

Clonagem e caracterização molecular da quinurenina aminotransferase de *Rhipicephalus microplus* (RmKAT)

Gabriel Constantin da Silva¹, Adriana Seixas¹, Carlos Termignoni^{1,4}, João Ricardo Martins³, Itabajara da Silva Vaz Júnior^{1,2}.

¹Centro de Biotecnologia - UFRGS, ²Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia - UFRGS,

³Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor - Porto Alegre, ⁴Departamento de Bioquímica - UFRGS

Introdução

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasita responsável por grandes prejuízos para a pecuária. O combate é realizado com o uso de carrapaticidas químicos, que causam problemas de contaminação nos produtos derivados dos bovinos como carne e leite, além de selecionar populações resistentes de carrapatos. Identificar proteínas de importância fisiológica pode ser uma estratégia para encontrar moléculas alvo que possam ser usadas como antígenos no desenvolvimento de uma vacina eficaz.

A quinurenina aminotransferase (KAT) é uma enzima envolvida na degradação do triptofano e está relacionada com diversos processos fisiológicos, sendo relatado que o bloqueio da sua função interfere na sobrevivência e desenvolvimento de artrópodes. (Fang et al., 2002).

A sua presença em intestino e glândula salivar sugere que a enzima desempenhe um papel no processo de hematofagia, além disso, a expressão da KAT em ovário também sugere sua importância em outros aspectos fisiológicos do carrapato.

Objetivo

Clonar a sequência codificante do gene da quinurenina aminotransferase do carrapato *R. microplus* visando sua expressão.

Materiais e métodos

Carrapatos

A cepa Porto Alegre do carrapato *R. microplus* é mantida em bovinos estabulados na Faculdade de Veterinária da UFRGS.

Extração de RNA

Carrapatos fêmea totalmente engurgitadas (teleóginas) foram dissecadas, tendo os seguintes tecidos removidos: intestino, ovário e glândula salivar. O RNA destes tecidos foi extraído com TRIzol® (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

Clonagem e sequenciamento

Uma sequência de nucleotídeos depositada no banco de cDNA de *R. microplus* (TIGR), com alta similaridade ao gene da KAT do carrapato *Haemaphysalis longicornis*, foi utilizada para projetar oligonucleotídeos iniciadores. O fragmento de 1236-pb amplificado por RT-PCR a partir de cDNA de intestino foi clonado em vetor de clonagem pGEM-T. Este plasmídeo recombinante, denominado pGEM-RmKAT, foi usado para transformar bactérias *Escherichia coli* da cepa TOP 10. A sequência correta da KAT foi confirmada por sequenciamento e análise por restrição.

Expressão da KAT recombinante

Novos oligonucleotídeos iniciadores foram projetados para permitir a inserção do gene da RmKAT no vetor de expressão pET-5a. A sequência de 1236-pb codificando a RmKAT foi clonada entre os sítios de restrição BamHI e NdeI. Este plasmídeo recombinante foi usado para transformar bactérias *E. coli* XL1-Blue.

Análise filogenética da KAT

A sequência de aminoácidos da KAT foi usada em uma análise comparativa para avaliar a similaridade entre as sequências de diferentes animais depositadas no banco de dados do NCBI. Uma árvore filogenética demonstrando a relação evolutiva entre membros da família das KATs foi gerada com auxílio do programa Mega4.1®.

