicialmente, separados em cromatografia de gel filtração Superdex 200 HR 16/60 no sistema Äkta FPLC, com fluxo de 0,5 ml/min à temperatura ambiente, e a absorbância foi monitorada à 280 nm. As frações foram analisadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS), como descrito no CAPÍTULO I, seção *Material and Methods, Dynamic light scattering measurements (DLS)*, e aquelas que apresentaram menor polidispersão, ou seja, maior homogeneidade, foram escolhidas para a triagem de cristalização. Essas frações foram, então, misturadas e concentradas para uma concentração final de 11,5 mg/ml em PBS.

1.3. Cristalização de oligômeros recombinantes de AgB8/3

O método utilizado para a cristalização da proteína foi o de difusão de vapor por gota pendurada (Fowles *et al.*, 1988). Para o *screening* das condições de cristalização foram utilizados os *kits* comerciais de cristalização da Hampton Research, Crystal ScreenTM, Crystal Screen2TM e IndexTM, e os *kits* da Emerald BioStructures, Wizard ITM e Wizard IITM, totalizando 288 condições. Os *kits* Crystal ScreenTM e WizardTM são baseados no método de *sparse matrix screen*

(Jancarik & Kim, 1991), enquanto o kit IndexTM combina características das metodologias *Grid Screen*, *sparse matrix* e *incomplete factorial*. Foram utilizados 200 μ l de solução por poço e a gota de cristalização consistiu na proporção proteína/solução de 2:2 (μ l: μ l). Os ensaios foram realizados em placas de 48 poços à 18°C. Os cristais foram visualizados em lupa e aqueles que apresentaram maior tamanho foram submetidos à difração de raios X.

1.4. Difração de raios X

Os cristais selecionados foram coletados com alça de náilon e transferidos para soluções crioprotetoras (solução do poço acrescida e etilenoglicol para uma concentração final de 10%), a não ser em casos que a solução do poço já contivesse compostos crioprotetores. Os cristais foram congelados rapidamente (*flash-frozen*) através de exposição ao jato de nitrogênio do gerador de raios X. Os dados de difração foram coletados a 100K utilizando a linha de raios X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas.

2. Resultados

2.1. Produção e purificação de oligômeros de AgB8/3

Os resultados da produção e purificação dos oligômeros de AgB8/3 encontram-se no CAPÍTULO I, seção *Material and Methods, Protein expression and purification*.

2.2. Separação dos oligômeros de AgB8/3

As frações da gel filtração correspondentes aos volumes de eluição 72,5 ml até 79,5 ml apresentaram menor polidispersão na análise por DLS (~11-12%), sendo, portanto, escolhidas para utilização nos ensaios de cristalização. Essas frações correspondem ao menor oligômero de AgB8/3 (Fig. 1).

2.3. Cristalização dos oligômeros recombinantes de AgB8/3

A partir do *screening* inicial de cristalização foram obtidos cristais em três diferentes condições (Fig. 2). Os cristais obtidos na condição 19 do *kit* Crystal Screen (0,2 M acetato de amônia; 0,1 M Tris-Cl, pH 8,5; 30% v/v 2-propanol) formaram-se em menos de 24 h, apresentando-se como vários cristais hexagonais de pequeno tamanho. Na condição 1 do mesmo *kit* (0,02M cloreto de cálcio dihidratado; 0,1 M acetato de sódio trihidratado, pH 4,6; 30% v/v (+/-)-2-metil-2,4-pentanediol) e na condição 24 do *kit* Crystal Screen2 (0,05M cloreto de césio; 0,1M MES, pH 6,5; 30% v/v Jeffamine[®] M-600), formaram-se, em 7 dias e aproximadamente 2 meses, respectivamente, cristais maiores e de melhor qualidade. Estes dois últimos cristais foram, então, analisados em experimentos de difração de raios X.

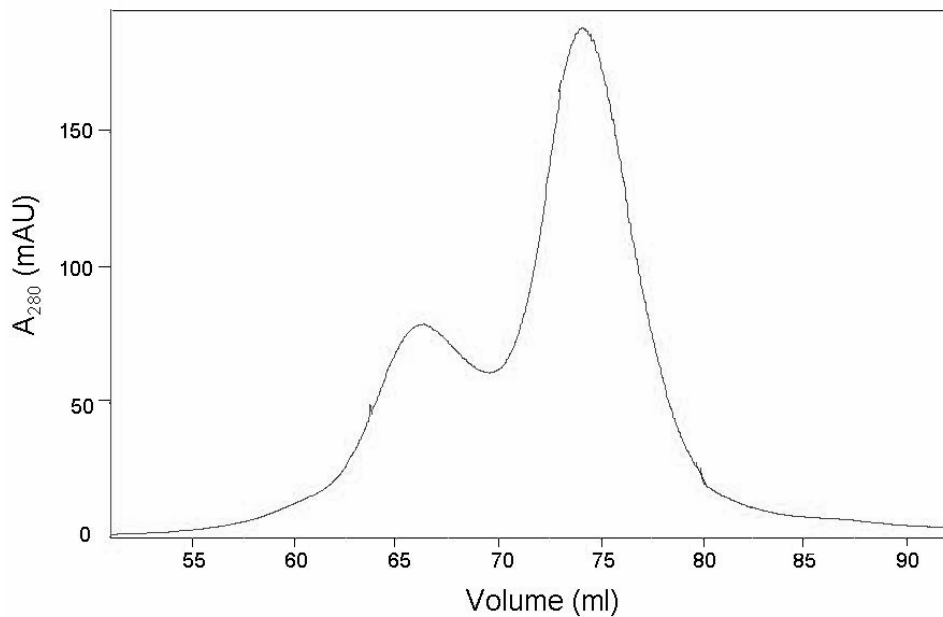


Figura 1. Gel filtração do oligômero de AgB8/3. Perfil de eluição de AgB8/3 na coluna Superdex 200 HR 16/60. As frações correspondentes aos volumes de eluição 72,5 até 79,5 ml foram utilizadas nos ensaios de cristalização do oligômero.

2.4. Difração de raios X

Os cristais preliminares de oligômeros de AgB8/3, obtidos nas triagens de condições iniciais de cristalização, que apresentaram maior tamanho (Fig. 2 B e C) foram testados em experimentos de difração de raios X. Estes cristais difrataram a resoluções máximas de 8 Å, apresentando, portanto, resolução insuficiente para permitir a obtenção de dados estruturais da proteína.

