

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul
Instituto de Biociências

Aline Domingues Schuler

Expressão e Purificação de Fragmentos da Glicogênio Sintase Quinase de *Rhipicephalus microplus*

Orientador Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr.

Porto Alegre, 2010.

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul
Instituto de Biociências

Aline Domingues Schuler

**Expressão e Purificação de Fragmentos da Glicogênio Sintase Quinase de *Rhipicephalus*
*microplus***

Trabalho de conclusão de curso
como pré-requisito para a obtenção
do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas com ênfase em Biologia
Celular Molecular e Funcional.

Orientador Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr.

Porto Alegre, 2010.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Entomologia Molecular (INCT-EM).

DEDICATÓRIA

Um dia quando criança escutei uma música (Aquarela) que me fascinou. Na época não sabia bem o porquê, mas tinha gostado muito, tanto que muitas vezes “perturbei” a minha irmã para cantar a tal música para mim...

Hoje percebo o porquê. Em apenas uma letra musical alguém (Toquinho) pode expor boa parte de minhas perspectivas e desejos...

...o amor pela natureza....

mais...

Numa folha qualquer

Vai voando

Eu desenho um sol amarelo

Contornando a imensa

E com cinco ou seis retas

Curva Norte e Sul

É fácil fazer um castelo...

Vou com ela

Viajando Havaí

[o castelo não podia faltar afinal no mundo
de qual criança não existe um?!]

Pequim ou Istambul

Pinto um barco a vela

Brando navegando

Com o lápis em torno

É tanto céu e mar

Da mão e me dou uma luva

Em um beijo azul...

E se faço chover

Com dois riscos

Entre as nuvens

Tenho um guarda-chuva...

Vem surgindo um lindo

Avião

Se um pinguinho de tinta

Tudo em volta colorindo

Cai num pedacinho

Com suas luzes...

Azul do papel

Num instante imagino

Basta imaginar e ele está

Uma linda gaivota

Partindo, sereno e lindo

A voar no céu...

Se a gente quiser

...a curiosidade inata de uma Cientista

(Ele vai pousar...)

[risos]...a sede por conhecer sempre mais e

[Viajar como é bom viajar...Certo mamãe?!]

Numa folha qualquer
Eu desenho um navio
De partida
Com alguns bons amigos
Bebendo de bem com a vida...

...fazer amigos...e aprender com eles.

De uma América a outra
Eu consigo passar num segundo
Giro um simples compasso
E num círculo eu faço o mundo...

Um menino caminha
E caminhando chega no muro
E ali logo em frente
A esperar pela gente
O futuro está...

E o futuro é uma astronave
Que tentamos pilotar
Não tem tempo, nem piedade
Nem tem hora de chegar
Sem pedir licença
Muda a nossa vida
E depois convida

A rir ou chorar...

Nessa estrada não nos cabe
Conhecer ou ver o que virá
O fim dela ninguém sabe
Bem ao certo onde vai dar
Vamos todos
Numa linda passarela
De uma aquarela
Que um dia enfim
Descolorirá...

[Esse barco me lembra tanto a faculdade e
tudo que vivenciamos nela e até ela,
contando com percalços do caminho.]

Numa folha qualquer
Eu desenho um sol amarelo
(Que descolorirá!)
E com cinco ou seis retas
É fácil fazer um castelo
(Que descolorirá!)
Giro um simples compasso
Num círculo eu faço
O mundo

E esse não deixarei descolorir!!!!

Dedico este trabalho principalmente a minha família que sempre esteve ao meu lado me apoiando, acompanhando meu desenvolvimento e se dedicando a me dar um futuro repleto de felicidade e realizações.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Aoi Masuda e ao Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr., por me receberem no laboratório transmitindo-me seus conhecimentos para que se tornasse possível a execução deste trabalho.

Ao Me. Luis Fernando Parizi, pelos ensinamentos ofertados, estando presente sempre que necessário.

Aos membros da banca examinadora.

Aos colegas de Laboratório: Ana Carolina, Andressa, Daiane, Melina e Gabriel que me apoiaram tanto nos momentos de alegria quanto nos momentos de apreensão. Obrigada pela amizade!

Ao Professor Carlos Termignoni e as colegas do seu laboratório, a Dra. Adriana e Ma. Karine, pela colaboração e companheirismo.

Aos colegas de outros laboratórios e funcionários do Centro de Biotecnologia que de algum modo colaboraram para a execução deste projeto.

Aos meus colegas e amigos da Biologia que viveram comigo essa graduação com todos os perrengues e diversão que coube a ela.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino de qualidade e aos órgãos de fomento pelo incentivo a pesquisa.

A minha família que soube compreender minhas alterações de humor nos momentos de nervosismo, mantendo-se sempre ao meu lado me incentivando incondicionalmente.

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita responsável por perdas econômicas importantes na pecuária bovina. A utilização de acaricidas é o método mais frequente no combate a este ectoparasita, entretanto, a pesquisa em torno do desenvolvimento de uma vacina contra este parasita é crescente, com resultados que mostram que este pode ser um método de controle eficiente. Baseados nisto, diversas proteínas envolvidas no desenvolvimento do carrapato estão sendo caracterizadas, incluindo a Glicogênio Sintase Quinase (GSK). A GSK é uma serina/treonina quinase envolvida na síntese do glicogênio, o maior estoque de glicose em células animais. Resultados prévios mostraram que o tratamento de carrapatos adultos com um inibidor específico para GSK (alsterpaullone) causa redução significativa no número e na fertilidade dos ovos. Assim o estudo da GSK de *R. microplus* pode contribuir para o desenvolvimento de uma vacina para proteção imunológica contra o carrapato. Visando estudar essa enzima a nível molecular, o gene que codifica essa proteína foi subclonado em 2 fragmentos para a obtenção de proteínas recombinantes referentes as porções N-terminal e C-terminal da GSK. Para a clonagem, amplicons obtidos por PCR foram hidrolisados e ligados ao vetor de expressão. A clonagem foi confirmada por hidrólise, PCR e sequenciamento de DNA. *Escherichia coli* BL21(DE3) C41 foi transformada para a obtenção do fragmento protéico recombinante referente à porção N-terminal da proteína (N-GSKr) e *E. coli* BL21(DE3) RP foi transformada para a obtenção do fragmento protéico recombinante referente a porção C-terminal (C-GSKr). As condições ideais para a expressão protéica foram estipuladas a partir do teste de diferentes condições de temperatura e período de incubação das culturas. As expressões foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE 12% e a presença das proteínas recombinantes foram confirmadas por western blot com anticorpo monoclonal anti-histidina e a purificação C-GSKr realizada por cromatografia de afinidade a Ni⁺². Foi obtido um soro de coelho anti-C-GSKr, comprovando sua capacidade de induzir resposta imune. Em estudos futuros este soro será usado em western blot para identificar a presença de GSK em tecidos de carrapato.

Palavras chave: *Rhipicephalus microplus*, GSK, método de controle

ABSTRACT

The tick *Rhipicephalus microplus* is an important ectoparasite that causes substantial economic damage to livestock production. Acaricides are currently used to control ticks infestation however studies using vaccination strategies shown be a promising control method. With this objective, our research group has investigated proteins involved on tick development. GSK is serin/threonin kinase involved on glycogen synthesis, the major glucose storage to animal cells. Previous results showed that treatment of adult tick with a specific inhibitor of GSK (alsterpaullone) causes significant reduction in the number and fertility of the eggs. Therefore the study of the *R. microplus* GSK could contribute to develop a new vaccine for immune protection against the tick. In order to study this enzyme at the molecular level, we cloned and expressed two DNA fragments encoding the N- and C-terminal regions of GSK by specific primers. The amplicons were digested with restriction enzymes and ligated in expression vector. The cloning was confirmed by cleavage with restriction enzymes, PCR and DNA sequencing. *Escherichia coli* BL21(DE3) C41 were transformed with the plasmid N-GSK/pAE and *E. coli* BL21(DE3) RP were transformed with the plasmid C-GSK/pAE for expression of recombinant proteins. Optimal production was achieved by testing different growth temperatures, period of cultivation. The expressions were analyzed by electrophoresis SDS-PAGE 12% and the presence of the recombinant proteins were confirmed by western blot, using monoclonal antibody anti-histidine. The purification of the C-GSK protein fragment has been done by Ni²⁺ affinity chromatography. The immunization of rabbits with C-GSKr had shown its capacity to induce an immune response. A western blot with this serum showed the presence of antibodies that recognize C-GSKr. In future works this serum will be used to indentify GSK in tick tissues.

Key words: *Rhipicephalus microplus*, GSK, control method

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfate
C-GSKr	Proteína recombinante referente à porção C-terminal Glicogênio Sintase Quinase
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
D.O.	Densidade óptica
GSK	Glicogênio Sintase Quinase
IPTG	Isopropil- β -Galactoside
NBT	Nitro azul tetrazolio
N-GSKr	Proteína recombinante referente à porção N-terminal Glicogênio Sintase Quinase
SDS - PAGE	Eletroforese em gel de poliacrílamida
PCR	Reação polimerase em cadeia
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Dodecil sulfato de sódio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração do ciclo de vida do carrapato <i>R. microplus</i> .
Figura 2	Eixo PI3K-AKT-GSK na via de produção glicosídica estimulada por insulina.
Figura 3	Eletroforese para a confirmação da identidade da região codificante para a porção N-terminal da GSK de <i>R. microplus</i> .
Figura 4	Eletroforese para a confirmação da identidade da região codificante para a porção C-terminal da GSK de <i>R. microplus</i> .
Figura 5	Hidrólise dos plasmídeos N-GSK/pAE e C-GSK/pAE.
Figura 6	Sequências de códons correspondente à proteína GSK completa de <i>R. microplus</i> .
Figura 7	Sequência de aminoácidos deduzida a partir do sequenciamento do inserto correspondente ao fragmento N-terminal (N-GSK).
Figura 8	Sequência de aminoácidos deduzida a partir do sequenciamento do inserto correspondente ao fragmento C-terminal (N-GSK).
Figura 9	Alinhamento entre a sequência da GSK 3 β de <i>R. microplus</i> e sequências de GSK3 β de outros organismos.
Figura 10	SDS-PAGE 12% Expressão do fragmento N-GSKr.
Figura 11	Western blot da expressão do fragmento N-GSKr.
Figura 12	SDS-PAGE 12% Expressão do fragmento protéico C-GSKr.
Figura 13	Western blot da Expressão do fragmento C-terminal da GSKr.
Figura 14	SDS-PAGE 12% da Expressão do fragmento C-GSKr solubilizado.
Figura 15	Western blot da Expressão do fragmento C-GSKr solubilizado.
Figura 16	Perfil das amostras de C-GSKr purificadas por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (resina Sepharose-Ni ²⁺).
Figura 17	Eletroforese em SDS-PAGE 12% de duas amostras do fragmento C-terminal da GSK.
Figura 18	Western blot da purificação do fragmento C-GSKr.
Figura 19	Western blot com soro do coelho imunizado com C-GSKr.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAIS	18
3.1 Soluções e tampões	18
3.1.1 Tampões para eletroforese	18
3.1.1.2 Tampões e soluções para Western-blot	19
3.1.1.3 Soluções para extração de DNA plasmidial	20
3.1.1.4 Tampões para cromatografia em resina Sepharose-Ni ²⁺	21
3.1.2 Géis para eletroforese	22
3.1.3 Marcadores de massa molecular	23
3.1.4 Meios e placas de cultura	23
3.1.5 Antibióticos	24
3.1.6 Enzimas	24
3.1.7 Plasmídeo e <i>Primers</i> para clonagem	24
3.1.8 Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	25
3.1.9 Coluna de Cromatografia	25
4 MÉTODOS	26

4.1. Subclonagem das regiões codificadoras das porções N- e C- terminais da GSKr de <i>R. microplus</i>	26
4.1.1 Transformação de Células Competentes por Choque térmico	26
4.1.2 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina	27
4.2 Expressão dos fragmentos protéicos da Glicogênio Sintase Quinase (N-GSKr e C-GSKr)	28
4.3 Purificação das proteínas recombinantes expressadas: C-GSKr (proteína recombinante referente a porção C-terminal) e N-GSKr (proteína recombinante referente a porção N-terminal)	29
4.4 Imunização com C-GSKr	30
5. RESULTADOS	30
5.1 Subclonagem das regiões codificadoras das porções N- e C- terminais da GSK de <i>R. microplus</i>	30
5.2 Expressão de N-GSKr e C-GSKr	46
5.3 Purificação de C-GSKr	48
5.4 Imunização	51
6. DISCUSSÃO	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são parasitos obrigatórios de grande parte dos vertebrados terrestres. Há 830 espécies de carrapatos (SONENSHINE, 1991) distribuídos em 3 famílias.

O carrapato *Rhipicephalus microplus*, anteriormente denominado como *Boophilus microplus*, foi reclassificado em 2003 (MURRELL *et al*, 2003) com base em análises moleculares e morfológicas como pertencente ao gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*; *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. Ao longo do texto, será utilizada a nomenclatura de *Rhipicephalus microplus*. O *R. microplus* é um ectoparasita de mamíferos pertencente ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acarina e família Ixodidae. São conhecidos como carrapatos duros em função do escudo quitinoso que caracteriza a família.

Originário da Ásia o carrapato bovino é característico de regiões de clima tropical, ocupando hoje além deste continente, os continentes americano, africano e Oceania (JOHNSTON *et al*, 1986). Adaptado ao clima do Brasil, caracteristicamente quente, o *R. microplus* está presente em praticamente todo o território nacional, podendo ser considerado um dos mais importantes ectoparasitas do rebanho bovino (JONSSON, 2006).