Resultados

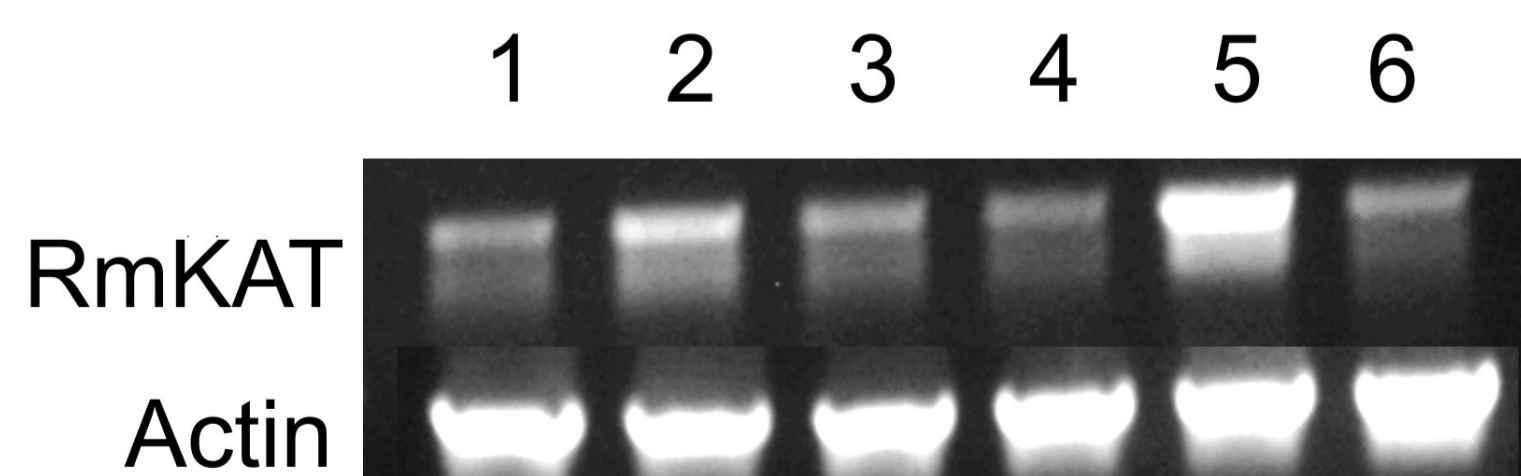


Fig. 1. Transcrição do gene de RmKAT em diferentes tecidos do carrapato demonstrada por RT-PCR. 1: intestino de fêmeas parcialmente engurgitadas; 2: ovário de fêmeas parcialmente engurgitadas; 3: glândula salivar de fêmeas parcialmente engurgitadas; 4: intestino de fêmeas totalmente engurgitadas; 5: ovário de fêmeas totalmente engurgitadas; 6: glândula salivar de fêmeas totalmente engurgitadas. Amplificação da actina é mostrada como controle.

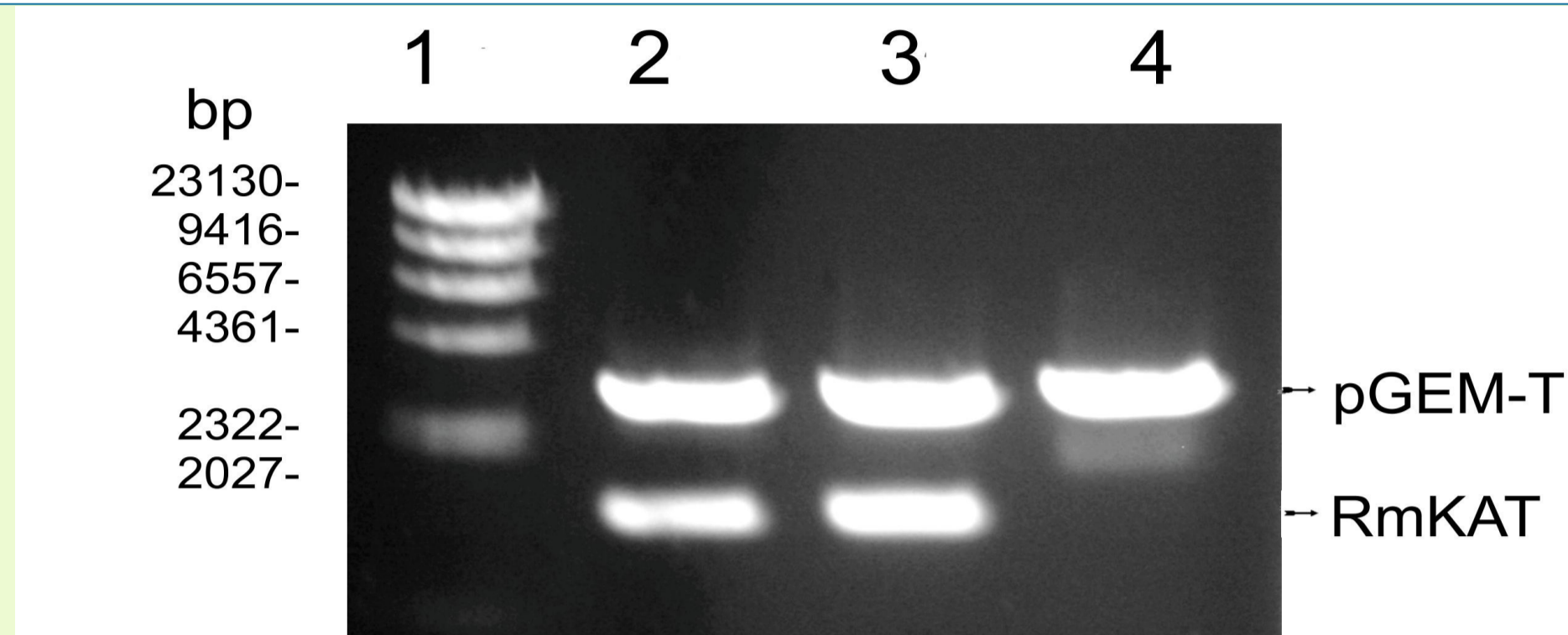


Fig. 2. Análise por restrição realizado no DNA plasmidial extraído de bactérias transformadas com o plasmídeo recombinante pGEM-RmKAT. 1: Marcador Lambda HindIII; 2 e 3: fragmento de 3015-pb, correspondendo ao vetor pGEM-T e um fragmento com 1236-pb, correspondendo ao fragmento de RmKAT. 4: pGEM-T sem inserto.