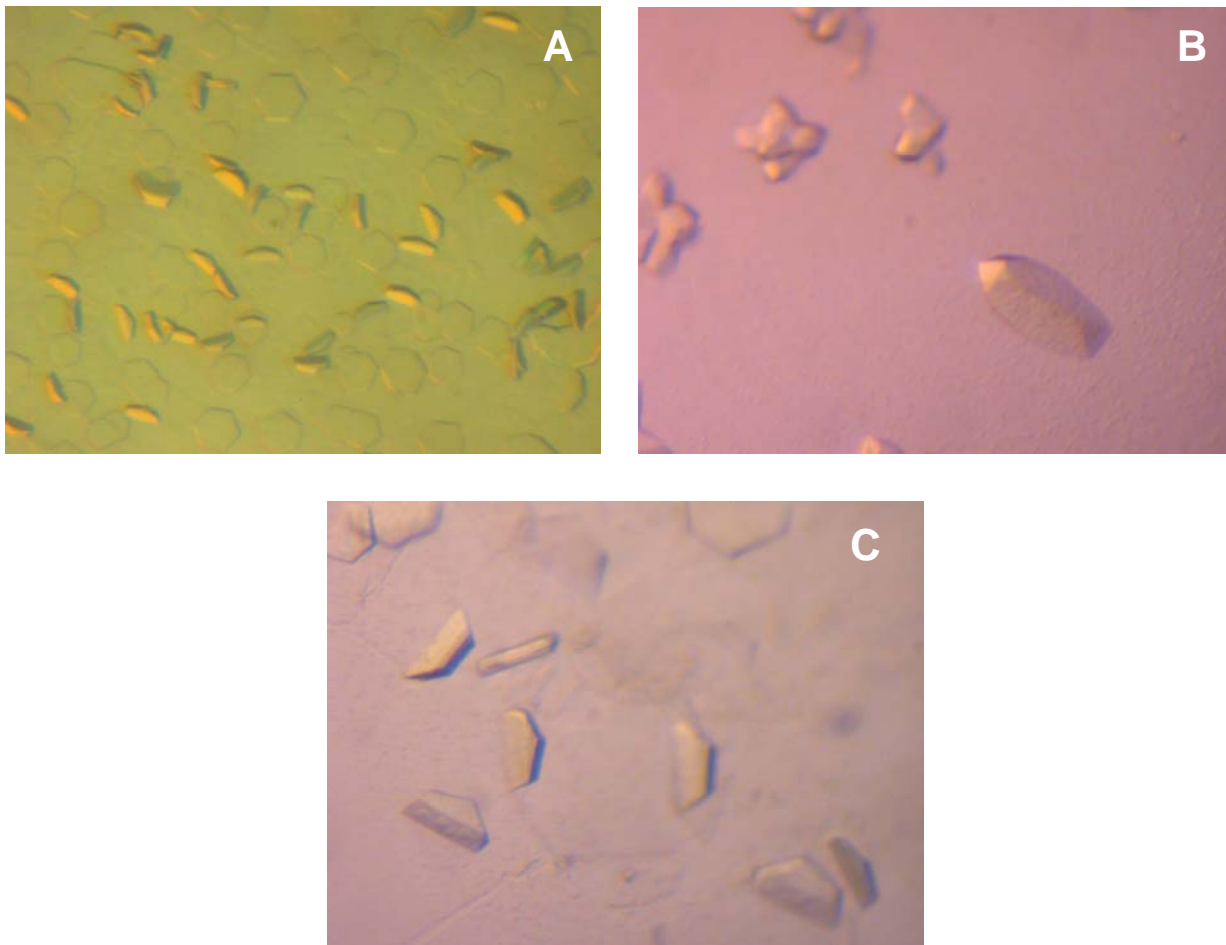


Figura 2. Cristais de oligômeros de AgB8/3 obtidos pelo método de difusão de vapor em gota pendurada à 18°C. (A) Crystal Screen, condição 19 (0,2 M acetato de amônia; 0,1 M Tris-Cl, pH 8,5; 30% v/v 2-propanol); (B) Crystal Screen, condição 1 (0,02M cloreto de cálcio dihidratado; 0,1 M acetato de sódio trihidratado, pH 4,6; 30% v/v (+/-)-2-metil-2,4-pentanediol); (C) Crystal Screen2, condição 24 (0,05M cloreto de céσιο; 0,1M MES, pH 6,5; 30% v/v Jeffamine[®] M-600). Aumento de 10X.

3. Discussão geral e conclusões

Nossos resultados mostraram que as subunidades recombinantes do AgB, AgB8/1, AgB8/2 e AgB8/3, são capazes de formar homo-oligômeros com características estruturais semelhantes à da proteína purificada de líquido hidático, como massa molecular, tendência agregativa, conteúdo de estrutura secundária e termoestabilidade. Através da modelagem molecular das subunidades do AgB, foi possível calcular a superfície de potencial eletrostático das mesmas, permitindo a inferência de um mecanismo de oligomerização envolvendo interações eletrostáticas e hidrofóbicas de α -hélices anfifílicas.

Nosso modelo de oligomerização das subunidades do AgB é reforçado pelo fato do efeito hidrofóbico ser a principal força atuante nas associações proteína-proteína durante a oligomerização de moléculas (Young *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 1997). As conseqüências do efeito hidrofóbico em monômeros de proteínas oligoméricas podem também ser observadas na disparidade das freqüências dos aminoácidos entre as interfaces e o resto da superfície, com os resíduos hidrofóbicos apresentando uma tendência de ocorrer na interface mais do que em contato com o solvente, enquanto os resíduos polares geralmente preferem o contato com o solvente (Ponstingl *et al.*, 2005). Essa situação é ilustrada na modelagem da porção N-terminal da subunidade AgB8/1 (p38) por González & Cachau (2003), onde se percebe claramente uma distribuição preferencial de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície do monômero. Pelo nosso modelo de oligomerização, os resíduos hidrofóbicos localizariam-se preferencialmente na interface, enquanto os resíduos hidrofílicos ficariam em contato com o solvente, solvatando o oligômero.

Outro fator que corrobora nosso modelo de formação dos oligômeros de AgB, é a participação de α -hélices anfifílicas na formação de outras proteínas oligoméricas. Para a proteína dinamina, o cálculo da superfície de potencial eletrostático revelou a presença de α -hélices anfifílicas no domínio responsável pela oligomerização da molécula (Fig. 3.1), sugerindo o envolvimento de interações eletrostáticas e hidrofóbicas na formação do oligômero. A participação de interações hidrofóbicas foi confirmada pela análise de mutantes contendo a troca Ile697 por Ala697, o que diminui sensivelmente a oligomerização da molécula (Chugh *et al.*, 2006).