O ciclo de vida do *R. microplus* tem duração média de 40 dias, dividindo-se em 2 fases, uma fase de vida livre e uma fase de vida parasitária, durante a qual ocorre a alimentação hematofágica (figura 1). A fase de vida livre tem início quando a fêmea completamente ingurgitada (teleógina) se desprende do hospedeiro e cai ao solo aonde faz a postura dos ovos, e após morre. Aproximadamente 21 dias após a postura, inicia-se a eclosão dos ovos. As larvas infectantes resultantes migram para as extremidades apicais da vegetação, onde localizam o hospedeiro pelo odor, vibrações, sombreamento, estímulo visual (WALADDE *et al*, 1982), fixadas no hospedeiro as larvas se alimentam dando início a fase de vida parasitária. O *R. microplus* desenvolve-se sobre um único hospedeiro, frequentemente um bovino, aonde permanece fixado se alimentando e sofre mudas. A larva assume os estágios de ninfa e em seguida adulto que apresenta dimorfismo sexual. Na fase adulta ocorre a cópula e as fêmeas passam a se alimentar de sangue até seu ingurgitamento total e queda ao solo. Os machos, por sua vez, permanecem no hospedeiro à procura de novas fêmeas, sobrevivendo até duas vezes mais que essas (ROBERTS, 1968). Os danos causados ao hospedeiro durante a fase parasitária do carrapato geram grande preocupação aos criadores. Devido à ação espoliativa do carrapato sobre o rebanho bovino, há redução no ganho de peso e produção de leite. Além disso, ao se fixar o carrapato deixa cicatrizes no couro que reduzem

consideravelmente o seu valor econômico, influenciando diretamente a bovinocultura. No país os prejuízos relativos à produção de carne, leite e couro são estimados em um bilhão de dólares americanos por ano (EMBRAPA, 2006).

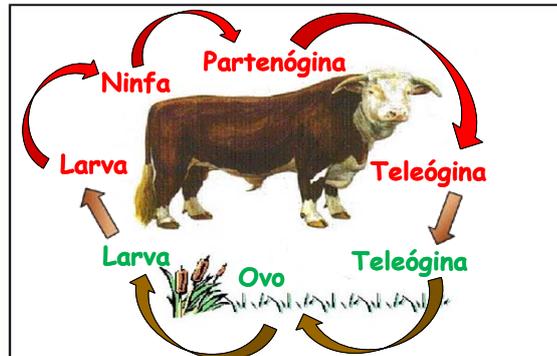


Figura 1: Ilustração do ciclo de vida do carrapato *R. microplus*

Tradicionalmente, o *R. microplus* é controlado através do uso de acaricidas químicos (compostos arsenicais, organoclorados, organofosforados, formamidina e piretroides). Porém o uso inadequado desses produtos gera uma grande quantidade de resíduos químicos que acabam depositados no ambiente, e podem ser encontrados nos produtos originados desses animais. O uso incorreto desses acaricidas origina, ainda, uma pressão seletiva, principalmente devido à exposição contínua ao mesmo composto químico por diversas gerações consecutivas. Esse processo resulta no favorecimento da manutenção de populações de carrapatos resistentes a esses compostos (THULLNER *et al.* 2007; ROSADO-AGUILAR *et al.* 2008). Para interromper esse ciclo de substituição de populações sensíveis por populações resistentes aos acaricidas é necessário que se desenvolvam novas estratégias de controle. Uma técnica alternativa sugerida é a rotação de compostos químicos, ou seja, o uso de diferentes acaricidas de forma alternada. Já foi relatado que esse procedimento pode diminuir a pressão seletiva, aumentando o intervalo de tempo de utilização de um determinado princípio ativo, antes que este perca sua aplicabilidade em função do desenvolvimento de resistência a ele (THULLNER *et al.*, 2007).

Repetidas infestações deste ectoparasita geram uma resistência natural do bovino (BARRIGA *et al.*, 1993). Nesta observação se sustentam as propostas para o desenvolvimento de vacinas contra o *R. microplus*. Experimentos como o de Wikel e Allen (1976) mostram que a proteção contra parasitas é oriunda de resposta imune humoral e celular. A resposta

imunológica é distinta quando se trata de infestação natural e de inoculação de um material purificado originado do parasita: quando há uma infestação natural a resposta é por hipersensibilidade imediata, quando há uma inoculação de material estranho ao organismo do hospedeiro, a resposta é celular, através da produção de anticorpos. Além disso, testes de imunização já realizados com diferentes antígenos fornecem as evidências necessárias que *R. microplus* pode ser controlado com o uso de vacinas. O controle imunológico tem potencial para contrapor tanto o problema da resistência adquirida aos químicos quanto o problema da presença de resíduos químicos na carne e leite. O estudo da fisiologia, metabolismo e do desenvolvimento deste parasita a fim de identificar e caracterizar proteínas com potencial imunoprotetor é fundamental para a produção de uma vacina economicamente viável e que seja eficiente no nosso país. (WILLADSEN *et al.*, 1995; DE LA FUENTE *et al.*, 1999; DA SILVA VAZ JR. *et al.*, 2004) Entretanto, as vacinas atualmente comercializadas não são capazes, ainda, de substituir o uso de acaricidas (REDONDO *et al.*, 1999), o que justifica a pesquisa por outros antígenos que sejam eficazes contra o *R. microplus*.

Comercialmente existem duas vacinas contra o *R. microplus* desenvolvidas na Austrália (*Tick-GARD*[®]) e em Cuba (*GAVAC*[®]). Ambas são baseadas na Bm86, uma glicoproteína de membrana presente no epitélio intestinal do carrapato (WILLADSEN *et al.*, 1995; DE LA FUENTE *et al.*, 1999). Entretanto, vários fatores influenciam na capacidade imunoprotetora dessas vacinas, como, por exemplo, a cepa do carrapato a ser controlada, a condição nutricional dos bovinos afetados e a região em que se encontra o rebanho (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2000, RODRÍGUEZ *et al.*, 1995; PATARROYO *et al.*, 2002).

Nessa busca por novos antígenos, estudaremos a Glicogênio Sintetase Quinase (GSK), uma proteína relacionada com diversos processos fisiológicos (ALI *et al.*, 2001), enfatizando o envolvimento desta proteína na embriogênese do carrapato e a possível influência dela na formação dos ovos e no desenvolvimento dos embriões (Da Silva Vaz Jr *et al.*, 1998). O estudo da embriogênese do *R. microplus* fornece informações para o desenvolvimento de metodologias de controle alternativas que atuem sobre a viabilidade dos ovos ou uma letalidade precoce das fêmeas em postura (ROSA DE LIMA *et al.*, 2002).

Philip Cohen descreve no seu trabalho com tecido muscular esquelético de coelho 3 Glicogênio Sintase quinases: GSK-3, GSK- 4 e GSK-5. No presente trabalho estudamos a GSK-3. Desta existem duas isoformas GSK-3 α e GSK-3 β que apresentam 85% de identidade no seu sítio catalítico (WOODGETT, 1990) nos deteremos à GSK-3 β que está presente no *R. microplus*. Esta enzima está envolvida na conversão de glicose em glicogênio, dessa forma, diferente da maioria das quinases, está ativa em células em repouso. Ela é ativada por

fosforilação e age inativando a Glicogênio Sintase (GS) por fosforilação. A GSK-3 é inibida pela insulina que deste modo permite a desfosforilação e ativação da GS (figura 2). A GSK-3 é também reconhecida como um componente chave para as reações de sinalização Wnt, que são essenciais para um padrão de desenvolvimento embrionário e regulação da proliferação celular (SUMMERS *et al.*, 1998; HEDGEPEETH, 1999). A GSK-3 participa da gliconeogênese modulando a atividade da GS por fosforilação, função importante se tratando de ovários que são dependentes dos nutrientes maternos estocados nos oócitos. Embriões de *R. microplus* acumulam glicose e glicogênio (SONG *et al.*, 2006; SAPPINGTON *et al.*, 1998), principal estoque energético em células animais (RAGANO CARACCIOLO *et al.*, 1998). Portanto, a GSK-3 atua na embriogênese do *R. microplus* de forma que no início do desenvolvimento há uma diminuição dos níveis de glicogênio concomitante ao aumento da atividade da GSK, seguido da retomada da síntese de glicogênio e consequente diminuição da atividade da GSK (MORAES *et al.*, 2007).

Estudos prévios mostraram que a inibição funcional da GSK pela utilização de um inibidor específico (Alsterpaullone) durante a embriogênese do *R. microplus* causa uma significativa redução no número de ovos ou ainda a inviabilidade desses ovos, demonstrando a importância dessa proteína durante a embriogênese (FABRES, A. *et al.*, 2010). Na dissertação de mestrado de Caroline Andrade (2008) a expressão da sequência inteira da região codificante do gene de GSK de *R. microplus* não foi obtida. Uma das possíveis razões desse insucesso seria o efeito nocivo da expressão da GSK inteira sobre as bactérias utilizadas no protocolo de expressão protéica. Por isso, adotamos a estratégia de expressar a GSK em dois fragmentos: um contendo a sequência de aminoácidos referente à porção N-terminal da proteína (N-GSKr) e outro contendo a sequência de aminoácidos correspondente à porção C-terminal (C-GSKr) desta proteína, para testar se assim sem atividade biológica, é possível expressar a proteína recombinante.

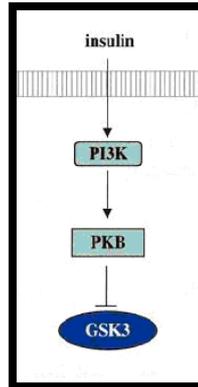


Figura 2: Eixo PI3K-AKT-GSK na via de produção glicossídica estimulada por insulina

Este trabalho tem por objetivo produzir as proteínas recombinantes N-GSKr e C-GSKr para avaliar a sua capacidade de induzir a produção de anticorpos que serão utilizadas como ferramenta para o estudo da GSK.

2 OBJETIVOS

1. Subclonar a região codificadora da porção N-terminal da GSK de *R. microplus*.
2. Subclonar a região codificadora da porção C-terminal da GSK de *R. microplus*
3. Expressar os fragmentos da proteína Glicogênio Sintase Quinase.
4. Purificar as proteínas recombinantes.
5. Imunizar coelho com C-GSKr

3 MATERIAIS

3.1 Soluções e tampões

3.1.1 Tampões para eletroforese

Tampões para gel de agarose

- TAE 1X
 - 24,2 g de Tris-base
 - 5,71 ml de ácido acético glacial
 - 10 ml de EDTA 0,5 M (pH 8,0)
 - Água destilada q.s.p 1 litro

- Tampão de amostra
 - Azul de bromofenol 0,25%
 - Sacarose 40%

Tampões para gel de poliacrilamida

- Tampão de corrida pH 8,3
 - Tris-base 0,3%
 - Glicina anidra 1,44%
 - SDS 0,01% ajustar pH 8,3
 - Água destilada q.s.p 1 litro

- Tampão de amostra para SDS-PAGE
 - Tris-HCl (pH 8,0) 62,5mM
 - SDS 2%, glicerol 10%
 - Beta-mercaptoetanol 5%
 - Azul de bromofenol 0,001%
 - Uréia 10 M

- Coomassie-blue G-250
 - Comassie G-250 0,1%
 - Metanol 25%
 - Ácido acético 5%

- Solução de poliacrilamida
 - Acrilamida 30%
 - Bisacrilamida 0,8%
 - Água destilada

3.1.2. Tampões e soluções para Western-blot

- Tampão de transferência
 - NaHCO₃ 13 mM
 - Metanol 20%, pH 9,9

- Tampão PBS 1X
 - NaCl 150mM,
 - NaH₂PO₄ 25 mM, pH 7,5

- Tampão de revelação fosfatase (TRF)
 - Tris-HCl 100 mM pH 9,5
 - NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM

- Solução de bloqueio 5%
 - Leite Mólico
 - Água destilada

- NBT
 - 0,025 g de NBT
 - 1 ml de DMF 70%
 - Água destilada

- BCIP
 - 0,050 g
 - DMF 100%

- Solução de Ponceau
 - Ponceau S 2%
 - TCA 30%
 - Ácido sulfossalicílico 30%
 - Água destilada

3.1.1.3. Soluções para extração de DNA plasmidial

- Solução I
 - Glicose 50mM
 - Tris-HCl (pH 8,0) 25mM
 - EDTA (pH 8,0) 10mM

- Solução II
 - NaOH 0,2 N
 - SDS 1%;

- Solução III
 - Acetato de potássio 5M,
 - Ácido acético glacial
 - Água destilada

3.1.1.4. Tampões para cromatografia em resina Sepharose-Ni²⁺

- Solução de solubilização protéica contendo Guanidina 3M
 - TRIS-HCl 50 mM - pH 7,5
 - Guanidina 3M
 - Água bidestilada
- Tampão de ligação - pH 7,4
 - TRIS-HCl 20Mm
 - NaCl 500Mm
 - β-mercapto 1mM
 - Guanidina 6M
 - Imidazol 5mM
- Tampão de ligação - pH 7,4
 - TRIS-HCl 20Mm
 - NaCl 500Mm
 - β-mercapto 1mM
 - Guanidina 6M
 - Imidazol 5mM
- Tampão de eluição 1 - pH 7,4
 - TRIS-HCl 20Mm
 - NaCl 500Mm
 - β-mercapto 1mM
 - Guanidina 6M
 - Imidazol 50mM

- Tampão de eluição 2 - pH 7,4
 - TRIS-HCl 20Mm
 - NaCl 500Mm
 - β -mercapto 1mM
 - Guanidina 6M
 - Imidazol 100mM

- Tampão de eluição 3 - pH 7,4
 - TRIS-HCl 20Mm
 - NaCl 500Mm
 - β -mercapto 1mM
 - Guanidina 6M
 - Imidazol 500mM

3.2 Géis para eletroforese

- Gel de agarose 0,8%
 - Agarose
 - TAE 1X (item 3.1.1.1)
 - Brometo de etídeo 5 μ g/ml.

