

Schuler, A. D.<sup>1</sup>; Parizi, L.F.<sup>1</sup>; Logullo, C.<sup>2</sup>; Masuda, A.<sup>1</sup>; Da Silva Vaz, I.Jr.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Biotecnologia, UFRGS, RS, Brasil; <sup>2</sup> Centro de Biociências e Biotecnologia, UENF, RJ, Brasil.

## INTRODUÇÃO

O *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita que atinge principalmente o rebanho bovino. Rebanhos infestados apresentam redução na produção de leite e carne e tem o valor de seu couro reduzido. A forma mais comum de controle desse parasita é por meio de acaricidas, porém esse método tem se mostrado deficiente a medida que sua utilização incorreta tem selecionado cepas de carrapato resistentes, e provocado a presença de resíduos químicos em produtos de origem animal e no ambiente. Testes com diferentes antígenos evidenciaram que o controle do carrapato pode ser feito por meio de vacinação. A Glicogênio Sintase Quinase 3β (GSK-3β) está envolvida em diversos processos fisiológicos, como a síntese de glicogênio, diferenciação celular e motilidade celular, especificamente a GSK-3β está envolvida no metabolismo energético dos embriões de *R. microplus*. O nosso grupo de pesquisa realizou diversas tentativas de expressar o gene da GSK-3β em *Escherichia coli*, mas não obtivemos sucesso. Neste trabalho a proteína foi expressa em dois fragmentos correspondentes a porção N-terminal e a porção C-terminal da proteína.

## OBJETIVO

Os objetivos foram a clonagem dos fragmentos correspondentes a porção N-terminal e C-terminal da GSK 3β de *R. microplus* no vetor de expressão pAe, expressão e purificação das proteínas recombinantes (C-GSKr and N-GSKr) e a produção anticorpos contra C-GSKr and N-GSKr.

## MATERIAL E MÉTODOS

Dois pares de primers e a sequência codificante da proteína GSK 3β clonada em vetor pGEM-T easy foram usados para amplificar os fragmentos de DNA que codificam as porções N- e C-terminal. Esses amplicons foram clivados com as enzimas (Nde I / Eco RI e Eco RI / Bam HI) e ligados ao vetor de expressão (pAE). A clonagem dos fragmentos genéticos foram confirmadas por clivagem, PCR e sequenciamento de DNA.

*E. coli* BL21(DE3) C41 foi transformada com o plasmídeo N-GSK/pAE e *E. coli* BL21(DE3) RP foi transformada com o plasmídeo C-GSK/pAE para a obtenção das proteínas recombinantes. Até serem atingidas as condições ideais de produção protéica foram testados diferentes meios de cultura, temperaturas e períodos de incubação. A expressão protéica foi analisada por eletroforese SDS-PAGE 12% e a presença de proteína recombinante foi confirmada por western blot, utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina.

Cromatografia de afinidade a Ni<sup>2+</sup> foi utilizada para a purificação das proteínas recombinantes.

A produção de anticorpos foi obtida pela imunização de coelhos a partir da banda recortada do gel de poliácridamida macerada e misturada ao adjuvante Marcol Montanide.

## RESULTADOS

### Clonagem dos fragmentos N-GSK e C-GSK

Por PCR e hidrólise com enzimas de restrição observamos que os plasmídeos possuíam tamanho esperado. A clonagem foi confirmada por sequenciamento de DNA.