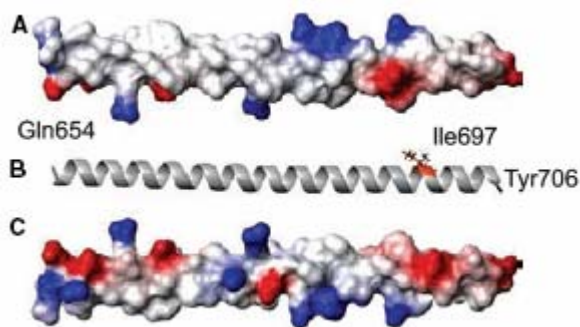


Figura 3.1. α -hélice anfifílica envolvida na oligomerização da proteína dinamina. (A) e (C) mostram duas faces opostas da hélice, e (B) mostra uma representação da α -hélice apontando o resíduo envolvido na oligomerização da molécula (Ile697). Em azul regiões com potencial positivo, em vermelho com potencial negativo e em branco as superfícies neutras. Modificado de Chugh *et al.* (2006).

A importância de interações anfifílicas para a formação da estrutura oligomérica da proteína α -cristalina, foi demonstrada através da interação da proteína com detergentes neutros e anfifílicos, observando-se uma redução na massa molecular da proteína oligomérica à medida que a concentração do detergente era aumentada, até a desrupção da estrutura em monômeros individuais (Aerts *et al.*, 1997). Essa abordagem demonstra a importância de interações polares e não-polares na estrutura secundária, terciária e

quaternária da proteína, uma vez que detergentes contêm uma parte hidrofóbica que pode mimetizar as interações hidrofóbicas entre os peptídeos na estrutura oligomérica. A importância de interações polares pôde ser testada pelo uso de diferentes classes de detergentes polares. A participação efetiva de interações anfífilas na formação da α -cristalina reafirma o modelo proposto para o oligômero desta molécula (Fig. 3.2), baseado no modelo micelar onde moléculas anfífilas orientam-se de forma que suas regiões apolares sejam segregadas do solvente (Walsh *et al.*, 1991).

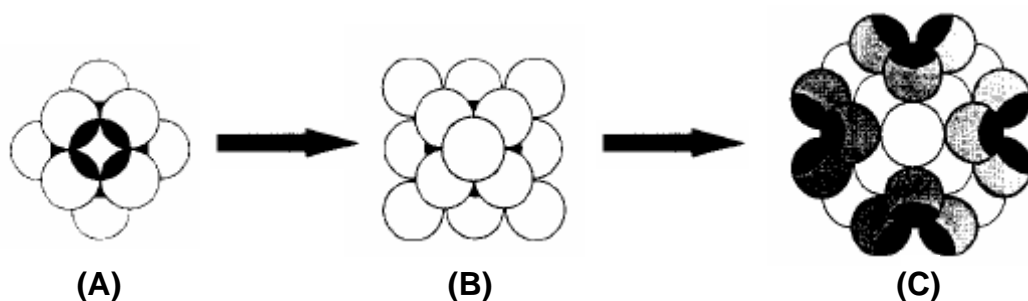


Figura 3.2. Modelo proposto para o oligômero da α -cristalina. (A) Primeira camada composta de 12 subunidades; (B) Primeira e segunda camadas, compreendendo 18 subunidades; (C) Primeira, segunda e terceira camadas, perfazendo um total de 42 subunidades. A porção hidrofóbica das subunidades é representada em preto. Modificado de Walsh *et al.* (1991).

A oligomerização de moléculas traz algumas vantagens em relação às formas monoméricas (D'Alessio, 1999; Ali & Imperiali, 2005). No caso do AgB, estas vantagens poderiam ser representadas pelo fato de uma molécula oligomérica ser capaz de esconder epítopos do sistema imune ou possuir múltiplos sítios de ligação à compostos hidrofóbicos, bem como apresentar uma maior estabilidade contra degradação e desnaturação.

Nossas análises também demonstraram uma maior compactação e estabilidade do oligômero de AgB8/3. Uma vez que esta subunidade apresenta maior tendência agregativa, compactação e estabilidade, e parece ter uma expressão constitutiva em protoescólices (Kamenetzky *et al.*, 2005a), ela poderia atuar como "centro de nucleação" dos oligômeros de AgB, a partir do qual outras subunidades se agregariam na formação de um possível hetero-oligômero.

A possibilidade da hetero-oligomerização das subunidades recombinantes do AgB não foi testada neste trabalho, devido ao fato de que as proteínas recombinantes purificadas são obtidas já sob a forma de homooligômeros, não sendo possível a mistura de subunidades para este fim. Experimentos de co-expressão serão, portanto, necessários para testar a interação entre diferentes subunidades na formação de uma estrutura heterooligomérica.

Para resolver a estrutura do AgB e elucidar seu mecanismo de oligomerização, foram realizadas, neste trabalho, tentativas de cristalização do oligômero recombinante de AgB8/3. A subunidade AgB8/3 foi escolhida para os ensaios de cristalização uma vez que apresenta maior rendimento na produção em *E. coli*, possibilitando o teste de um maior número de condições de cristalização. Os cristais obtidos não difrataram à resoluções suficientes para a coleta de dados, porém, as condições iniciais de cristalização podem ser refinadas para a obtenção de cristais de melhor qualidade.

4. Perspectivas

Este trabalho tem como perspectivas testar a possibilidade da hetero-oligomerização das subunidades recombinantes do AgB, através da co-expressão de subunidades. Caso as moléculas não se apresentem oligomerizadas no momento da sua expressão em fusão com a GST, a hetero-oligomerização pode ser verificada através da mistura dos sobrenadantes de cultura das diferentes subunidades e subsequente co-purificação. Com os hetero-oligômeros formados, pretende-se realizar uma caracterização estrutural semelhante à realizada neste trabalho para os homo-oligômeros.

O melhor entendimento da oligomerização do AgB, através de experimentos envolvendo mutagênese, deleções e interação com detergentes, utilizando os oligômeros recombinantes como modelo, pode ajudar no desenvolvimento de drogas que inibam ou interfiram com as interações proteína-proteína, levando à perda de função e/ou estabilidade da molécula (Zutshi *et al.*, 1996; Pérez-Montfort *et al.*, 2002). Já existem alguns esforços nestes sentido para proteínas virais, principalmente para a protease, integrase e transcriptase reversa de HIV (Schramm *et al.*, 1996; Sourgen *et al.*, 1996; Zutshi *et al.*, 1997), e enzimas de parasitos (Pérez-Montfort *et al.*, 2002).

É, também, uma importante perspectiva deste trabalho, a realização de *screenings* de cristalização com os homo-oligômeros de AgB8/1 e AgB8/2. Bem como, refinar as condições iniciais de cristalização dos oligômeros de AgB8/3, na tentativa de obter cristais de melhor qualidade para os ensaios de difração de raios X.

A expressão e o estudo comparativo de outras subunidades recombinantes do AgB é também uma perspectiva deste projeto.