- Gel de poliacrilamida desnaturante:
 - Gel de empilhamento (5%)
 - Solução de poliacrilamida,
 - Tris-HCl 1M (pH 6,8)
 - SDS 10%,
 - Água destilada,
 - APS 10%,
 - TEMED;

- Gel de separação (10%)
 - Solução de poliacrilamida
 - Tris-HCl 1M (pH 8,8)
 - SDS 10%
 - Água destilada
 - APS 10%
 - TEMED

3.3 Marcadores de massa molecular

- Marcador de massa molecular DNA Lambda *HindIII*: DNA de fago lambda *gt118* (Amersham Pharmacia Biotech) digerido com endonuclease de restrição *HindIII* (Amersham Pharmacia Biotech).

3.4 Meios e placas de cultura

- LB líquido - pH 7,5
 - NaCl 0,5%
 - Extrato de levedura 0,5%
 - Triptona 1%

- LB sólido
 - LB líquido
 - Ágar bacteriológico 1,5 %

- SOB
 - Triptona 2%
 - Extrato de levedura 0,5%
 - NaCl 0,05%
 - KCl 2,5
 - MgCl₂ 10mM

- SOB sólido

SOB líquido

Ágar bacteriológico 1,5 %

– SOC

Triptona 2%

Extrato de levedura 0,5%

NaCl 0,05%

KCl 2,5

MgCl₂ 10mM

Glicose 20% na concentração final de 20mM

Placas de cultura: O meio de cultura sólido foi fundido e o antibiótico de interesse adicionado, para em seguida ser distribuído em placas de *Petri* estéreis sob fluxo laminar. Após a solidificação do meio, as placas foram acondicionadas a - 4 °C.

3.5 Antibióticos

- Ampicilina: 50 mg/ml (concentração de estoque); 100µg/ml (concentração de uso);

3.6 Enzimas

Todas as reações foram feitas de acordo com as especificações do fabricante.

- Endonuclease de Restrição: *Bam* HI (Invitrogen), *Nde* I (Invitrogen), *Eco* RI (Invitrogen)
- DNA Polimerase: *Elongase* (Invitrogen);
- Enzima de ligação: *T4*-DNA-ligase (Invitrogen);

3.7 Plasmídeo e Primers para clonagem

- Plasmídeo: pAE foi o plasmídeo utilizado como vetor de expressão e possui as seguintes características genóticas: promotor T7e T7 terminator, apresenta sítios de clivagem para diversas enzimas, entre elas: *Bam* HI, *Nde*I e *Eco* RI, múltiplos sítios de clonagem, resistência a ampicilina.

- Primers:
 - Fragmento N-GSK
 - iniciador 5' ttttcatatgagtggacggccgaggacg
 - iniciador 3' tttttgaattcttagtggtgggtgggtgggaaggagcaggttctgcggttgatg
 - Fragmento C-GSK
 - iniciador 5' ttttgatccgaccccgagacgggagtcctcaag
 - iniciador 3' aaaaagaattcttacacggggccgctgttgagg

3.8 Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas no trabalho

- AD494
- BL21 (DE3) C41
- BL21 (DE3) comum
- BL21 (DE3) PLIS E
- BL21 (DE3) PLIS S
- BL21 (DE3) Rosetta
- BL21 (DE3) SI
- BL21 (DE3) Star
- BL21(DE3) pT-GroE
- BL21-CodonPlus (DE3)-RIL
- BL21-CodonPlus (DE3)-RP

3.9 Coluna de Cromatografia

- Cromatografia de afinidade: HiTrapTMFF (1 ml) Sepharose-Ni²⁺ (Amersham Biosciences)

4 MÉTODOS

4.1 Subclonagem das regiões codificadoras das porções N- e C- terminais da GSK de *R. microplus*

Para a expressão das regiões N- e C- terminais da GSK, foram feitas duas clonagens. A sequência da região codificadora referente à porção N-terminal tem 564 pares de base traduzindo 188 aminoácidos, se estendendo do *códon inicial* até a primeiro domínio de quinase dessa proteína. A sequência correspondente à porção C-terminal possui 669 pares de base traduzindo 223 aminoácidos compreendendo o segundo domínio de atividade quinase da proteína, se estendendo até o códon de terminação.

Como DNA molde para a produção dos fragmentos de interesse foi utilizada a região codificadora do gene da GSK de *R. microplus* clonada no vetor pGEM-T (GSK/pGEM-T), desenvolvida em 2008 (ANDRADE, C. P., 2008).

Para a realização deste trabalho novos *primers* foram projetados para clonagem de cada fragmento no vetor de expressão pAE, utilizando as enzimas de restrição *Eco RI* e *Nde I* para o fragmento referente a porção N-terminal da GSK (N-GSK), e *Eco RI* e *Bam HI* para o fragmento referente à porção C-terminal da proteína (C-GSK).

Para dar início as clonagens foram feitos dois PCR utilizado 50 ng de DNA molde (GSK/pGEM-T) e *Elongase* seguindo os seguintes passos: Etapa 1, incubação a 94°C por 5 minutos; etapa 2, incubação a 94°C por 30 segundos; etapa 3, incubação a 60°C por 30 segundos; etapa 4, incubação a 68°C por 1,5 minutos; etapa 5, repetir os passos de 2, 3 e 4, 34 vezes seguidas; etapa 6, incubação a 68°C por 5 minutos. Em seguida o produto de amplificação obtido e o vetor de expressão pAE foram hidrolisados com as enzimas de restrição correspondentes a cada um dos insertos C-GSK e N-GSK, e ligados ao vetor utilizando-se *T4-DNA-ligase*. A proporção de ligação inserto e vetor foi 3:1, mantendo-se a reação a 16°C por 16h resultando nos plasmídeos N-GSK/pAE e C-GSK/pAE.

4.1.1 Transformação de Células Competentes por Choque Térmico

E. coli da linhagem TOP 10 foram transformadas por choque térmico com cada um dos plasmídeos, dando origem a células bacterianas transformadas que carregavam o

plasmídeo N-GSK/pAE ou C-GSK/pAE que carregam as regiões codificadoras das porções N- terminal ou C- terminais da GSK. Para cada um dos eventos de transformação bacteriana foi adicionado o equivalente a 50ng do DNA de interesse. As condições estabelecidas para o choque térmico foram: 20 minutos no gelo, seguidos por 40 segundos a 42°C e 1 minuto no gelo. O processo é finalizado por um período (1h) de incubação a 37°C em meio de cultura líquido. O produto da transformação bacteriana foi plaqueado em LB sólido contendo ampicilina e incubado a 37°C por 16h, dando condições para o crescimento de colônias de bactérias transformadas.

4.1.2 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina

Foram selecionadas oito colônias bacterianas transformantes em cada uma das placas correspondentes à transformação com os plasmídeos com regiões codificadoras das porções N- e C- terminais da GSK. Essas colônias foram inoculadas em 2,5ml de LB líquido contendo ampicilina e crescidas por 16h a 37°C sob agitação constante (160rpm) para posterior extração de DNA plasmidial.

A extração do DNA plasmidial foi realizado por lise alcalina de acordo com o seguinte protocolo: 1,5ml da cultura foram centrifugados a 12.000g por 1min, o precipitado de células foi ressuscitado em 100µl de Solução I e incubado por 10min no gelo. Em seguida foram adicionados 200µl de Solução II homogeneizando a suspensão por inversão do tubo de 5 a 6 vezes, por último 150µl de Solução III foi adicionada e conteúdo foi novamente homogeneizado por inversão do tubo. Cada uma das amostras foi incubada por 20min no gelo e em seguida centrifugada a 12.000g por 5min. O sobrenadante foi transferido para novos recipientes, dando-se início ao processo de purificação do DNA através lavagens intercaladas por nova centrifugação; primeiro com fenol, depois com fenol-clorofórmio e por último somente com clorofórmio. Depois da última centrifugação a fase superior da amostra foi transferida para novos recipientes e foi adicionado 1 volume de etanol absoluto e 0,1 volume de acetato de sódio 3M. A solução foi incubada por 1h a -20°C e centrifugada a 12.000g por 20min a 4°C, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado (sem ressuspender) com 1ml de etanol 70% que foi descartado. O precipitado secou completamente antes de ser ressuscitado com a solução contendo 1µg RNase. A suspensão permaneceu incubada por 1h a 37°C para a digestão do RNA.

4.2 Expressão dos fragmentos protéicos da Glicogênio Sintase Quinase (N-GSKr e C-GSKr)

Para a expressão de cada um dos fragmentos protéicos foram testadas diferentes linhagens de *E. coli* (AD494, BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) comum, (DE3) PLIS E, BL21 (DE3) PLIS S, BL21 (DE3) Rosetta, BL21 (DE3) SI, BL21 (DE3) Star, BL21(DE3)pT-GroE BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, BL21-CodonPlus (DE3)-RP), diferentes condições de temperatura (25°C e 37°C) e tempos de incubação (2h, 4h, 16h), sendo mantida a mesma agitação (160 rpm), definindo-se como condições ideais aquelas em que fosse obtida maior quantidade de proteína.

Para a expressão do fragmento protéico referente à porção N-terminal da GSK foi utilizado meio de cultura LB em todas as etapas, e temperatura de incubação de 25°C. Por sua vez, para a expressão do fragmento protéico referente à porção C-terminal da GSK foi utilizado meio de cultura SOC para a transformação por choque térmico e meio de cultura SOB para as demais etapas, e temperatura de incubação de 37°C. As condições de agitação e tempo de incubação foram as mesmas para ambos os fragmentos, sendo padronizados em 160rpm e 2h de incubação pós indução de expressão protéica com IPTG.

Cada um dos inóculos permaneceu incubado a 37°C sob agitação constante (160 rpm) até que atingissem $D.O_{600nm} = 0,6$. Quando atingida a D.O adequada, a expressão protéica foi induzida pela adição de IPTG 1mM permanecendo a cultura incubada por 2h sob agitação constante, de acordo com o padronizado. As culturas de células foram processadas por centrifugação se desprezando o meio de cultura e ressuspendendo-se o precipitado em um volume de água bidestilada equivalente ao volume do precipitado. Esta suspensão foi congelada em nitrogênio (N₂) líquido e em seguida descongelada, por 3 vezes seguidas, e então sonicada para promover a lise bacteriana. O lisado foi centrifugado a 12.000g por 30min para separar sobrenadante e precipitado que foram analisados por SDS-PAGE 12% e western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina marcado, revelando a presença de ambas proteínas no precipitado, portanto em corpúsculos.

4.3 Purificação das proteínas recombinantes expressadas: C-GSKr (proteína recombinante referente a porção C-terminal) e N-GSKr (proteína recombinante referente a porção N-terminal)

Em ambos os casos a proteína foi detectada na porção insolúvel da expressão e por isso a amostra foi solubilizada antes de ser usada na cromatografia. Para tal fim foi utilizada uma solução de solubilização contendo Guanidina 3M. Antes da cromatografia é aconselhável efetuar lavagens do extrato total protéico que servem para retirar parte das proteínas solúveis presentes no precipitado. Foi padronizada a utilização de PBS para essas lavagens, totalizando 2 lavagens por amostra de expressão.

O material protéico foi purificado por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (resina Sepharose-Ni²⁺) (LAZZAROTO BRESOLIN, *et al.*, 2009). Antes de ser aplicado na coluna de purificação todo o material deve ser filtrado com filtro de no mínimo 0,45µm. A amostra foi aplicada na coluna previamente equilibrada com 20ml de tampão de ligação. Em seguida, a coluna foi eluída com 10 ml de cada um dos tampões de eluição (5mM, 50mM, 100mM e 500mM), formando um gradiente descontínuo de imidazol. Foram recuperadas frações de 1ml durante a eluição. A D.O. de todas as amostras foi determinante para estimar em quais frações estava presente a maior quantidade de proteína. Aquelas frações que continham a maior concentração de proteína foram selecionadas e analisadas por SDS-PAGE 12% corado com Coomassie-blue G-250 e por Western-Blot utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina marcado com fosfatase.

4.4 Imunização de coelho com C-GSK

A partir de SDS-PAGE 12% foi recortada a banda referente à C-GSKr, este material foi macerado e misturado ao adjuvante Marcol Montanide e inoculado em um coelho, aproximadamente 600ng de proteína por dose. A inoculação foi repetida 3 vezes com intervalos de 15 dias entre cada uma delas. Depois da terceira imunização foi coletado 1,5ml de sangue que foi processado por centrifugação a 12.000g por 2min, separando-se o coágulo sanguíneo do soro. O soro foi coletado e armazenado a -20°C e o coágulo foi descartado. Por western blot este soro foi avaliado quanto a presença de anti-C-GSKr de *R. microplus*. O soro foi testado por western blot nas diluições 1:500 e 1:1000.

5 RESULTADOS

5.1 Subclonagem das regiões codificadoras das porções N- e C- terminais da GSK de *R. microplus*

Foram obtidos clones correspondentes a ligações de cada uma das regiões codificadoras das porções N- e C- terminais da GSK com o vetor pAE (2800pb) separadamente. Para verificar a identidade da clonagem, os plasmídeos foram purificados e analisados através de PCR (Figuras 3, 4) e também hidrolisados com as respectivas enzimas de restrição (Figura 5). Esses resultados foram visualizados por eletroforese em gel de Agarose 0,8%. No gel correspondente ao PCR verificamos que todas as amostras amplificaram e que todas apresentavam o tamanho esperado, de 564pb para a porção N-terminal e de 669pb para a porção C-terminal. No gel referente à hidrólise pudemos observar o mesmo padrão de bandas para todos os clones avaliados: uma banda na posição correspondente ao inserto e uma banda na posição correspondente ao vetor. Esses resultados foram reafirmados por sequenciamento do DNA dos insertos de interesse.