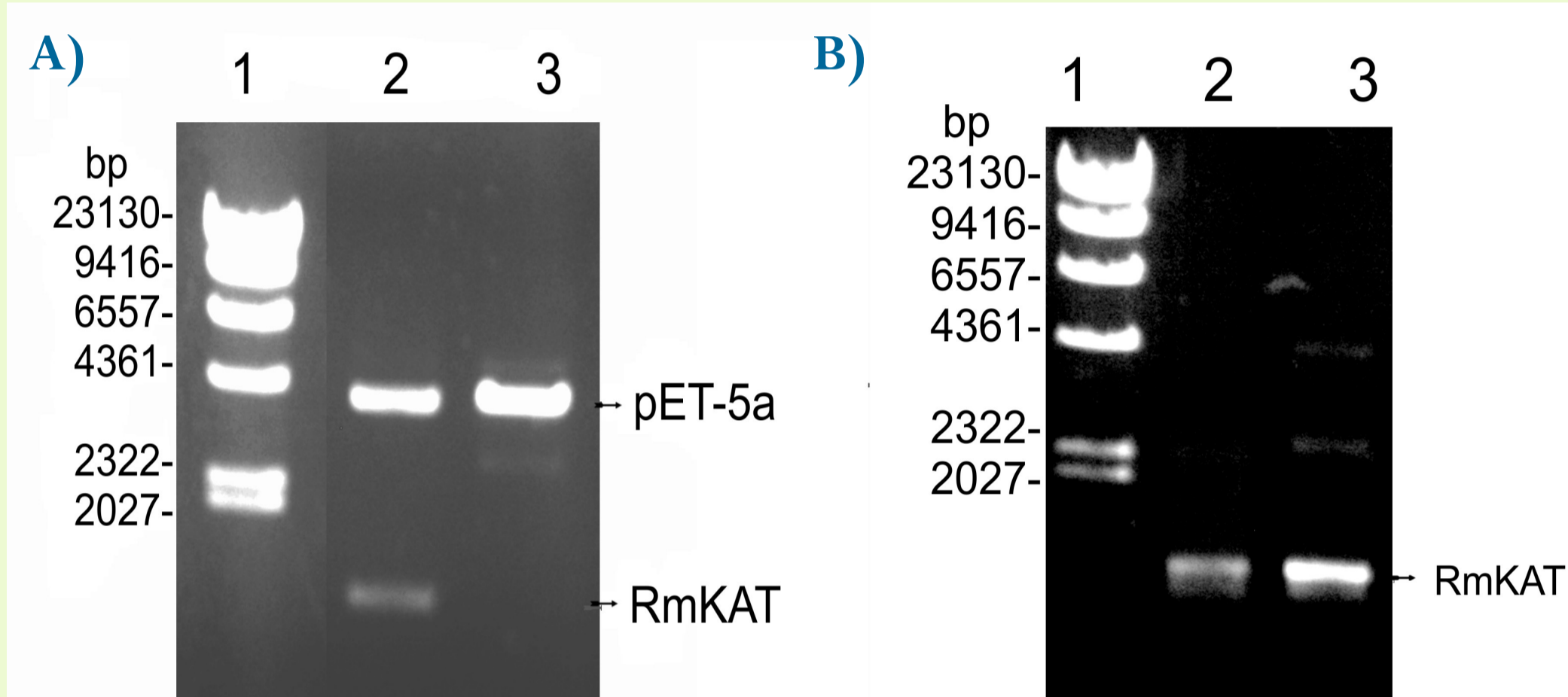


Fig. 3. Confirmação da clonagem por clivagem e PCR. A) pET-RmKAT clivada com BamHI e NdeI. 1: Marcador Lambda HindIII; 2: plasmídeo contendo sequências de pET-5a (4134-pb) e KAT (1236-pb); 3: pET-5a sem inserto. B) PCR - 1: Marcador Lambda HindIII; 2 e 3: clones positivos para RmKAT (1236-pb).