5. Referências bibliográficas

- Aerts, T.; Clauwaert, J.; Haezebrouck, P.; Peeters, E.; Van Dael, H. Interaction of detergents with bovine lens α -crystallin: evidence for an oligomeric structure based on amphiphilic interactions, *Eur. Biophys. J.* 25: 445-454, 1997.
- Ali, M. H. & Imperiali, B. Protein oligomerization: How and why. *Bioorg. Med. Chem.* 13: 5013–5020, 2005.
- Ammann, R. W. & Eckert, J. Clinical diagnosis and treatment of echinococcosis in humans. *In: Echinococcus and hydatid disease.* Thompson, R. C. A. & Lymbery, A. J. (Eds.) CAB International, Wallingford, Oxon, pp. 411-463, 1995.
- Annen, J. M.; Kohler, P.; Eckert, J. Cytotoxicity of *Echinococcus granulosus* cyst fluid in vitro. *Z. Parasitenk.* 65: 79-88, 1981.
- Arend, A. C.; Zaha A.; Ayala, F. J.; Haag, K. L. The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. *Exp. Parasitol.* 108:76– 80, 2004.
- Baker, N. A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M. J.; McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 10037-10041, 2001.
- Barrett, J.; Saghir, N.; Timanova, A.; Clarke, K.; Brophy, P. M. Characterization and properties of an intracellular lipid-binding protein from the tapeworm *Moniezia expansa*. *Eur. J. Biochem.* 250: 269-275, 1997.
- Berendsen, H. J. C.; Potsma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Nola, A. D.; Kaak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81: 3684-3690, 1984.

- Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. The missing term in effective pair potential, *J. Chem. Phys.* 91: 6269-6271, 1987.
- Böhm, G.; Muhr, R.; Jaenicke, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks, *Protein Eng.* 5: 191-195, 1992.
- Bowles, J.; Blair, D.; McManus, D. P. Molecular genetic characterisation of the cervid strain ('northern form') of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 109: 215–221, 1994.
- Budke, C. M.; Deplazes, P.; Torgerson, P. R. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg. Infect. Dis.* 12(2): 296-303, 2006.
- Carmena, D.; Benito, A.; Eraso, E. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. *Acta Trop.* 98: 74-86, 2006.
- Cameron, T. W. M. & Webster, G. A. The histogenesis of the hydatid cyst (*Echinococcus spp.*). Part 1. Liver cysts in large mammals. *Can. J. Zool.* 47:1405-1410, 1969.
- Carmicle, S.; Dai, G.; Steede, N. K.; Landry, S. J. Proteolytic sensitivity and helper T-cell epitope immunodominance associated with the mobile loop in Hsp10s, *J. Biol. Chem.* 277: 155-160, 2002.
- Chemale, G.; Haag, K. L.; Ferreira, H. B.; Zaha, A. *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family, *Mol. Biochem. Parasitol.* 116: 233-237, 2001.
- Chemale, G.; Ferreira, H. B.; Barrett, J.; Brophy, P. M.; Zaha, A. *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties, *Biochim. Biophys. Acta.* 1747: 189-194, 2005.

- Chugh, J.; Chatterjee, A.; Kumar, A.; Mishra, R. K.; Mittal, R.; Hosur, R. V. Structural characterization of the large soluble oligomers of the GTPase effector domain of dynamin, *FEBS J.* 273: 388-397, 2006.
- Coltorti, E. & Varela-Díaz, V. M. IgG levels and host specificity in hydatid cyst fluid. *J. Parasitol.* 58: 753-756, 1972.
- D'Alessio, G. The evolutionary transition from monomeric to oligomeric proteins: tools, the environment, hypotheses. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72: 271-298, 1999.
- Darawshe, S.; Tsafadyah, Y.; Daniel, E. Quaternary structure of erythrocrucorin from the nematode *Ascaris suum*. Evidence for unsaturated haem-binding sites, *Biochem. J.* 242: 689-694, 1987.
- Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: an Nlog(N) method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.* 98: 10089-10092, 1993.
- De la Rue, M. L.; Silva, K. L. M. V.; Dinkel, A.; Mackenstedt, U.; Romig, T. New data on *Echinococcus* spp. in southern Brazil. *Int. Arch. Hydatidosis* 35, 61, 2004
- Díaz, A.; Irigoín, F.; Ferreira, F.; Sim, R. B.; Control of host complement activation by *Echinococcus granulosus* hydatid cyst. *Immunopharmacology*, 42: 91-98, 1999.
- Eckert, J.; Deplazes, P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern, *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 107-135, 2004.
- Fernández, V.; Ferreira, H. B.; Fernández, C.; Zaha, A.; Nieto, A. Molecular characterization of a novel 8 kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B, *Mol. Biochem. Parasitol.* 77: 247-250, 1996.

- Ferreira, A. M.; Irigoín, F.; Breijo, M.; Sim, R. B.; Díaz, A. How *Echinococcus granulosus* deal with complement. *Parasitol. Today*, 16(4): 168-172, 2000.
- Ferreira, H. B.; Chemale, G.; Zaha, A. Structural, functional, and immunological aspects of *Echinococcus granulosus* (Platyhelminthes, Cestoda) antigen B. *Cur. Top. Biochem. Res.* 6: 37-46, 2004.
- Fontana, A.; de Laureto, P. P.; Spolaore, B.; Frare, E.; Picotti, P.; Zambonin, M. Probing protein structure by limited proteolysis, *Acta Biochim. Pol.* 51: 299-321, 2004.
- Frayha, G. J. & Haddad, R. Comparative chemical composition of protoescoleces and hydatid cysts fluid of *Echinococcus granulosus* (Cestoda). *Int. J. Parasitol.* 10: 359-364, 1980.
- Frosch, P.; Hartmann, M.; Mühlischlegel, F.; Frosch, M. Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64: 171-175, 1994.
- Fowles, W. W.; DeLucas, L. J.; Twigg, P. J.; Howard, S. B.; Meehan, E. J. Jr.; Baird, J. K. Experimental and theoretical analysis of the rate of solvent equilibration in the hanging drop method of protein crystal growth. *J. Cryst. Growth.* 90: 117-129, 1988.
- Gauci, C.; Heath, D.; Chow, C.; Lightowers, M. W. Hydatid disease: vaccinology and development of the EG95 recombinant vaccine. *Expert Rev. Vaccines* 4: 103-112, 2005.
- González, G. & Cachau, R. E. Identification of critical residues of an immunodominant region of *Echinococcus granulosus* antigen B, *J. Biol. Chem.* 278: 20179-20184, 2003.

González, G.; Nieto, A.; Fernández, C.; Örn, A.; Wernstedt, C.; Hellman, U. Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B, *Parasite Immunol.* 18: 587-596, 1996.

González-Sapienza, G.; Lorenzo, C.; Nieto, A. Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* antigen B. *J. Clin. Microol.* 38(11): 3979-3983, 2000.