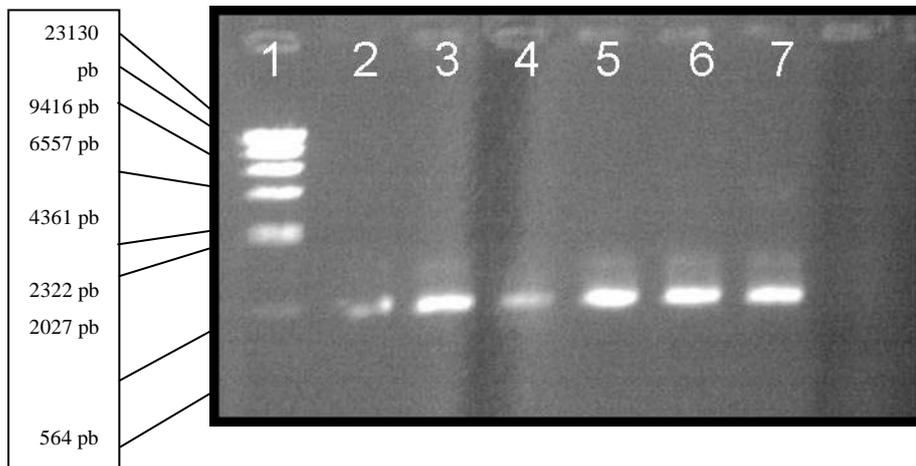


Figura 3: Eletroforese para a confirmação da identidade da região codificante para a porção N-terminal da GSK de *R. microplus*. 1) marcador massa molecular, 2-7) Fragmento gênico amplificado em cada um clones testados

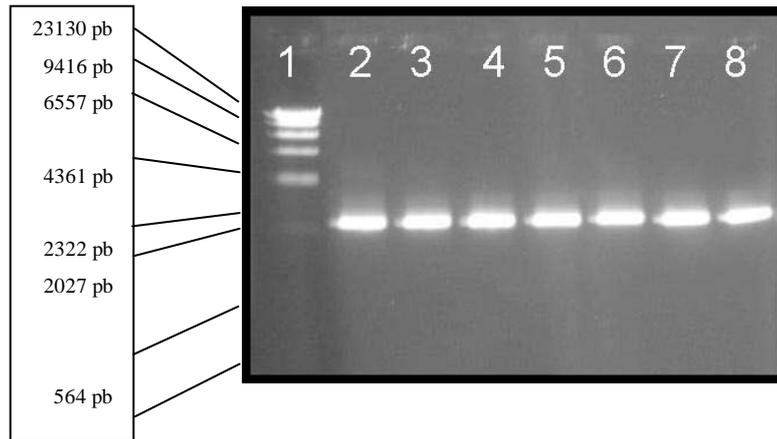


Figura 4: Eletroforese para a confirmação da identidade da região codificante para a porção C-terminal da GSK de *R. microplus*. 1) marcador massa molecular, 2-8) Fragmento gênico amplificado em cada um clones testados

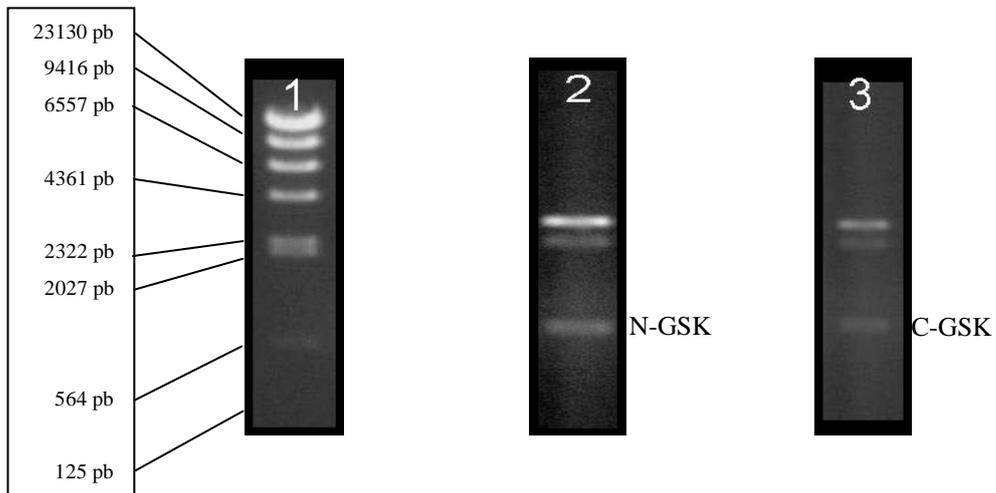


Figura 5: Hidrólise dos plasmídeos N-GSK/pAE e C-GSK/pAE correspondente ao vetor pAE (2800 pb) e os insertos 1) Marcador de massa molecular 2) N-GSK/pAE (564 pb) e 3) C-GSK/pAE (669 pb)

ATGAGTGGACGGCCGAGGACGACTTCCTTTGCTGAAGGGAACAAGCAGCCTCAA
 CAGCCGAATTTTCTCGCTGGAGTGAAAATAACCAGCAAGGACGGCGCCAAGGTGA
 CCACGGTGCTGGCCACCCCGGGCCAGGGGCCGGACCGGCCGCAGGAGGTGTCTT
 ACTGCGACACCAAGGTGATCGGCAATGGCTCCTTCGGGGTGGTGTACCAGGCGCG
 GCTGCTCGACTCTGGCCAACTGGTGGCCATCAAAAAGGTGCTGCAGGACAAGCGC
 TTCAAGAATCGCGAGCTGCAGATCATGCGCCGCTGGACCACTGTAACATAGTGAA
 GCTCAAGTACTTCTTCTACTCGAGCGGCGACAAGAAAGACGAGGTGTACCTGAAC
 CTGGTGCTCGAGTACATCCCCGAAACTGTGTACCGGGTGGCACGCCACTACAGCA
 AGTCCAAGCAGACCATCCCGATCTCCTTTATCAAGCTCTACATGTACCAGCTGTTCA
 GAAGTCTGGCATAACATCCACTCTCTGGGCATCTGCCATCGGGACATCAAACCGCAG
 AACCTGCTCCTTGACCCCGAGACGGGAGTCCTCAAGCTGTGCGACTTTGGCAGCG
CCAAGCTGCTAATCAAGGGTGAGCCCAACGTGTCGTACATCTGCTCGCGCTACTAC
CGGGCCCCAGAACTGATCTTTGGTGGCAGACTACACGACCATGATTGACGTGT
GGTCGGCGGGTGTGTGCTGGCCGAGCTACTGCTGGGCCAGCCATTTTTCCCGG
GGACAGCGGTGTTGACCAGCTGGTGGAGATCATCAAGGTGTTGGGCACGCCCTCT
AAGGAGCAGATCCGCGAGATGAACCGCAACTACACGGAGTTCAAGTTTCCCCAGA
TCAAGGCACACCCGTGGCACAAGGTGTTTCGGGCACGGACGCCCGGCGACGCCAT
CGAACTGGTCTCGCGGCTGCTCGAGTACACACCCAGTGCACGCATAGGCCCCCTG
CAGGCCTGCGCGCACAACTTCTTCAATGAGTTACGGGAACCGGGCACCCAGGCTGC
CTAATGGGCGCGAGCTGCCTCCCCTCTTTGACTTCACACCCACGAGCTCTCTG
GAGCCCCAGCTGAATGCCACGCTGATCCAGCGTATTTGCGAGGTGGCGAGGCTG
TTCCCACGGCGGGAGCGGCAGGGTCGTCGTCCGAGACAGCCGAAGCATCCACCTC
AAACAGCGGCCCCCGTGTAA

Figura 6: Sequências de códons correspondente à proteína GSK completa de *R. microplus* (a porção sublinhada se refere a região codificadora do fragmento C-terminal (C-GSK))

```

MSGRPRTTSFAEGNKQPQQPNFLAGVKITSKDGAKVTTVLATPGQGPDRPQEVSYCD
TKVIGNGSFQVYQARLLDSGQLVAIKKVLQDKRFKNRELQIMRRLDHCNIVKLYF
FYSSGDKKDEVYLNLVLEYIPETVYRVARHYSKSKQTIPISFIKLYMYQLFRSLAYIHSL
GICHRDIKPQNLLLHHHHHH

```

Figura 7: Sequência de aminoácidos deduzida a partir do sequenciamento do inserto correspondente ao fragmento N-terminal (N-GSK)

```

MTTMIDVWSAGCVLAELLGQPIFPGDSGVDQLVEIHKVLGTPSKEQIREMNRNYTEF
KFPQIKAHPWHKVFRRARTPGDAIELVSRLLEYTPSARIGPLQACAHNFFNELREPGTRL
PNGRELPLFDFTPHELPLEPQLNATLIPAYLRGGEAVPTAGAAGSSSETAEASTSNSGP
VHHHHHHH*

```

Figura 8: Sequência de aminoácidos deduzida a partir do sequenciamento do inserto correspondente ao fragmento C-terminal (C-GSK)

<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----ATGAGT	6
<i>Ixodes scapularis</i>	-----ATGGAT	6
<i>Aedes aegypti</i>	-----ATGA	4
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	-----ATGT	4
<i>Mus musculus</i>	-----ATGT	4
<i>Canis familiaris</i>	ATGGGTGGGGCGTGGGGCCTCGAGCTCC	30
<i>Homo sapiens</i>	-----ATGT	4
<i>Rhipicephalus microplus</i>	G--GACGGCCGAGGACGACTTCCTTTGCTG	34
<i>Ixodes scapularis</i>	GCAGACGGTCGGCGACGGC--CACTCGTTG	34
<i>Aedes aegypti</i>	GTGGTCGGCCCAGGACTACCTCTTTTGCGG	34
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	CAGGGCGGCCCAGAACCACCTCCTTTGCGG	34
<i>Mus musculus</i>	CGGGGCGACCGAGAACCACCTCCTTTGCGG	34
<i>Canis familiaris</i>	GGGGGCGGCC--CACCGGCAGCGGCGGAG	58
<i>Homo sapiens</i>	CAGGGCGGCCCAGAACCACCTCCTTTGCGG	34
<i>Rhipicephalus microplus</i>	AAGG-GAACAA----GCAGCCTCAACAGCC	59
<i>Ixodes scapularis</i>	AACTCGGCCAG----GCTCCGACCGCACGC	60
<i>Aedes aegypti</i>	AGGGCAACAA----GACGCAAACACTACCC	59
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	AGAGCTGCAA--GCCAGTGCAGCAGCCTTC	62
<i>Mus musculus</i>	AGAGCTGCAA--GCCAGTGCAGCAGCCTTC	62

<i>Canis familiaris</i>	GAGGCAGCGGCGGCCCGGGT-GCGGGCACT	87
<i>Homo sapiens</i>	AGAGCTGCAA--GCCGGTGCAGCAGCCTTC	62
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GAATTTTCTCGCTGGAGTGAAAATAACCAG	89
<i>Ixodes scapularis</i>	GTCCCTGAGCCCCGCCCTCTCTCCGCAAGG	90
<i>Aedes aegypti</i>	CGTTATGGGTGGCATGAAAATAATCA---G	86
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	GGCTTTTGGCAGCATGAAAGTTAGCAGAGA	92
<i>Mus musculus</i>	AGCTTTTGGTAGCATGAAAGTTAGCAGAGA	92
<i>Canis familiaris</i>	AGCTTCCCGCCGC-CGGGAGTGAAGCTGGG	116
<i>Homo sapiens</i>	AGCTTTTGGCAGCATGAAAGTTAGCAGAGA	92
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CAAGGACGGCGCCAAGGTGACCACGGTGCT	119
<i>Ixodes scapularis</i>	CAAGGATGGGGCCAAGGTGACGACGGTGCT	120
<i>Aedes aegypti</i>	TAAAGATGGTTCAAAGTGACAACGGTTGT	116
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	CAAAGATGGCAGCAAGGTGACCACAGTGGT	122
<i>Mus musculus</i>	TAAAGATGGCAGCAAGGTAACCACAGTAGT	122
<i>Canis familiaris</i>	CCGTGACAGCGGGAAGGTGACCACAGTGGT	146
<i>Homo sapiens</i>	CAAGGACGGCAGCAAGGTGACAACAGTGGT	122
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GGCCACCCCGGGCCAGGGGCCGGACCGGCC	149
<i>Ixodes scapularis</i>	GGCGACGCCCGGCCAGGGGCCCGACCGGCC	150
<i>Aedes aegypti</i>	GGCAACAGCCGGCCAGGGACCAGACAGACC	146
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	GGCAACTCCTGGGCAGGGTCCAGACAGGCC	152
<i>Mus musculus</i>	GGCAACTCCTGGCCAGGGTCCTGACAGGCC	152
<i>Canis familiaris</i>	AGCCACTCTAGGCCAAGGCCCGGAGCGCTC	176
<i>Homo sapiens</i>	GGCAACTCCTGGGCAGGGTCCAGACAGGCC	152
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GCAGGAGGTGTCTTACTGCGACACCAAGGT	179
<i>Ixodes scapularis</i>	GCAAGAGGTGTCTTACTCGGACACCAAGGT	180
<i>Aedes aegypti</i>	ACAGGAAGTATCATAACAGATACCAAGGT	176
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	ACAAGAAGTCAGCTATACAGACACTAAAGT	182
<i>Mus musculus</i>	ACAGGAAGTCAGTTATACAGACACGAAAGT	182
<i>Canis familiaris</i>	CCAGGAGGTGGCTTACACAGACATCAAAGT	206
<i>Homo sapiens</i>	ACAAGAAGTCAGCTATACAGACACTAAAGT	182
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GATCGGCAATGGCTCCTTCGGGGTGGTGTA	209
<i>Ixodes scapularis</i>	GATCGGCAACGGCTCCTTCGGGGTGGTGTA	210
<i>Aedes aegypti</i>	GATCGGCAATGGAAGCTTCGGCGTTGTCTT	206
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	GATTGGAAATGGGTCATTTGGTGTGCTGTA	212
<i>Mus musculus</i>	GATTGGAAATGGATCATTTGGTGTGGTATA	212
<i>Canis familiaris</i>	GATTGGCAATGGCTCATTTGGGGTTCGTGTA	236
<i>Homo sapiens</i>	GATTGGAAATGGATCATTTGGTGTGGTATA	212
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CCAGGCGCGGCTGCTCGACTCTGGCCAAC	239
<i>Ixodes scapularis</i>	CCAGGCACGCCTGCTGGACACGGCCGAGCT	240
<i>Aedes aegypti</i>	CCAGGCGACGCTCTGTGATACGGGCGAGCT	236