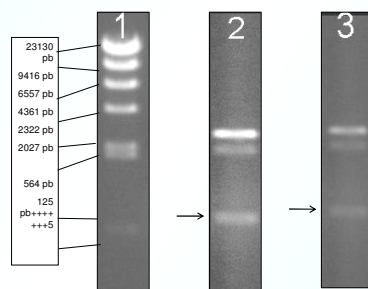


Fig. 1 Hidrólise dos plasmídeos com enzimas de restrição. 1) Marcador de massa molecular 2) N-GSK/pAE, 3) C-GSK/pAE

### Expressão das proteínas N-GSKr e C-GSKr

Ambas proteínas foram obtidas a partir da transformação de cepas de *E. coli* e com 2h de incubação pós indução de expressão protéica: *E. coli* BL21 (DE3) C41 e meio de cultura LB foram usados para expressar N-GSKr a 25°C. *E. coli* BL21 (DE3) RP e meio de cultura SOB foram usados para expressar C-GSKr a 37°C. Ambas proteínas foram obtidas na forma insolúvel.

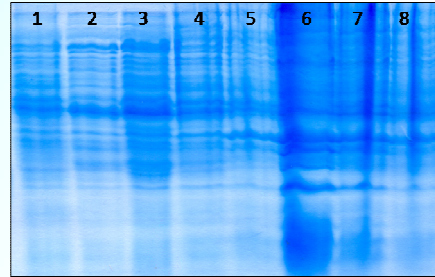


Fig. 3 SDS-Page 12% do extrato de *E. coli* C41 expressando N-GSKr: 1) Sobrenadante sem indução protéica, 2-4) 2h, 4h e 16h pós indução da expressão protéica e, 5) sedimento sem indução protéica, 6-8) 2h, 4h, 16h pós indução protéica.

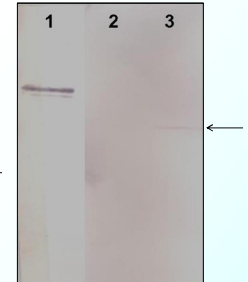


Fig. 4 Western Blot utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina. Produção protéica (N-GSKr) pós 2h de indução (22KDa). 1) Controle positivo, 2) Sobrenadante, 3) Sedimento

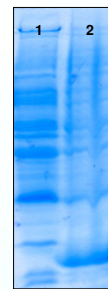


Fig. 5 SDS-Page do extrato de *E. coli* RP expressando C-GSKr (25KDa). 1) Sobrenadante pós de 2h de indução de expressão protéica, 2) Sedimento pós 2h de indução de expressão protéica.

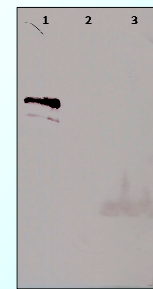


Fig. 6 Western Blot utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina. Produção protéica (C-GSKr) pós 2h de indução (25KDa). 1) Controle positivo 2) Sobrenadante, 3) Sedimento.

### Purificação protéica e produção de anticorpos contra C-GSKr

A proteína C-GSKr foi obtida na forma insolúvel, os corpúsculos de inclusão foram solubilizados com Guanidina 3M para purificação por cromatografia de afinidade a Ni<sup>2+</sup>. A imunização animal com C-GSKr demonstrou sua capacidade de induzir uma resposta imune. Um western blot com o soro produzido confirmou a presença de anticorpos a partir do reconhecimento da proteína C-GSKr.

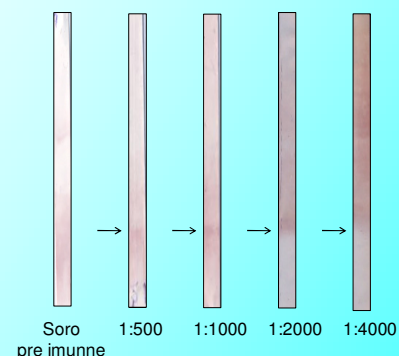


Fig.6 Western blot para a titulação do soro de coelho contra C-GSKr (25kD)

## PERSPECTIVAS

1. Padronizar as condições para a purificação de N-GSKr e C-GSKr.
2. Produzir anticorpos contra N-GSKr por imunização animal.

3. Administrar em partenógenas, via alimentação artificial, anticorpos anti N-GSKr e C-GSKr.
4. Identificar a presença de GSK 3β em diferentes tecidos do parasita a proteína GSK 3β.