Haag, K. L.; Araújo, A. M.; Gottstein, B.; Zaha, A. Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93(5): 695-702, 1998.

Haag, K. L.; Araujo, A. M.; Gottstein, B.; Siles-Lucas, M.; Thompson, R. C.; Zaha, A. Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): selfing or outcrossing? *Parasitology.* 118(1): 63-71, 1999.

Haag, K. L.; Alves-Junior, L.; Zaha, A.; Ayala, F. J. Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. *Gene* 333: 157-167, 2004.

Hammerberg, B.; Musoke, A. J.; Williams, J. F. Activation of complement by hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.* 63(2): 327-331, 1977.

Hess, S. R.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. LINCS: a linear constraint solver for molecular dynamics, *J. Comp. Chem.* 18: 1463-1472, 1997.

- Janssen, D.; Rueda, M. C.; De Rycke, P. H.; Osuna, A. Immunomodulation by hydatid cyst fluid toxin (*Echinococcus granulosus*). *Parasite Immunol.* 19(4): 149-160, 1997.
- Jenkins, D. J.; Romig, T.; Thompson, R. C. A. Emergence/re-emergence of *Echinococcus spp.* – a global update, *Int. J. Parasitol.* 35: 1205-1219, 2005.
- Kamenetzky, L.; Muzulin, P. M.; Camicia, F.; Zaha, A.; Gutierrez, A. M.; Lujan, H. D.; Rosenzvit, M. C. Analysis of the antigen B expression profile in *Echinococcus granulosus*. VII Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, Mendoza, Argentina, 2005a.
- Kamenetzky, L.; Muzulin, P. M.; Gutierrez, A. M.; Angel, S. O.; Zaha, A.; Guarnera, E. A.; Rosenzvit, M. C. High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology.* 131(6): 805-815, 2005b.
- Koth, C. M.; Orlicky, S. M.; Larson, S. M.; Edwards, A. M. Use of limited proteolysis to identify protein domains suitable for structural analysis, *Methods Enzymol.* 368: 77-84, 2003.
- Lightowers, M. W.; Liu, D.; Haralambous, A.; Rickard, M. D. Subunit composition and specificity of major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 37: 171-182, 1989.
- Lightowers, M. W. & Gottstein, B. Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. *In: Echinococcus and hydatid disease.* Thompson, R. C. A. & Lymbery, A. J. (Eds.) CAB International, Wallingford, Oxon, pp. 355-410, 1995.
- Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D. GROMACS 3.0, *J. Mol. Model.* 7: 306-317, 2001.

- Lorenzo, C. ; Ferreira, H. B.; Monteiro, K. M.; Rosenzvit, M.; Kamenetzky, L.; García, H. H.; Vasquez, Y.; Naquira, C.; Sánchez, E.; Lorca, M.; Contreras, M.; Last, J. A.; González-Sapienza, G. G. Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study, *J. Clin. Microbiol.* 43: 2764-2770, 2005.
- Lymbery, A. J.; Hobbs, R. P.; Thompson, R. C. A. The dispersion of *Echinococcus granulosus* in the intestine of dogs. *J. Parasitol.* 75(4): 562-570, 1989.
- Macintyre, A. R.; Dixon, J. B.; Green, J. R. Mitosis and differentiation in T-cells under cytotoxic action of *Echinococcus granulosus* hydatid fluid. *Vet. Parasitol.* 96: 277-289, 2001.
- Maddison, S. E.; Slemenda, S. B.; Schantz, P. M.; Fried, J. A.; Wilson, M.; Tsang, V. C. W. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 377-383, 1989.
- Mamuti, W.; Sako, Y.; Xiao, N.; Nakaya, K.; Nakao, M.; Yamasaki, H.; Lightowlers, M. W.; Craig, P. S.; Ito, A. *Echinococcus multilocularis*: Developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa-subunits, *Exp. Parasitol.* 113: 75-82, 2006.
- Manderson, D.; Dempster, R.; Chisti, Y. A recombinant vaccine against hydatidosis: production of the antigen in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33(3): 173-182, 2006.
- McManus, D. P.; Zhang, W.; Li, J.; Bartley, P. B. Echinococcosis. *Lancet.* 362: 1295-1304, 2003

- Miyamoto, S. & Kollmann, P. A. SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithms for rigid water models, *J. Comp. Chem.* 13: 952-962, 1992.
- Morris, D. L. & Richards, K. S. Hydatid disease. Current medical and surgical management. Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, United Kingdom, 1992.
- Murby, M.; Uhlén, M.; Stahl, S. Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*, *Protein. Expr. Purif.* 7: 129-136, 1996.
- Musiani, P.; Piantelli, M.; Lauriola, L.; Arru, E.; Pozzuoli, R. *Echinococcus granulosus*: specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids. *J. Clin. Pathol.* 31: 475-478, 1978.
- Oriol, R.; Williams, J. F.; Esandi, M. V. P.; Oriol, C. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20: 569-574, 1971.
- Oriol, C. & Oriol, R. Physiocochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 96-100, 1975.
- Ortona, E.; Riganò, R.; Buttari, B.; Delunardo, F.; Ioppolo, S.; Margutti, P.; Profumo, E.; Teggi, A.; Vaccari, S.; Siracusano, A. An update on immunodiagnosis of cystic echinococcosis. *Acta Trop.* 85: 165-171, 2003.
- Pawlowski, Z. S.; Eckert, J.; Vuitton, D. A.; Ammann, R. W.; Kern, P.; Craig, P. S.; Dar, K. F.; De Rosa, R.; Filice, C.; Gottstein, B.; Grimm, F.; Macpherson, C. N. L.; Sato, N.; Todorov, T.; Uchino, J.; von Sinner, W.; Wen, H. Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment. *In: Manual on Echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern.* Eckert, J.; Gemmel, M. A.; Meslin, F. X.; Pawlowski, Z. S. (Eds.) WHO/OIE, Paris, pp. 20-40, 2001.