<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	TCAAGCCAAACTTTGTGATTCAGGAGAACT	242
<i>Mus musculus</i>	TCAAGCCAAACTTTGTGATTCTGGAGAACT	242
<i>Canis familiaris</i>	CCAGGCACGGCTGGCTGAGACCAGGGAAC	266
<i>Homo sapiens</i>	TCAAGCCAAACTTTGTGATTCAGGAGAACT	242
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GGTGGCCATCAAAAAGGTGCTGCAGGACAA	269
<i>Ixodes scapularis</i>	GGTGGCCATCAAGAAGGTGCTCCAGGACAA	270
<i>Aedes aegypti</i>	AGTCGCAATTAAGAAGGTGTTACAGGACAA	266
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	GGTTGCCATCAAGAAAGTATTGCAAGACAA	272
<i>Mus musculus</i>	GGTTGCCATCAAGAAAGTTCTACAGGACAA	272
<i>Canis familiaris</i>	GGTGGCCATCAAGAAGGTCTCCAGGACAA	296
<i>Homo sapiens</i>	GGTCGCCATCAAGAAAGTATTGCAGGACAA	272
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GCGCTTCAAG-----	279
<i>Ixodes scapularis</i>	GAGGTTCAAGGCAAGTCCCCCTGTCTCAAG	300
<i>Aedes aegypti</i>	AAGATTTAAG-----	276
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	GAGATTTAAG-----	282
<i>Mus musculus</i>	GCGATTTAAG-----	282
<i>Canis familiaris</i>	AAGGTTCAAG-----	306
<i>Homo sapiens</i>	GAGATTTAAG-----	282
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	279
<i>Ixodes scapularis</i>	GTTTACCTACGACGGTTGGAGGCCGCTTGT	330
<i>Aedes aegypti</i>	-----	276
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	-----	282
<i>Mus musculus</i>	-----	282
<i>Canis familiaris</i>	-----	306
<i>Homo sapiens</i>	-----	282
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	279
<i>Ixodes scapularis</i>	GCCCATGTCGTGGGCGGTATTCGCAACTTT	360
<i>Aedes aegypti</i>	-----	276
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	-----	282
<i>Mus musculus</i>	-----	282
<i>Canis familiaris</i>	-----	306
<i>Homo sapiens</i>	-----	282
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	279
<i>Ixodes scapularis</i>	AGGGCGACGCCGGCCAGGTGCCATCCACG	390
<i>Aedes aegypti</i>	-----	276
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	-----	282
<i>Mus musculus</i>	-----	282
<i>Canis familiaris</i>	-----	306
<i>Homo sapiens</i>	-----	282

<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----AATCG	284
<i>Ixodes scapularis</i>	GACGCTTTCTCTAGAAACGCCGGAGAACCG	420
<i>Aedes aegypti</i>	-----AACCG	281
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	1
<i>Bos taurus</i>	-----AACCG	287
<i>Mus musculus</i>	-----AACCG	287
<i>Canis familiaris</i>	-----AACCG	311
<i>Homo sapiens</i>	-----AATCG	287
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CGAGCTGCAGATCATGCGCCGCTGGACCA	314
<i>Ixodes scapularis</i>	GGAGCTGCAAATCATGCGACGACTAGATCA	450
<i>Aedes aegypti</i>	CGAACTACAGATTATGCGACGGCTAGAACA	311
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----ATGCGCAAATTGGAGCA	17
<i>Bos taurus</i>	AGAGCTCCAGATCATGAGAAAGCTAGATCA	317
<i>Mus musculus</i>	AGAGCTCCAGATCATGAGAAAGCTAGACCA	317
<i>Canis familiaris</i>	AGAGCTGCAGATTATGCGTAAGCTGGTCCA	341
<i>Homo sapiens</i>	AGAGCTCCAGATCATGAGAAAGCTAGATCA	317
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CTGTAACATAGTGAAGCTCAAGTACTTCTT	344
<i>Ixodes scapularis</i>	TTGTAACATAGTGAAGCTGAAGTACTTCTT	480
<i>Aedes aegypti</i>	CTGTAATATTGTTAAACTAAAATATTTCTT	341
<i>Drosophila melanogaster</i>	TTGTAATATTGTGAAGCTTTTGTACTTTTT	47
<i>Bos taurus</i>	CTGTAACATAGTCCGATTGCGTTATTTCTT	347
<i>Mus musculus</i>	CTGTAACATAGTCCGACTGCGGTATTTCTT	347
<i>Canis familiaris</i>	CTGCAATATTGTAAGGCTGAGATACTTCTT	371
<i>Homo sapiens</i>	CTGTAACATAGTCCGATTGCGTTATTTCTT	347
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CTACTCGAGCGGCGACAAG-----	363
<i>Ixodes scapularis</i>	CTACTCCAGTGGCGACGAGGCAAGTTGCAC	510
<i>Aedes aegypti</i>	TTACTCCAGCGGCGATAAG-----	360
<i>Drosophila melanogaster</i>	CTATTCGAGTGGTGAAAAG-----	66
<i>Bos taurus</i>	CTACTCAAGTGGTGAAAAG-----	366
<i>Mus musculus</i>	CTACTCGAGTGGTGAGAAG-----	366
<i>Canis familiaris</i>	CTACTCCAGTGGGGAGAAG-----	390
<i>Homo sapiens</i>	CTACTCCAGTGGTGAGAAG-----	366
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	363
<i>Ixodes scapularis</i>	CTCTTCCCGCGTTCTTGGGTCGATCTCTGC	540
<i>Aedes aegypti</i>	-----	360
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	66
<i>Bos taurus</i>	-----	366
<i>Mus musculus</i>	-----	366
<i>Canis familiaris</i>	-----	390
<i>Homo sapiens</i>	-----	366
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	363
<i>Ixodes scapularis</i>	CGACTCGCCTAGCAGCGAGGAGGAAGAG	570
<i>Aedes aegypti</i>	-----	360
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	66
<i>Bos taurus</i>	-----	366
<i>Mus musculus</i>	-----	366

<i>Canis familiaris</i>	-----	390
<i>Homo sapiens</i>	-----	366
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	363
<i>Ixodes scapularis</i>	GTTTTACGCAAGCAGCCCTTTGCGGCGGT	600
<i>Aedes aegypti</i>	-----	360
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	66
<i>Bos taurus</i>	-----	366
<i>Mus musculus</i>	-----	366
<i>Canis familiaris</i>	-----	390
<i>Homo sapiens</i>	-----	366
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	363
<i>Ixodes scapularis</i>	GCTGCGGCGTGCCGGCCCTCACCCCAGCTC	630
<i>Aedes aegypti</i>	-----	360
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----	66
<i>Bos taurus</i>	-----	366
<i>Mus musculus</i>	-----	366
<i>Canis familiaris</i>	-----	390
<i>Homo sapiens</i>	-----	366
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----AAAGACGAGGT	374
<i>Ixodes scapularis</i>	CCTCTCTCTCTCCCCGAGAAAGACGAAGT	660
<i>Aedes aegypti</i>	-----AAAGACGAAGT	371
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----CGTGATGAAGT	77
<i>Bos taurus</i>	-----AAAGATGAGGT	377
<i>Mus musculus</i>	-----AAAGATGAGGT	377
<i>Canis familiaris</i>	-----AAAGATGAGCT	401
<i>Homo sapiens</i>	-----AAAGATGAGGT	377
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GTACCTGAACCTGGTGCTCGAGTACATCCC	404
<i>Ixodes scapularis</i>	ATATCTGAACCTGGTCTTAGAGTACATCCC	690
<i>Aedes aegypti</i>	TTATCTCAACCTAGTGCTCGAATATATTCC	401
<i>Drosophila melanogaster</i>	ATTTTTGAATTTAGTCCTCGAATATATAACC	107
<i>Bos taurus</i>	CTATCTTAATCTGGTGCTGGACTACGTTCC	407
<i>Mus musculus</i>	CTACCTTAACCTGGTGCTGGACTATGTTCC	407
<i>Canis familiaris</i>	TTATCTAAATCTGGTGCTGGAATACGTGCC	431
<i>Homo sapiens</i>	CTATCTTAATCTGGTGCTGGACTATGTTCC	407
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CGAAACTGTGTACCGGGTGGCACGCCACTA	434
<i>Ixodes scapularis</i>	GGAGACTGTGTACAGAGTAGCAAGGCACTA	720
<i>Aedes aegypti</i>	AGAAACCGTATACAAAGTGGCACGTTATTA	431
<i>Drosophila melanogaster</i>	AGAAACCGTATACAAAGTGGCTCGCCAATA	137
<i>Bos taurus</i>	GGAAACAGTCTACAGAGTCGCCAGACACTA	437
<i>Mus musculus</i>	GGAGACAGTGTACAGAGTCGCCAGACACTA	437
<i>Canis familiaris</i>	CGAGACAGTGTACCGGGTGGCCCGCCATTT	461
<i>Homo sapiens</i>	GGAAACAGTATACAGAGTTGCCAGACACTA	437
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CAGCAAGTCCAAGCAGACCATCCCGATCTC	464
<i>Ixodes scapularis</i>	TAGCAAGTCGAAGCAGACGATACCCATATC	750
<i>Aedes aegypti</i>	TGCTAAAAACAAACAAACGATACCAATCAA	461

<i>Drosophila melanogaster</i>	TGCCAAAACCAAGCAAACGATACCAATCAA	167
<i>Bos taurus</i>	TAGTCGAGCCAAACAGACGCTCCCTGTGAT	467
<i>Mus musculus</i>	TAGTCGAGCCAAGCAGACACTCCCTGTGAT	467
<i>Canis familiaris</i>	CACCAAGGCCAAGTTGACCATCCCTATCAT	491
<i>Homo sapiens</i>	TAGTCGAGCCAAACAGACGCTCCCTGTGAT	467
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CTTTATCAAGCTCTACATGTACCAGCTGTT	494
<i>Ixodes scapularis</i>	TTTTATCAAGCTGTACATGTACCAACTGTT	780
<i>Aedes aegypti</i>	TTTTATCAGGCTCTATATGTACCAGCTGTT	491
<i>Drosophila melanogaster</i>	CTTTATTTCGGCTCTACATGTATCAACTGTT	197
<i>Bos taurus</i>	CTATGTCAAGTTGTATATGTATCAGCTGTT	497
<i>Mus musculus</i>	CTATGTCAAGTTGTATATGTATCAGCTGTT	497
<i>Canis familiaris</i>	CTATGTCAAGGTGTACATGTACCAGCTCTT	521
<i>Homo sapiens</i>	TTATGTCAAGTTGTATATGTATCAGCTGTT	497
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CAGAAGTCTGGCATAACATCCACTCTCTGGG	524
<i>Ixodes scapularis</i>	TAGGAGCCTAGCCTACATCCATTCCCTGGG	810
<i>Aedes aegypti</i>	CCGGAGTCTCGCCTACATCCACTCGCTCGG	521
<i>Drosophila melanogaster</i>	CAGAAGTTTGGCCTACATCCACTCGCTGGG	227
<i>Bos taurus</i>	CCGAAGTTTAGCCTATATCCATTCCCTTTGG	527
<i>Mus musculus</i>	CAGAAGTCTAGCCTATATCCATTCCCTTTGG	527
<i>Canis familiaris</i>	CCGGAGCTTGGCCTACATCCACTCCCAGGG	551
<i>Homo sapiens</i>	CCGAAGTTTAGCCTATATCCATTCCCTTTGG	527
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CATCTGCCATCGGGACATCAAACCGCAGAA	554
<i>Ixodes scapularis</i>	AATCTGCCACCGGGACATCAAGCCCCAGAA	840
<i>Aedes aegypti</i>	TATCTGCCATCGTGACATCAAACCCCAGAA	551
<i>Drosophila melanogaster</i>	CATTTGCCATCGTGATATCAAGCCGCAGAA	257
<i>Bos taurus</i>	AATCTGCCATCGGGATATTAAACCACAGAA	557
<i>Mus musculus</i>	AATCTGCCATCGAGACATTAAACCACAGAA	557
<i>Canis familiaris</i>	GGTGTGTCACCGTGACATCAAGCCCCAGAA	581
<i>Homo sapiens</i>	AATCTGCCATCGGGATATTAAACCGCAGAA	557
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CCTGCTCCTTGACCCCGAGACGGGAGTCCT	584
<i>Ixodes scapularis</i>	CCTGCTGCTGGACCCCGAGACGGGCGTCCT	870
<i>Aedes aegypti</i>	CCTGCTGCTAGACCCGGAGACGGCCGTACT	581
<i>Drosophila melanogaster</i>	TCTTCTGCTCGATCCGGAGACGGCTGTGCT	287
<i>Bos taurus</i>	CCTCTTGTTGGATCCTGATACAGCTGTCTT	587
<i>Mus musculus</i>	CCTCTTGTTGGATCCTGATACAGCTGTATT	587
<i>Canis familiaris</i>	CCTGCTGGTGGACCCTGACACAGCTGTCTT	611
<i>Homo sapiens</i>	CCTCTTGTTGGATCCTGATACTGCTGTATT	587
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CAAGCTGTGCGACTTTGGCAGCGC-----	608
<i>Ixodes scapularis</i>	CAAGCTGTGTGACTTCGGAAGCATGCTAAC	900
<i>Aedes aegypti</i>	GAAGCTGTGCGACTTTGGCAGTGC-----	605
<i>Drosophila melanogaster</i>	GAAGCTCTGTGACTTTGGCAGCGC-----	311
<i>Bos taurus</i>	GAAACTCTGTGACTTTGGAAGTGC-----	611
<i>Mus musculus</i>	AAAACTCTGTGACTTTGGAAGTGC-----	611
<i>Canis familiaris</i>	CAAGCTCTGCGATTTTGGCAGTGC-----	635
<i>Homo sapiens</i>	AAAACTCTGTGACTTTGGAAGTGC-----	611