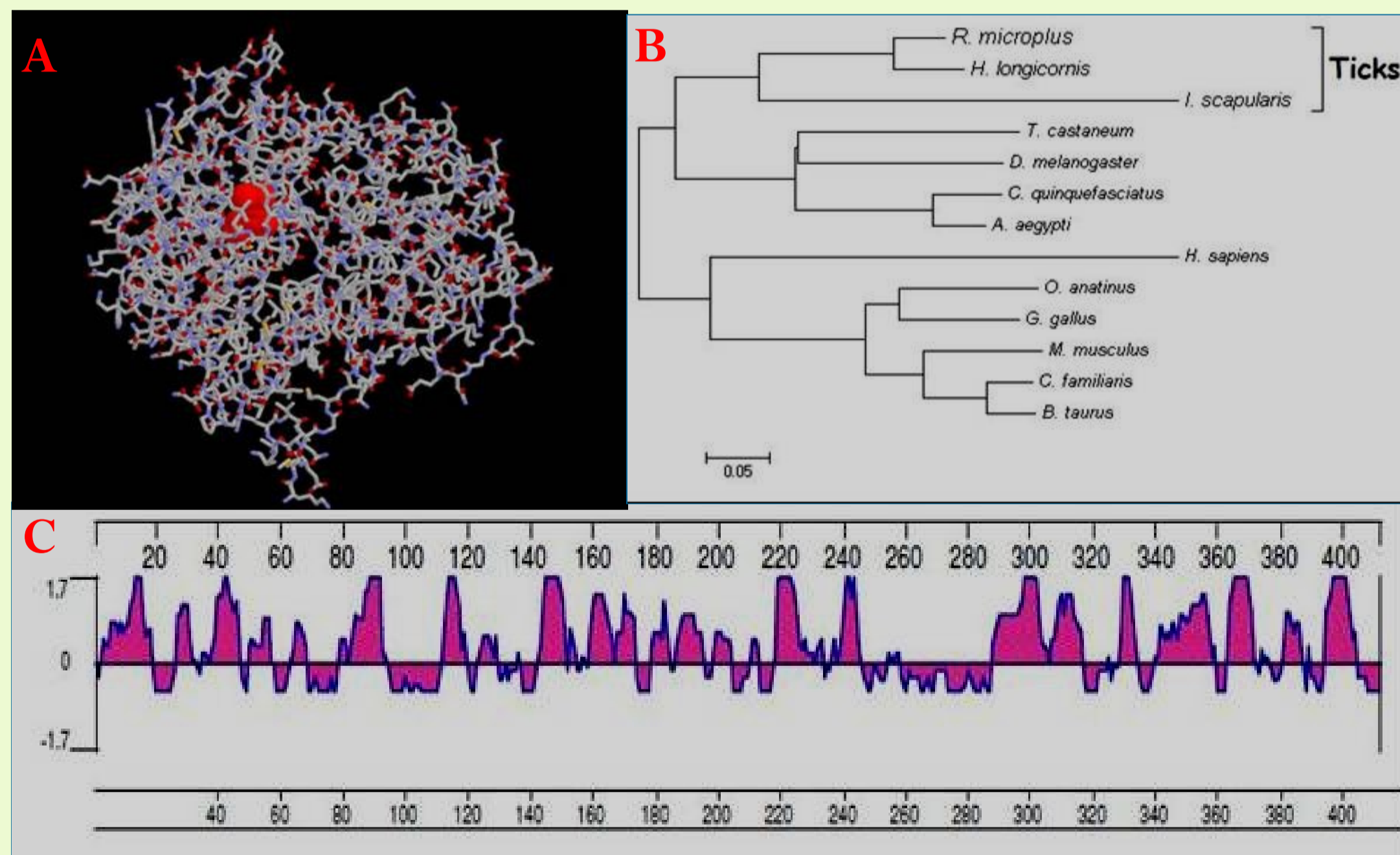


Fig. 4. Caracterização de RmKAT. A) Modelagem de RmKAT usando a sequência de KAT de *Aedes aegypti* como molde (2r5eB - 1.84 Å). B) Análise filogenética das sequências de KAT alinhadas por ClustalW®. As sequências de KAT dos carrapatos ficaram agrupadas mais próximas às de insetos, em comparação com as sequências de mamíferos. C) Análise antigênica *In silico* usando algoritmo de Jameson-Wolf, no programa Lasergene®, demonstrando regiões imunogênicas de RmKAT.

Discussão

Foi demonstrado que o gene da KAT de *R. microplus* é expresso no intestino, glândula salivar e ovário. Estes achados sugerem que a RmKAT tenha o mesmo papel sugerido para a KAT já descrita em outra espécie de carrapato, o *Haemaphysalis longicornis* (Battsetseg et al., 2009). Considerando a importância da KAT no catabolismo do triptofano sugerimos esta enzima como uma molécula alvo no desenvolvimento de um método de controle para o carrapato sem a utilização de substâncias tóxicas.