- Pérez-Montfort, R.; de Gómez-Puyou, M. T.; Gómez-Puyou, A. The interfaces of oligomeric proteins as targets for drug design against enzymes from parasites, *Curr. Top. Med. Chem.* 2: 457-470, 2002.
- Piantelli, M.; Pozzuoli, R.; Arru, E.; Musiani, P. *Echinococcus granulosus*: identification of subunits of the major antigens. *J. Immunol.* 119(4): 1382-1386, 1977.
- Ponstingl, H.; Kabir, T.; Gorse, D.; Thornton, J. M. Morphological aspects of oligomeric protein structures. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 89: 9–35, 2005.
- Rickard, M. D.; Davies, C.; Bout, D. T.; Smyth, J. D. Immunohistological localization of two hydatid antigens (antigen 5 and antigen B) in the cyst wall, brood capsules and protoscoleces of *Echinococcus granulosus* (ovine and equine) and *E. multilocularis* using immunoperoxidase methods. *J. Helminthol.* 51: 359-364, 1977.
- Riganò, R.; Profumo, E.; Bruschi, F.; Garulli, G.; Azzara, A.; Ioppolo, S.; Buttari, B.; Ortona, E.; Margutti, P.; Teggi, A.; Siracusano, A. Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses, *Infect. Immun.* 69: 288-296, 2001.
- Riganò, R.; Ioppolo, S.; Ortona, E.; Margutti, P.; Profumo, E.; Ali, M. D.; Di Vico, B.; Teggi, A.; Siracusano, A. Longterm serological evaluation of patients with cystic echinococcosis treated with benzimidazole carbamates, *Clin. Exp. Immunol.* 129: 485-492, 2002.
- Rodrigues-Silva, R.; Peixoto, J. R. V.; Oliveira, R. M. F.; Pinto, R. M.; Gomes, D. C. An autochthonous case of *Echinococcus vogeli* Rausch & Bernstein, 1972 polycystic Echinococcosis in the state of Rondônia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97(1): 123-126, 2002.

- Rott, M. B.; Fernández, V.; Farias, S.; Ceni, J.; Ferreira, H. B.; Haag, K. L.; Zaha, A. Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequence, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation, *Acta Trop.* 75: 331-340, 2000.
- Saghir, N.; Conde, P. J.; Brophy, P. M.; Barrett, J. A new diagnostic tool for neurocysticercosis is a member of a cestode specific hydrophobic ligand binding protein family. *FEBS Lett.* 487: 181-184, 2000.
- Sánchez, F.; March, F.; Mercader, M.; Coll, P.; Muñoz, C.; Prats, G. Immunochemical localization of major hydatid fluid antigens in protoscoleces and cysts of *Echinococcus granulosus* from human origin. *Parasite Immunol.* 13: 583-592, 1991.
- Sánchez, F.; Garcia, J.; March, F.; Cardeñosa, N.; Muñoz, C.; Auladell, C.; Prats, G. Ultrastructural localization of major hydatid fluid antigens in brood capsules and protoscoleces of *Echinococcus granulosus* of human origin. *Parasite Immunol.* 15: 441-447, 1993.
- Schantz, P.; Chai, J.; Craig, P.S.; Eckert, J.; Jenkins, D.J.; Macpherson, C.N.L.; Thakur, A. Epidemiology and control of hydatid disease. In: *Echinococcus and hydatid disease*. Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (Eds.), CAB International, Wallingford, Oxon, pp. 232–331, 1995.
- Schmitz, K. S. *An introduction to dynamic light scattering by macromolecules*, Academic Press, San Diego, California, 1990.
- Schramm, H. J.; Boetzel, J.; Buttner, J.; Frltsche, E.; Gohring, W.; Jaeger, E.; Konig, S.; Thumfari, O.; Wenger, T.; Nagel, N. E.; Schramm, W. The inhibition of human immunodeficiency virus proteases by interface peptides. *Antiviral Res.* 30: 155-170, 1996.

- Shapiro, S. Z.; Bahr, G. M.; Hira, P. R. Analysis of host components in hydatid cyst fluid and immunoblot diagnosis of human *Echinococcus granulosus* infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86(5): 503-509, 1992.
- Shepherd, J. C.; Aitken, A.; McManus, D. P. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis, *Mol. Biochem. Parasitol.* 44: 81-90, 1991.
- So, T.; Ito, H.; Koga, T.; Watanabe, S.; Ueda, T.; Imoto, T. Depression of T-cell epitope generation by stabilizing hen lysozyme, *J. Biol. Chem.* 272: 32136-32140, 1997.
- Sourgen, F.; Maroun, R. G.; Frere, V.; Bouziane, M.; Auclair, C.; Troalen, F.; Femandjlan, S. A synthetic peptide from the human immunodeficiency virus type-I integrase exhibits coiled-coil properties and interferes with the in vitro integration activity of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 240: 765-773, 1996.
- Steers, N. J.; Rogan, M. T.; Heath, S. In-vitro susceptibility of hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* to nitric oxide and the effect of the laminated layer on nitric oxide production, *Parasite Immunol.* 23(8): 411-417, 2001.
- Teggi, A. & DiVico, B. 2002. The natural history of human cystic echinococcosis (CE) by imaging methods, *In: Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis, an emergent and global problem*, Craig, P. & Pawlowski, Z. (Eds.), IOS Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 125-134, 2002
- Thompson, R. C. A. & Lymbery, A. J. *Echinococcus*: biology and strain variation. *Int. J. Parasitol.* 20: 457-470, 1990.
- Thompson, R. C. A. Biology and systematics of *Echinococcus*. *In: Echinococcus and hydatid disease*. Thompson, R. C. A. & Lymbery, A. J. (Eds), CAB International, Wallingford, United Kingdom, pp. 1-50, 1995.

- Thompson, R. C. A. & McManus, D. P. Aetiology: parasites and life cycles. *In: Manual on Echinococcus in Humans and Animals a Public Health Problem of Global Concern*. Eckert, J., Gemmell, M. A., Meslin, F. X., Pawlowski, Z. S. (Eds.), WHO/OIE, Paris, pp. 1–19, 2001
- Thompson, R. C. A. & McManus, D. P. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitol.* 18: 452–457, 2002.
- Torgerson, P. R. Economic effects of echinococcosis. *Acta Trop.* 85: 113-118, 2003.
- Torgerson, P. R. & Budke, C. M. Echinococcosis – an international public health challenge. *Res. Vet. Sci.* 74: 191-202, 2003.
- Tsai, C. J.; Lin, S. L.; Wolfson, H. J.; Nussinov, R. Studies of protein-protein interfaces: a statistical analysis of the hydrophobic effect, *Protein Sci.* 6: 53-64, 1997.
- Verster, A. J. M. Review of *Echinococcus* species in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 32: 7–118, 1965.
- Virginio, V. G.; Hernández, A.; Rott, M. B.; Monteiro, K. M.; Zandonai, A. F.; Nieto, A.; Zaha, A.; Ferreira, H. B. 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, 2003.
- Walsh, M. T.; Sen, A. C.; Chakrabart, B. Micellar subunit assembly in a three-layer model of oligomeric α -crystallin, *J. Biol. Chem.* 266: 20079-20084, 1991.
- Werczberger, A.; Golhman, J.; Wertheim, G.; Gunders, A. E.; Chowes, I. Disseminated echinococcosis with repeated anaphylactic shock (treated with mebendazole). *Chest.* 76: 482-484, 1979.