<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----CAAGCTGC---T	617
<i>Ixodes scapularis</i>	CTTGGACGTCTGTGTGGGCAAGCTGCACGT	930
<i>Aedes aegypti</i>	-----CAAACAGT---T	614
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----CAAACAGC---T	320
<i>Bos taurus</i>	-----AAAGCAGC---T	620
<i>Mus musculus</i>	-----AAAGCAGC---T	620
<i>Canis familiaris</i>	-----AAAGCAGT---T	644
<i>Homo sapiens</i>	-----AAAGCAGC---T	620
<i>Rhipicephalus microplus</i>	AATCAAGGGTGAGCCCAACGTGTCGTACAT	647
<i>Ixodes scapularis</i>	AGCCGAGGCAGGGCTCTCCGGGATCTTCGG	960
<i>Aedes aegypti</i>	GCTGCATGGGGAGCCGAACGTGTCGTACAT	644
<i>Drosophila melanogaster</i>	GCTGCACGGCGAGCCGAATGTATCGTATAT	350
<i>Bos taurus</i>	GGTCCGTGGAGAACCCAATGTTTCGTATAT	650
<i>Mus musculus</i>	GGTCCGAGGAGAGCCCAATGTTTCATATAT	650
<i>Canis familiaris</i>	GGTCCGGGGGAGCCCAACGTCTCCTACAT	674
<i>Homo sapiens</i>	GGTCCGAGGAGAACCCAATGTTTCGTATAT	650
<i>Rhipicephalus microplus</i>	--CTGCTCGCGCTACTACCGGGCCCCAGAA	675
<i>Ixodes scapularis</i>	TGCTACCGTTCGCTTCCACCTGCCTCCAGAA	990
<i>Aedes aegypti</i>	--CTGCTCGCGATACTACCGGGCACC GGAG	672
<i>Drosophila melanogaster</i>	--CTGCTCCCGGTATTACCGCGCCCCCGAG	378
<i>Bos taurus</i>	--CTGTTCTCGGTACTATAGGGCACCAGAG	678
<i>Mus musculus</i>	--CTGTTCTCGGTACTACAGGGCACCAGAG	678
<i>Canis familiaris</i>	--CTGTTCTCGCTACTACAGGGCCCCGGAG	702
<i>Homo sapiens</i>	--CTGTTCTCGGTACTATAGGGCACCAGAG	678
<i>Rhipicephalus microplus</i>	C--TGATCTTTGGTGCGACAGA-----CTA	698
<i>Ixodes scapularis</i>	CGCTAATCTTCCGCTCAAAAGTGAGTCCCC	1020
<i>Aedes aegypti</i>	T--TGATATTTGGTGCCATAAA-----CTA	695
<i>Drosophila melanogaster</i>	C--TCATCTTTGGCGCCATCAA-----TTA	401
<i>Bos taurus</i>	T--TGATCTTTGGAGCCACTGA-----TTA	701
<i>Mus musculus</i>	T--TGATCTTTGGAGCCACTGA-----TTA	701
<i>Canis familiaris</i>	C--TGATCTTCGGAGCCACTGA-----TTA	725
<i>Homo sapiens</i>	T--TGATCTTTGGAGCCACTGA-----TTA	701
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CACGACCATGATTG-----A	713
<i>Ixodes scapularis</i>	AACGTCCAAGCGTGGGGACCGTCTCGCAGA	1050
<i>Aedes aegypti</i>	TACCACAAAGATCG-----A	710
<i>Drosophila melanogaster</i>	TACAACAAAGATCG-----A	416
<i>Bos taurus</i>	TACCTCTAGTATAG-----A	716
<i>Mus musculus</i>	CACGTCCAGTATAG-----A	716
<i>Canis familiaris</i>	CACCTCGTCCATTG-----A	740
<i>Homo sapiens</i>	TACCTCTAGTATAG-----A	716
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CGTGTGGTTCGGCGGGTTGTGTGCTGGCCGA	743
<i>Ixodes scapularis</i>	CGTATGGTTCGGCCGGCTGCGTGCTGGCCGA	1080
<i>Aedes aegypti</i>	CGTCTGGAGTGC GGATGCGTACTAGCCGA	740
<i>Drosophila melanogaster</i>	TGTCTGGAGTGC CGGTTGCGTTTTGGCCGA	446
<i>Bos taurus</i>	TGTATGGTCTGCAGGCTGTGTGTTGGCTGA	746
<i>Mus musculus</i>	TGTATGGTCTGCAGGCTGTGTGTTGGCTGA	746

<i>Canis familiaris</i>	TGTGTGGTCAGCTGGCTGCGTCCTGGCCGA	770
<i>Homo sapiens</i>	TGTATGGTCTGCTGGCTGTGTGTTGGCTGA	746
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GCTACTGCTGGGCCAGCCCATTTTTCCCGG	773
<i>Ixodes scapularis</i>	GCTGCTGCTGGGGCAGCCCATCTTCCCGGG	1110
<i>Aedes aegypti</i>	ATTACTCCTTGGACAGCCCATCTTCCCGGG	770
<i>Drosophila melanogaster</i>	ACTGCTGCTGGGCCAGCCCATCTTCCCTGG	476
<i>Bos taurus</i>	GCTGTTGCTAGGACAGCCAATATTTCCAGG	776
<i>Mus musculus</i>	ATTGTTGCTAGGACAACCAATATTTCCCTGG	776
<i>Canis familiaris</i>	GCTCCTCCTGGGCCAGCCCATCTTCCCTGG	800
<i>Homo sapiens</i>	GCTGTTACTAGGACAACCAATATTTCCAGG	776
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GGACAGCGGTGTTGACCAGCTGGTGGAGAT	803
<i>Ixodes scapularis</i>	CGACAGCGGGGTGACCAGCTGGTGGAGAT	1140
<i>Aedes aegypti</i>	CGACTCCGGCGTTCGACCAGTTGGTAGAAAT	800
<i>Drosophila melanogaster</i>	CGATTCCGGTGTGGATCAGCTCGTCGAGGT	506
<i>Bos taurus</i>	AGACAGTGGTGTGGATCAGTTGGTGGAAAT	806
<i>Mus musculus</i>	GGACAGTGGTGTGGATCAGTTGGTGGAAAT	806
<i>Canis familiaris</i>	GGACAGCGGGGTAGATCAGCTGGTGGAGAT	830
<i>Homo sapiens</i>	GGATAGTGGTGTGGATCAGTTGGTAGAAAT	806
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CATCAAGGTGTTGGGCACGCCCTCTAAGGA	833
<i>Ixodes scapularis</i>	CATCAAGGTGCTGGGCACCCCGACCAAGGA	1170
<i>Aedes aegypti</i>	CATCAAGGTCCTCGGCACGCCAACCCGGGA	830
<i>Drosophila melanogaster</i>	CATCAAGGTCCTGGGCACACCGACAAGAGA	536
<i>Bos taurus</i>	AATCAAGGTCCTGGGGACACCAACAAGGGA	836
<i>Mus musculus</i>	AATAAAGGTCCTAGGAACACCAACAAGGGA	836
<i>Canis familiaris</i>	CATCAAGGTGCTGGGTACACCAACCCGGGA	860
<i>Homo sapiens</i>	AATCAAGGTCCTGGGAACTCCAACAAGGGA	836
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GCAGATCCGCGAGATGAACCGCAACTACAC	863
<i>Ixodes scapularis</i>	GCAGATCCGCGAGATGAACCGCAACTACAC	1200
<i>Aedes aegypti</i>	ACAGATCAAGGAAATGAACCCCAACTATAC	860
<i>Drosophila melanogaster</i>	ACAGATACGCGAAATGAATCCAAACTACAC	566
<i>Bos taurus</i>	GCAAATTCGAGAAATGAACCCAAACTACAC	866
<i>Mus musculus</i>	GCAAATTAGAGAAATGAACCCAAATTATAC	866
<i>Canis familiaris</i>	ACAGATCCGAGAGATGAACCCCTAACTACAC	890
<i>Homo sapiens</i>	GCAAATCAGAGAAATGAACCCAAACTACAC	866
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GGAGTTCAAGTTTCCCCAGATCAAGGCACA	893
<i>Ixodes scapularis</i>	GGAGTTCAAGTTCCCCAGATCAAGGCGCA	1230
<i>Aedes aegypti</i>	GGAATTCAAATTTCCCCAGATCAAAAGTCA	890
<i>Drosophila melanogaster</i>	GGAATTCAAGTTCCCTCAGATTAAGAGTCA	596
<i>Bos taurus</i>	GGAATTCAAATTTCCCTCAAATTAAGGCACA	896
<i>Mus musculus</i>	AGAATTCAAATTTCCCTCAAATCAAGGCACA	896
<i>Canis familiaris</i>	GGAGTTCAAGTTTCCCCAGATTAAGCTCA	920
<i>Homo sapiens</i>	AGAATTTAAATTTCCCTCAAATTAAGGCACA	896
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CCCGTGGCACAAGG-----	907
<i>Ixodes scapularis</i>	CCCGTGGCAGAAGG-----	1244
<i>Aedes aegypti</i>	TCCATGGCAGAAGG-----	904

<i>Drosophila melanogaster</i>	TCCATGGCAGAAAG-----	610
<i>Bos taurus</i>	TCCTTGGACTAAGGATTCGTCAGGAACAGG	926
<i>Mus musculus</i>	TCCTTGGACAAAGG-----	910
<i>Canis familiaris</i>	CCCCTGGACAAAGGTGGGGCAGGGCTGGGG	950
<i>Homo sapiens</i>	TCCTTGGACTAAGGATTCGTCAGGAACAGG	926
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----TGTTTCG	914
<i>Ixodes scapularis</i>	-----TGTTCCG	1251
<i>Aedes aegypti</i>	-----TATTCCG	911
<i>Drosophila melanogaster</i>	-----TTTTCCG	617
<i>Bos taurus</i>	ACATTTACCTCAGGAGTGCGGGTCTTCCG	956
<i>Mus musculus</i>	-----TCTTCCG	917
<i>Canis familiaris</i>	GCTCAGGCAGCAAGGTGACGAGTGTTCAA	980
<i>Homo sapiens</i>	ACATTTACCTCAGGAGTGCGGGTCTTCCG	956
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GGCACGGACGCCCGGCGACGCCATCGAACT	944
<i>Ixodes scapularis</i>	TGCCCGCACCCCGCCGAGGCCATAGAGCT	1281
<i>Aedes aegypti</i>	AGCGCGTACCCACCAGATGCGATCGCACT	941
<i>Drosophila melanogaster</i>	TATACGACTCCTACAGAAGCTATCAACTT	647
<i>Bos taurus</i>	ACCCCGAACTCCACCCGAGGCGATTGCACT	986
<i>Mus musculus</i>	GCCCCGAACTCCACCAGAGGCAATTGCACT	947
<i>Canis familiaris</i>	ATCTCGAACGCCCGCCAGAGGCCATTGCACT	1010
<i>Homo sapiens</i>	ACCCCGAACTCCACCAGAGGCAATTGCACT	986
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GGTCTCGCGGCTGCTCGAGTACACACCCAG	974
<i>Ixodes scapularis</i>	GGTGGCTCGCCTGCTCGAGTACACCCCTC	1311
<i>Aedes aegypti</i>	GGTGTCCCGGTTGCTAGAGTACACGCCGGG	971
<i>Drosophila melanogaster</i>	GGTGTCCCTGCTGCTCGAGTATACGCCAG	677
<i>Bos taurus</i>	TTGTAGCCGTCTGCTGGAGTATACACCAAC	1016
<i>Mus musculus</i>	GTGCAGCCGTCTGCTGGAGTACACACCTAC	977
<i>Canis familiaris</i>	CTGCTCTAGCCTGCTGGAGTACACACCGTC	1040
<i>Homo sapiens</i>	GTGTAGCCGTCTGCTGGAGTATACACCAAC	1016
<i>Rhipicephalus microplus</i>	TGCACGCATAGGCCCTGCAGGCCTGCGC	1004
<i>Ixodes scapularis</i>	GGCCCGGGTGGGGCCCCTGCAGGCGTGCGC	1341
<i>Aedes aegypti</i>	ATCCAGAATAACGCCGATCCAAGCATGTGC	1001
<i>Drosophila melanogaster</i>	TGCCAGGATCACACCGCTCAAGGCCTGCGC	707
<i>Bos taurus</i>	TGCCCGACTGACACCACTGGAAGCTTGTGC	1046
<i>Mus musculus</i>	CGCCCGGCTAACACCACTGGAAGCTTGTGC	1007
<i>Canis familiaris</i>	CTCGAGGCTCTCCCCTCTGGAAGCCTGCGC	1070
<i>Homo sapiens</i>	TGCCCGACTAACACCACTGGAAGCTTGTGC	1046
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GCACAACTTCTTCAATGAGTTACG---GGA	1031
<i>Ixodes scapularis</i>	CCACGCCTTCTTCGACGAGCTCCG---GGA	1368
<i>Aedes aegypti</i>	GCATCCATTCTTCAACGAGCTACG---AGA	1028
<i>Drosophila melanogaster</i>	ACATCCGTTCTTCGATGAGCTACGCATGGA	737
<i>Bos taurus</i>	ACATTCATTTTTTGGATGAATTACG---GGA	1073
<i>Mus musculus</i>	ACATTCATTTTTTGGATGAATTGCG---GGA	1034
<i>Canis familiaris</i>	CCACAGCTTCTTTGATGAACTGCG---ATG	1097
<i>Homo sapiens</i>	ACATTCATTTTTTGGATGAATTACG---GGA	1073

<i>Rhipicephalus microplus</i>	ACCGGGCACCAGGCTGCCTAATGGGCGCGA	1061
<i>Ixodes scapularis</i>	GCCCGGCACACGGCTGCCCAACGGCCGGGA	1398
<i>Aedes aegypti</i>	GGGCAACAAGACACTACCGAACGGACGCGA	1058
<i>Drosophila melanogaster</i>	GGGTAATCACACCTTGCCCAACGGTCGCGA	767
<i>Bos taurus</i>	CCCAAATGTCAAACCTACCAAATGGGCGAGA	1103
<i>Mus musculus</i>	CCCAAATGTCAAACCTACCAAATGGGCGAGA	1064
<i>Canis familiaris</i>	TCACGGAACCCAGCTCCCCAACAACCGCCC	1127
<i>Homo sapiens</i>	CCCAAATGTCAAACCTACCAAATGGGCGAGA	1103
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GCTGCCTCCCCTCTTTGACTTCACACCCCA	1091
<i>Ixodes scapularis</i>	CCTGCCCCCGCTCTTCGACTTCACCGACCA	1428
<i>Aedes aegypti</i>	GTTTCCGCCACTGTTCAACTTCACAGAGCA	1088
<i>Drosophila melanogaster</i>	TATGCCCGCCGCTGTTCAACTTCACAGAGCA	797
<i>Bos taurus</i>	CACACCTGCACTCTTCAACTTCACCACTCA	1133
<i>Mus musculus</i>	CACACCTGCACTCTTCAACTTTACCACTCA	1094
<i>Canis familiaris</i>	GCTTCCCCCCTCTTCAACTTCAGTCCTGG	1157
<i>Homo sapiens</i>	CACACCTGCACTCTTCAACTTCACCACTCA	1133
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CGAGCTCTCTCTGGAGCCCCAGCTGAATGC	1121
<i>Ixodes scapularis</i>	CGAGCTGTGCTGCAGCCGCACCTGAACGC	1458
<i>Aedes aegypti</i>	AGAGCTAGCGATTCAACCAAACCTAAATCT	1118
<i>Drosophila melanogaster</i>	TGAGCTCTCAATACAGCCCAGCCTAGTGCC	827
<i>Bos taurus</i>	AGAACTGTCAAGTAATCCACCTCTAGCTAC	1163
<i>Mus musculus</i>	AGAACTGTCAAGTAACCCCCCTCTGGCCAC	1124
<i>Canis familiaris</i>	AGAACTCTCCATCCAGCCATCTCTCAACGC	1187
<i>Homo sapiens</i>	AGAACTGTCAAGTAATCCACCTCTGGCTAC	1163
<i>Rhipicephalus microplus</i>	CACGCTGATCCCAGCGTATTTGCGA-----	1146
<i>Ixodes scapularis</i>	CACGCTGATCCCAGCGCACGCCCGG-----	1483
<i>Aedes aegypti</i>	GATACTGAGGCCCGGAACCCGAACGACGC	1148
<i>Drosophila melanogaster</i>	GCAGTTGTTGCCCAAGCATCTGCAGAACGC	857
<i>Bos taurus</i>	CATCCTTATTCCTCCTCATGCTCGGATTCA	1193
<i>Mus musculus</i>	CATCCTTATCCCTCCACATGCTCGGATTCA	1154
<i>Canis familiaris</i>	CATTCTCATCCCTCCTCACTTGAGGTCCCC	1217
<i>Homo sapiens</i>	CATCCTTATTCCTCCTCATGCTCGGATTCA	1193
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----GGTGGCGAGGCTGTTCCCACGGC	1169
<i>Ixodes scapularis</i>	-----GCGAGTGGACCGGACCAGGCAGC	1506
<i>Aedes aegypti</i>	G---AAAGCCGGC--CAATCGTCCAGC--T	1171
<i>Drosophila melanogaster</i>	ATCCGGACCTGGCGGCAATCGACCCTCGGC	887
<i>Bos taurus</i>	A-----GCAGCTGCTTCAACTCCTTCAA	1217
<i>Mus musculus</i>	G-----GCCGCTGCTTCACCGCCTGCCAA	1178
<i>Canis familiaris</i>	A-----GCGGGCACTGCCTCCCTCACTCC	1241
<i>Homo sapiens</i>	A-----GCAGCTGCTTCAACCCCCACAAA	1217
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GGGAGCGGCAGGGTCGT---CGTCCGAGAC	1196
<i>Ixodes scapularis</i>	GGCGGCGTTCGTCTTCGAGCCGGCCAAGCC	1536
<i>Aedes aegypti</i>	CGACGGA-CGGTGGCAACAGTGGC-AGCGG	1199
<i>Drosophila melanogaster</i>	CGGCGGAGCAGCCTCCATTGCGGCCAGCGG	917
<i>Bos taurus</i>	TACCACAGCAGCCTCAGATG---CTAATGC	1244
<i>Mus musculus</i>	CGCCACAGCAGCCTCAGATA---CTAATGC	1205

<i>Canis familiaris</i>	ATCCTCACAAGCTTTAAGTGAGGCTCAGAC	1271
<i>Homo sapiens</i>	TGCCACAGCAGCGTCAGATG---CTAATAC	1244
<i>Rhipicephalus microplus</i>	AGCCGAAGCATC---CACCTCAAA--CAGC	1221
<i>Ixodes scapularis</i>	CGCCCAGGAGTTCGGCCACCCCGGAGGCCTC	1566
<i>Aedes aegypti</i>	CGGAAACGGTGCCGGAGCCAACAGCAGCAC	1229
<i>Drosophila melanogaster</i>	CTCCACCAGCGTCTCGTCAACGGGCAGTGG	947
<i>Bos taurus</i>	TGGAGACCGTGGACAGACCAATAATGCCGC	1274
<i>Mus musculus</i>	TGGAGACCGTGGACAGACCAATAACGCCGC	1235
<i>Canis familiaris</i>	CGGCCAGACTGGCAGACGACCGATGCCA-	1300
<i>Homo sapiens</i>	TGGAGACCGTGGACAGACCAATAATGCTGC	1274
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GGCCCCGTGTAA-----	1233
<i>Ixodes scapularis</i>	CACCTCGTCCACCGCGTGA-----	1585
<i>Aedes aegypti</i>	AGTGG--CCGGTAGCAACAGCAGCAACAAT	1257
<i>Drosophila melanogaster</i>	TGCC---TCGGTGAAGGATCCGCCAGCC	974
<i>Bos taurus</i>	TTCTGCATCAGCTTCCGACTCC---TGA--	1299
<i>Mus musculus</i>	TTCTGCATCAGCTTCCAACCTCCACCTGA--	1263
<i>Canis familiaris</i>	--CGGCTCCCCTTACTAACTCTTCCTGA--	1326
<i>Homo sapiens</i>	TTCTGCATCAGCTTCCAACCTCCACCTGA--	1302
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	1233
<i>Ixodes scapularis</i>	-----	1585
<i>Aedes aegypti</i>	AGCGGCACAGGTAACGGTGGCAGTAGCAAT	1287
<i>Drosophila melanogaster</i>	ACAGTCGCAGGGTACAGCAGCAGCTGCGGG	1004
<i>Bos taurus</i>	-----	1299
<i>Mus musculus</i>	-----	1263
<i>Canis familiaris</i>	-----	1326
<i>Homo sapiens</i>	-----	1302
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	1233
<i>Ixodes scapularis</i>	-----	1585
<i>Aedes aegypti</i>	AGTGGCGTCGCGCCCGACAGCACCCAGGGG	1317
<i>Drosophila melanogaster</i>	ATCCGGATCGGGCGGAGCAACAGCAGGAAC	1034
<i>Bos taurus</i>	-----	1299
<i>Mus musculus</i>	-----	1263
<i>Canis familiaris</i>	-----	1326
<i>Homo sapiens</i>	-----	1302
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	1233
<i>Ixodes scapularis</i>	-----	1585
<i>Aedes aegypti</i>	CAGGGGGGCG-GCGCCAGCGG-----	1337
<i>Drosophila melanogaster</i>	CGGCGGAGCGAGTGCCGGTGGACCCGGATC	1064
<i>Bos taurus</i>	-----	1299
<i>Mus musculus</i>	-----	1263
<i>Canis familiaris</i>	-----	1326
<i>Homo sapiens</i>	-----	1302
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	1233
<i>Ixodes scapularis</i>	-----	1585
<i>Aedes aegypti</i>	-----TAGCAGCCAGGGGGTGGGAGC	1358

<i>Drosophila melanogaster</i>	TGGTAACAACAGTAGCAGCGGCGGAGCATC	1094
<i>Bos taurus</i>	-----	1299
<i>Mus musculus</i>	-----	1263
<i>Canis familiaris</i>	-----	1326
<i>Homo sapiens</i>	-----	1302
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	1233
<i>Ixodes scapularis</i>	-----	1585
<i>Aedes aegypti</i>	TGGGGCGCAGTCCGTCGGCGGTGC-GGAGG	1387
<i>Drosophila melanogaster</i>	GGGAGCGCCGTCCGCTGTGGCTGCCGGAGG	1124
<i>Bos taurus</i>	-----	1299
<i>Mus musculus</i>	-----	1263
<i>Canis familiaris</i>	-----	1326
<i>Homo sapiens</i>	-----	1302
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	1233
<i>Ixodes scapularis</i>	-----	1585
<i>Aedes aegypti</i>	AT---ATTACGTCATCACAGTCCGTACCCG	1414
<i>Drosophila melanogaster</i>	AGCCAATGCCGCCGTCGCTGGCGGTGCT-G	1153
<i>Bos taurus</i>	-----	1299
<i>Mus musculus</i>	-----	1263
<i>Canis familiaris</i>	-----	1326
<i>Homo sapiens</i>	-----	1302
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	1233
<i>Ixodes scapularis</i>	-----	1585
<i>Aedes aegypti</i>	GCGTCGACAGTAGTTCCAGTCAAGGAGCTA	1444
<i>Drosophila melanogaster</i>	GTGGTGGTGCGGAGCCGGTGCGGCGACCG	1183
<i>Bos taurus</i>	-----	1299
<i>Mus musculus</i>	-----	1263
<i>Canis familiaris</i>	-----	1326
<i>Homo sapiens</i>	-----	1302
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	1233
<i>Ixodes scapularis</i>	-----	1585
<i>Aedes aegypti</i>	TAGCGTCAGCGGCAACTTCTACGATGGGTT	1474
<i>Drosophila melanogaster</i>	CAGCTGCAACAGCAACTGGCGCTATAGGCG	1213
<i>Bos taurus</i>	-----	1299
<i>Mus musculus</i>	-----	1263
<i>Canis familiaris</i>	-----	1326
<i>Homo sapiens</i>	-----	1302
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	1233
<i>Ixodes scapularis</i>	-----	1585
<i>Aedes aegypti</i>	AG-----	1476
<i>Drosophila melanogaster</i>	CGACTAATGCCGGCGGCGCCAATGTAACAG	1243
<i>Bos taurus</i>	-----	1299
<i>Mus musculus</i>	-----	1263
<i>Canis familiaris</i>	-----	1326
<i>Homo sapiens</i>	-----	1302

<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	1233
<i>Ixodes scapularis</i>	-----	1585
<i>Aedes aegypti</i>	-----	1476
<i>Drosophila melanogaster</i>	CTGGTGTCCATCTCATGATGCGGCAACATC	1273
<i>Bos taurus</i>	-----	1299
<i>Mus musculus</i>	-----	1263
<i>Canis familiaris</i>	-----	1326
<i>Homo sapiens</i>	-----	1302
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	1233
<i>Ixodes scapularis</i>	-----	1585
<i>Aedes aegypti</i>	-----	1476
<i>Drosophila melanogaster</i>	GCAAGTTGCCGTTGTCGGGGAAGCCCTTCG	1303
<i>Bos taurus</i>	-----	1299
<i>Mus musculus</i>	-----	1263
<i>Canis familiaris</i>	-----	1326
<i>Homo sapiens</i>	-----	1302
<i>Rhipicephalus microplus</i>	-----	1233
<i>Ixodes scapularis</i>	-----	1585
<i>Aedes aegypti</i>	-----	1476
<i>Drosophila melanogaster</i>	TCCGCTATACGGCCAACATTTGA	1326
<i>Bos taurus</i>	-----	1299
<i>Mus musculus</i>	-----	1263
<i>Canis familiaris</i>	-----	1326
<i>Homo sapiens</i>	-----	1302

Figura 9 Alinhamento entre a sequência da GSK3 β de *R. microplus* e sequências de GSK3 β de outros organismos.

5.2 Expressão de N-GSKr e C-GSKr

Confirmada a clonagem de ambos os fragmentos foi iniciado o processo de expressão protéica. As expressões foram obtidas através das bactérias *E.coli* BL21 (DE3) C41 para N-GSKr e *E.coli* BL21 (DE3) RP para C-GSKr. O que foi confirmado através de SDS-PAGE 12% e por western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina marcado com fosfatase e uma proteína recombinante já conhecida produzida no próprio grupo que possui cauda de histidina e é reconhecida pelo anti-corpo marcado, denominada Calrediculina. Com o uso de um marcador de massa molecular (IgG bovino) conferimos que as bandas correspondiam a proteínas de massa molecular esperada, ou seja, para C-GSKr massa molecular 25.598 Da, e para N-GSK massa molecular 22.328 Da. Os resultados do western blot mostraram que dentre as condições testadas o melhor tratamento para se obter a expressão foi 2h de incubação pós indução com IPTG em ambos os casos, estando os dois fragmentos protéicos na porção insolúvel em corpúsculos como é demonstrado nas figuras a baixo.