- Williams, R. J. & Sweatman, G. K. On the transmission, biology and morphology of *Echinococcus granulosus equinus*, a new subspecies of hydatid tapeworm in horses in Great Britain. *Parasitology* 53: 391–407, 1963.
- Xiao, N.; Qiu, J.; Nakao, M.; Li, T.; Yang, W.; Chen, X.; Schantz, P. M.; Craig, P. S.; Ito, A. *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China, *Int. J. Parasitol.* 35: 693-701, 2005.
- Xiao, N.; Qiu, J.; Nakao, M.; Li, T.; Yang, W.; Chen, X.; Schantz, P. M.; Craig, P. S.; Ito, A. *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: Discovery and epidemiological implications, *Parasitol. Int.* 55: 8233-8236, 2006.
- Yarzabal, L. A.; Dupas, H.; Bout, D.; Naquira, F.; Capron, A. *Echinococcus granulosus*: the distribution of hydatid fluid antigens in the tissues of the larval stage. II. Localization of the thermostable lipoprotein of parasitic origin (Antigen B). *Exp. Parasitol.* 42: 115-120, 1977.
- Young, L.; Jernigan, R. L.; Covell, D. G. A role for surface hydrophobicity in protein–protein recognition, *Protein Sci.* 3: 717-729, 1994.
- Zhang, W.; Li, J.; McManus, D. P. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease, *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 18-36, 2003.
- Zhang, W & McManus, D. P. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47: 24-41, 2006.
- Zutshi, R.; Brickner, M.; Chmielewski, J. Inhibiting the assembly of protein-protein interfaces, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 62-66, 1996.

Zutshi, R.; Franciskovich, J.; Shultz, M.; Schweitzer, B.; Bishop, P.; Wilson, M.; Chmielewski, J. Targeting the dimerization interface of HIV-1 protease: inhibition with crosslinked interfacial peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 4841-4845, 1997.

Curriculum vitae – resumo

Monteiro, K. M.

1. Dados Pessoais

Nome: Karina Mariante Monteiro

Nascimento: Porto Alegre, RS – 13/07/1981

Endereço profissional: Centro de Biotecnologia, UFRGS.

Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43421, salas
204/206, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS

Telefone profissional: (51) 3316-6070

E-mail: karina@cbiot.ufrgs.br

2. Formação

Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 2004.

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Previsão de término, outubro de 2006.

3. Cursos

Curso Teórico/Prático sobre Expressão de Proteínas Recombinantes em *Escherichia coli*, promovido pela Red de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Parasitarias del Cono Sur de América Latina (RTPD Network), no período de 15 a 20 de outubro de 2001, em Porto Alegre, RS, Brasil.

Curso "Introdução à Espectrometria de Massas", promovido pelo Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), no período de 24 a 25 de maio de 2005, em Campinas, SP, Brasil.

Curso "Métodos Avançados de Estudos em Parasitologia", oferecido do XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, de 31 de outubro a 4 de novembro de 2005, em Porto Alegre, RS, Brasil.

4. Estágios

Período: março de 2001 a fevereiro de 2002

Local: Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, UFRGS

Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira

Projeto: "Desenvolvimento de um kit imunodiagnóstico para a hidatidose humana e caracterização estrutural e funcional de antígenos recombinantes de *Echinococcus granulosus*"

Bolsa: Bolsa de Iniciação Científica FAPERGS

Período: março de 2002 a julho de 2002

Local: Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, UFRGS

Orientador: Arnaldo Zaha

Projeto: "Caracterização da família de genes que codifica o antígeno B de *Echinococcus granulosus*"

Bolsa: Bolsa de Iniciação Científica FAPERGS

Período: agosto de 2002 a fevereiro de 2005

Local: Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, UFRGS

Orientador: Arnaldo Zaha

Projeto: "Caracterização estrutural, funcional e imunológica de antígenos recombinantes de *Echinococcus granulosus*"

Bolsa: Bolsa de Iniciação Científica PIBIC/CNPq

5. Artigos publicados ou submetidos à publicação

Virginio, V. G.; Hernández, A.; Rott, M. B.; **Monteiro, K. M.**; Zandonai, A. F.; Nieto, A.; Zaha, A.; Ferreira, H. B. A Set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potencial for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 132: 309-315, 2003.

Lorenzo, C.; Ferreira, H. B.; **Monteiro, K. M.**; Rosenzvit, M.; Kamenetzky, L.; García, H.; Vasquez, Y.; Naquira, C.; Sánchez, E.; Lorca, M.; Contreras, M.; Last, J.; González-Sapienza, G. Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind randomized multi-center study. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6): 2764-2770, 2005.

Monteiro, K. M.; Scapin, S. M. N.; Navarro, M. V. A. S.; Zanchin, N. I. T.; Cardoso, M. B.; da Silveira, N. P.; Gonçalves, P. F. B.; Stassen, H. K.; Zaha, A.; Ferreira, H. B. Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. Submetido à revista *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, setembro de 2006.

6. Resumos e trabalhos apresentados em congressos científicos

Monteiro, K. M.; Virginio, V. G.; Zaha, A.; Ferreira, H. B. Avaliação do potencial sorológico de antígenos recombinantes de *Echinococcus granulosus* para o imunodiagnóstico da hidatidose humana. XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre, 2001.

Virginio, V. G.; Hernández, A.; **Monteiro, K. M.**; Zandonai, A. F.; Zaha, A.; Ferreira, H. B. A set of recombinant antigens from *Echinococcus*

granulosus with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. In: XXXI Reunião Anual da SBBq, Caxambu, 2002.

Monteiro, K. M.; Virginio, V. G.; Ferreira, H. B.; Zaha, A. Avaliação do potencial imunodiagnóstico para a hidatidose humana de antígenos nativos de *Echinococcus granulosus*. XIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre, 2002.

Monteiro, K. M.; Virginio, V. G.; Iesbich, M.; Ferreira, H. B.; Zaha, A. Desenvolvimento de um kit imunodiagnóstico para a hidatidose humana baseado em antígenos recombinantes de *Echinococcus granulosus*. XV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre, 2003.

Monteiro, K. M.; Lorenzo, C.; González-Sapienza, G.; Ferreira, H. B.; Zaha, A. Estudo interlaboratório: análise do valor diagnóstico de distintos antígenos de *Echinococcus granulosus*. XVI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre, 2004.

Oliveira, A. S.; **Monteiro, K. M.;** Zaha, A.; Ferreira, H. B. Análise proteômica do estágio larval do parasito *Echinococcus granulosus*. XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre, 2005.

Monteiro, K. M.; Lorenzo, C.; González, G.; Zaha, A.; Ferreira, H. B. Estudo interlaboratório: análise do valor diagnóstico de distintos antígenos de *Echinococcus granulosus*. XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, Porto Alegre, 2005.

Monteiro, K. M.; Cardoso, M. B.; da Silveira, N. P.; Zaha, A.; Ferreira, H. B. Structural characterization and subunit aggregation dynamics of *Echinococcus granulosus* antigen B. XXXV Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia, 2006.

7. Apresentação de conferência, palestra, simpósio ou seminário em congressos científicos

Apresentação oral do trabalho "Estudo interlaboratório: análise do valor diagnóstico de distintos antígenos de *Echinococcus granulosus*", no XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, Porto Alegre, 2005.

7. Anexos

- E-mail confirmando a submissão do manuscrito "Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers" para a revista *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*;
- resposta dos *referees*.

**Mensagem recebida confirmando a submissão do manuscrito à revista
*BBA - Proteins and Proteomics***

<bbapro@elsevier.com> -----
Data: Wed, 16 Aug 2006 21:23:00 +0100
De: "BBA - Proteins and Proteomics (ELS)" <bbapro@elsevier.com>
Reponder para: "BBA - Proteins and Proteomics (ELS)"
<bbapro@elsevier.com>
Assunto: BBA - Proteins and Proteomics: Submission Confirmation
Para: henrique@cbiot.ufrgs.br

Title: Self-assembly and structural characterization of Echinococcus granulosus antigen B recombinant subunit oligomers
Corresponding Author: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira
All Authors: Karina M. Monteiro; Sandra M. N. Scapin; Marcos V. A. S. Navarro, PhD; Nilson I. T. Zanchin, PhD; Mateus B. Cardoso, M.Sc.; Nádyá P. da Silveira, PhD; Paulo F. B. Gonçalves, PhD; Hubert K. Stassen, PhD; Arnaldo Zaha, PhD;
Henrique Bunselmeyer Ferreira, PhD

Dear Dr. Ferreira,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in BBA - Proteins and Proteomics.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/bbapro/>

Your username is: hbferreira

Your password is: ferreira93186

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your work to BBA - Proteins and Proteomics. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Sincerely,

Rachel Carpenter
Editorial Office
BBA - Proteins and Proteomics

**Mensagem recebida com a resposta da revista
e as modificações sugeridas pelos revisores**

From: "BBA - Proteins and Proteomics (ELS)" <bbapro@elsevier.com>
To: <henrique@cbiot.ufrgs.br>
Subject: BBAPRO-06-244: Decision
Date sent: Tue, 19 Sep 2006 14:47:03 +0100

Manuscript No.: BBAPRO-06-244
Title: Self-assembly and structural characterization of Echinococcus granulosus antigen B recombinant subunit oligomers
Article Type: Regular Paper
BBA Section: BBA - Proteins and Proteomics
Corresponding Author: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira
All Authors: Karina M. Monteiro; Sandra M. N. Scapin; Marcos V. A. S. Navarro, PhD; Nilson I. T. Zanchin, PhD; Mateus B. Cardoso, M.Sc.; Nádyá P. da Silveira, PhD; Paulo F. B. Gonçalves, PhD; Hubert K. Stassen, PhD; Arnaldo Zaha, PhD; Henrique Bunselmeyer Ferreira, PhD
Submit Date: Aug 16, 2006

Dear Dr. Ferreira:

On behalf of the Executive Editors of Biochimica et Biophysica Acta, I would like to thank you for submitting the above-named article to BBA - Proteins and Proteomics.

I am pleased to inform you that your paper is, in principle, acceptable for publication. The reviewers, whose comments are enclosed below, indicate that the manuscript is of interest to the field, and they recommend publication after some minor modifications. I therefore invite you to answer the points raised by the reviewers and to amend the manuscript accordingly. I look forward to receiving your prompt response.

Please submit your revision online by logging onto the Elsevier Editorial System for BBA -

Proteins and Proteomics as an Author:

<http://ees.elsevier.com/bbapro/>

Your username is: hbferreira

Your password is: ferreira93186

You can find the manuscript record listed under "Submissions Needing Revisions". Click "Submit Revision" to begin the submission process.

When submitting your revised paper, please be sure to include a separate document

uploaded as "Response to Reviewers" that carefully addresses, point-by-point, the issues raised in the comments appended below and describes the corresponding changes to the manuscript. You should also include a suitable rebuttal to any specific request for change that you have not made.

The Journal strongly encourages you to submit two versions of your revised manuscript in order to facilitate the evaluation process: one with changes in the manuscript marked, as well as an unmarked version (which is required). Please note that the editorial policy of BBA places a time limit for resubmission of a revised manuscript at three months. Such a revised manuscript will retain its original submission date. Manuscripts submitted after three months will be considered as new submissions.

Thank you, and we look forward to receiving your revised manuscript.

Yours sincerely,

Friedrich Lottspeich, Ph.D.
Executive Editor
BBA - Proteins and Proteomics

Please see Reviewers' comments:

Reviewer #1: Some minor corrections are necessary:

- 1) In p. 3, 2nd paragraph, "e" should be replaced by "and".
- 2) In p. 12, 3.3, line 5, "proteases with trypsin-like specificity" must be deleted, since it seems to refer to both, trypsin and chymotrypsin.

Some questions:

- 1) Have the authors attempted to make mixed oligomers, made up with two or three of the recombinant subunits? Would they be more similar to the native antigen B?
- 2) Can the subunits be maintained as monomers in some particular medium, and in such case could NMR be used to determine the actual structure?

Reviewer #2: This is a well-written paper addressing structural characterization of the Eg Antigen B oligomers using a palette of physico-chemical techniques. In spite of the fact that the authors do not reach fully conclusive results (as pointed out in the last paragraph on p 16) the paper presents enough encouraging data to allow publication with only minor changes, as suggested below.

- * There are many abbreviations, some of which are explained, but most are not. Please include an abbreviation list.
- * Change "Amersham Biosciences" for "GE Healthcare, Uppsala, Sweden" (or relevant Brazil address)
- * It would have been helpful to see the primary structures of the three AgB8 constructs used. I thought ref # 12 would give this info, but I could not find it there.
- * Small typo? On p 3 and 9 an "e" is probably meaning "and". Brazilian??
- * P9 and Fig 1: A secondary peak for the AgB8/3 is given the value 227 kDa. Looks much higher in Fig 1 (see the 232 Mw standard)
- * P10 and fig 2: The gel concentration chosen to show the end result of crosslinking seems too tight - there is absolutely no resolution above 100 kDa, so I suggest to run a looser acrylamide concentration. This will probably make the starting monomers invisible, so maybe two gel runs with optimized gel concentration would be informative?
- * P12 and Fig 5: The Tricine gel concentration is not given, and also (at least in my copy) there is no molecular mass standard given (just one band is seen (14 or 10 kDa), so one cannot possibly judge the molecular weights of the end products of proteolysis. One would assume that at least proteinase K would produce very small peptides (and with the sequences of the substrates given, one could have been able to evaluate the outcome of the trypsin and chymotrypsin experiments).