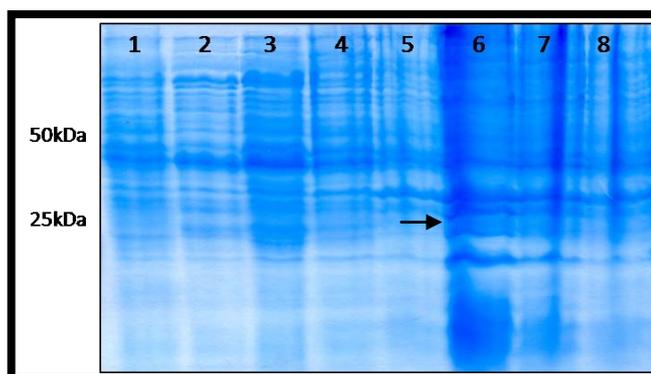


Figura 10: 1) SDS-PAGE 12% Expressão do fragmento N-terminal da GSK. Extrato de bactéria BL21 (DE3) C41, fração do sobrenadante e do sedimento separados: 1) fração do sobrenadante 16h de incubação sem indução protéica 2) fração do sobrenadante 2h de incubação pós indução protéica 3) fração do sobrenadante 4h de incubação pós indução protéica 4) fração do sobrenadante 16h de incubação pós indução protéica 5) fração do sedimento 16h de incubação sem indução protéica 6) fração do sedimento 2h de incubação pós indução protéica 7) fração do sedimento 4h de incubação pós indução protéica 8) fração do sedimento 16h de incubação pós indução proteica (proteína insolúvel).

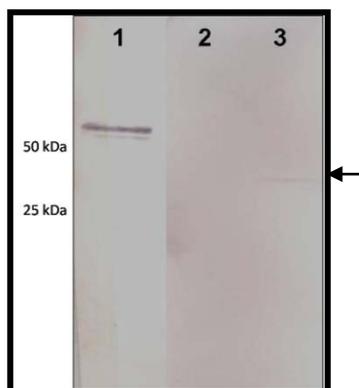


Figura 11: Western blot da expressão do fragmento N-terminal da GSK *E. coli* BL21 (DE3) C41, frações do sobrenadante e sedimento separadas; 1) Controle positivo (calreticulina purificada), 2) fração do sobrenadante 2h de incubação pós indução de expressão protéica 3) fração do sedimento 2h de incubação pós indução proteica.

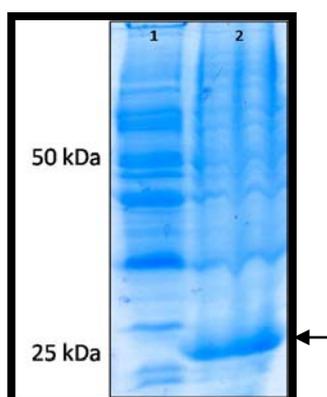


Figura 12: SDS-PAGE 12% Expressão do fragmento protéico C-terminal da GSK em *E. coli* BL21 (DE3) RP frações do sobrenadante e sedimento separados: 1) fração do sobrenadante 2h de incubação pós indução protéica, 2) fração do sedimento 2h pós adição indução proteica (proteína insolúvel).

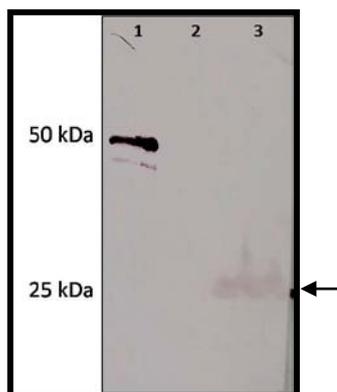


Figura 13: Western blot Expressão do fragmento C-terminal da GSK em *E. coli* BL 21 (DE3) RP: 1) Controle positivo (calreticulina recombinante purificada) (2 μ l), 2) Sobrenadante (15 μ l), 3) Precipitado (15 μ l)

5.3 Purificação de C-GSK

Uma cromatografia de afinidade foi adotada para a purificação das proteínas recombinantes, neste caso, cromatografia de afinidade, utilizando cauda de histidina (Sepharose-Ni²⁺), devido à presença de cauda de histidina na proteína recombinante. Foi observado através do perfil traçado a partir da medição da D.O. de cada fração coletada durante a purificação, e de análise por SDS-PAGE 12% que a fração mais concentrada da proteína foi obtida por meio de eluição com solução contendo 100 mM de imidazol, sendo confirmada a presença da proteína por western blot utilizando monoclonal anti-histidina marcado por fosfatase.

Neste trabalho foi iniciado o processo de purificação das proteínas, entretanto, ainda são necessárias algumas adaptações para que se obtenha uma quantia mais concentrada de proteína. Até agora foi obtida parcialmente a purificação da proteína C-GSKr.

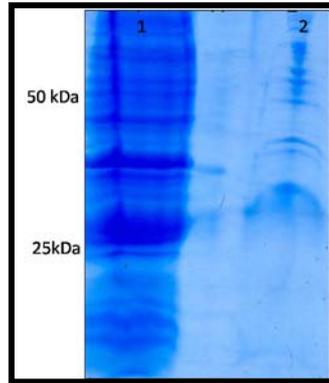


Figura 14: SDS-PAGE 12% da Expressão do fragmento C-terminal da GSK em *E. coli* BL21 (DE3) RP, frações do precipitado (material solubilizado) 1) fração do sedimento 2h de incubação pós indução protéica, 2) fração do sedimento 2 h de incubação pós indução protéica, pós solubilização com solução contendo Guanidina 3M.

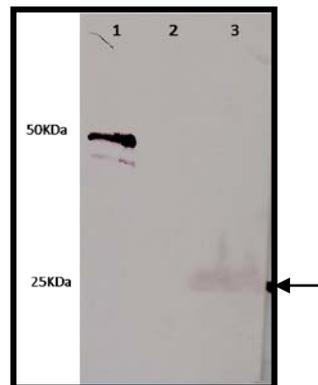


Figura 15: Western blot da Expressão do fragmento C-terminal da GSK em *E. coli* BL21 (DE3) RP, frações do precipitado (material solubilizado). 1) Controle positivo (calreticulina purificada), 2) fração do precipitado 2 h de incubação pós indução protéica, 3) Amostras do sedimento 2 horas de incubação pós indução protéica, pós solubilização com solução contendo Guanidina 3M.

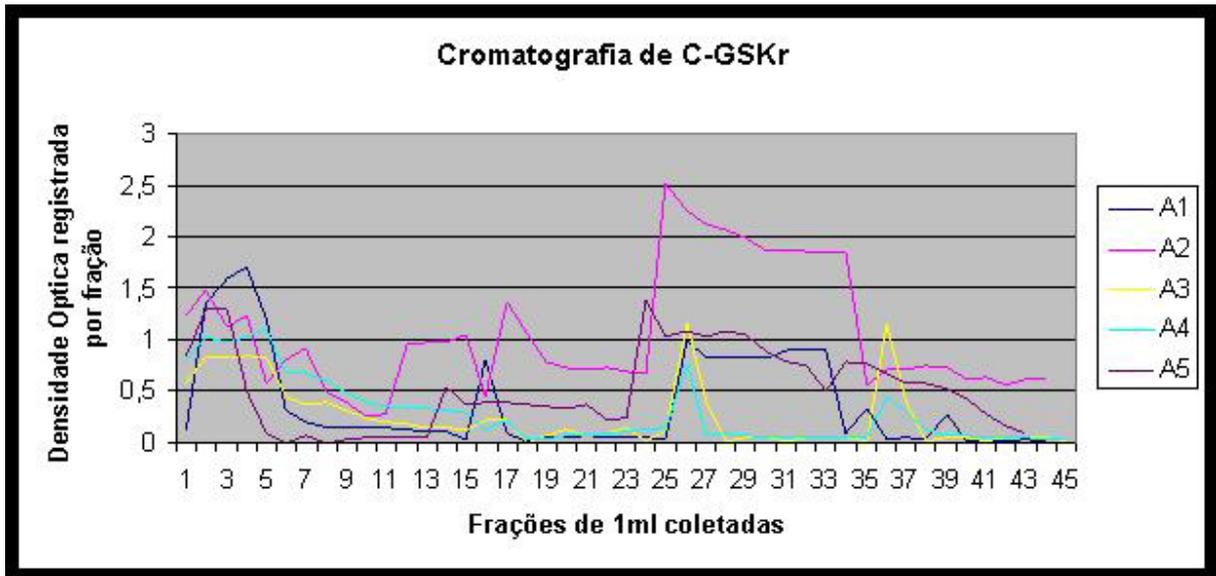


Figura 16: Perfil da cromatografia de afinidade (Sepharse- Ni^{2+}) das 5 amostras de de C-GSKr (A1, A2, A3, A4, A5) obtidas a partir do produto total da expressão protéica.

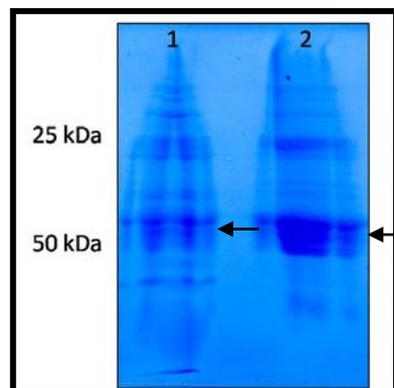


Figura 17: Eletroforese em SDS – PAGE 12% de duas amostras do fragmento C-terminal da GSK em *E. coli* BL21 (DE3) RP coletadas durante a cromatografia de afinidade (Sepharse- Ni^{2+}): 1) fração do sedimento 2 h de incubação pós indução protéica, pós lavagens com PBS e solubilização com guanidina eluído com tampão contendo 50 mM de imidazol, 3) fração do sedimento 2 h de incubação pós indução proteica, pós lavagens com PBS e solubilização com guanidina, eluído com tampão contendo 100 mM de imidazol.

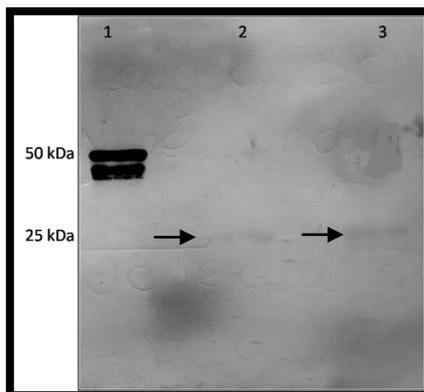


Figura 18: Western blot da purificação do fragmento C-terminal da GSK em *E. coli* BL21 (DE3) RP: 1) Controle positivo (calreticulina purificada), 2) fração do sedimento 2 h de incubação pós indução protéica, pós lavagens com PBS e solubilização com guanidina eluído com tampão contendo 50 mM de imidazol, 3) fração do sedimento 2 h de incubação pós indução proteica, pós lavagens com PBS e solubilização com guanidina, eluído com tampão contendo 100 mM de imidazol.

5.4 Imunização com C-GSK

O animal imunizado produziu uma resposta imunológica pós-inoculação da proteína N-GSKr. O soro obtido a partir do sangue coletado do animal imunizado foi utilizado em um western blot pelo qual foi determinada a reatividade contra a proteína N-GSKr. Por esse mesmo western blot foi determinado o título do soro de 1000. Nesta análise utilizamos como controle negativo o soro pré-imune, obtido a partir do sangue coletado do coelho antes da imunização.

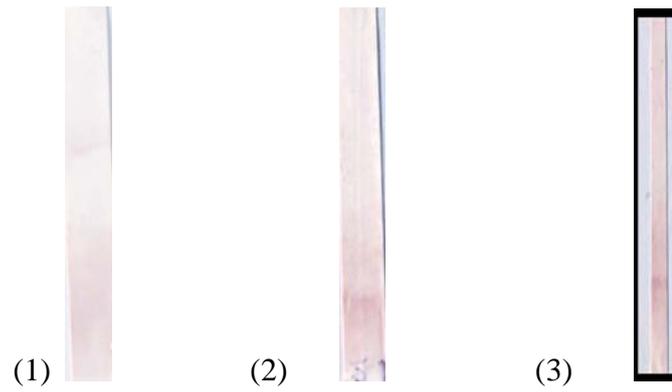


Figura 19: Western blot com soro do coelho imunizado com C-GSKr: (1) diluição 1:500, (2) diluição 1:1000

6 DISCUSSÃO

A partir da administração do inibidor funcional Alsterpaullone ficou comprovado o envolvimento da GSK na embriogênese do *R. microplus*, ilustrado por uma significativa inviabilidade e redução no número de ovos, demonstrando o potencial da GSK para estudos imunogênicos no controle deste parasita. Em função da dificuldade de expressar a sequência completa da GSK, foi decidido realizar a expressão de fragmentos da proteína. Existem várias hipóteses para justificar a dificuldade de expressar proteínas recombinantes em sistema procaríoto, entre elas estão: a instabilidade de plasmídeos devido a genes tóxicos, a degradação proteolítica dos produtos protéicos ou a toxicidade da proteína expressada (MAKRIDES, 1996; BANEYX, 1999). Por isso foi adotada uma estratégia alternativa clonar dois fragmentos do gene codificador da proteína: Um fragmento referente à região codificadora da porção N-terminal e outro fragmento referente à região codificadora da porção C-terminal da GSK de *R. microplus*, originando, após a expressão, fragmentos protéicos referentes a cada uma das porções. Expressada dessa forma a proteína não tem função enzimática, mas continua capaz de estimular a produção de anticorpos. Os anticorpos anti-N-GSKr e anti-C-GSKr poderão ser utilizados em estudos de alimentação de fêmeas parcialmente ingurgitadas e para avaliação dos efeitos destes em eventos fisiológicos como a postura dos ovos e desenvolvimento dos embriões de carrapato. Estes resultados poderão ser avaliados de forma comparativa com os resultados obtidos por inibição da GSK com Alsterpaullone trazendo contribuições importantes sobre o papel desta enzima no parasito. Será possível ainda, em estudos futuros, utilizando anticorpos anti-GSK avaliar a sua presença nos diferentes tecidos do *R. microplus*, além de avaliar sua interação nos processos fisiológicos do parasita. Ainda neste âmbito com a proteína expressada e purificada será possível ampliar o conhecimento sobre o metabolismo energético do *R. microplus* a partir do eixo que envolve esta proteína (PI3K-AKT-GSK) na via de produção glicosídica estimulada por insulina.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. *et al.* Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathway. **Comparative Biochemistry and Physiology - Parte B**, v. 153, p. 185 – 190, 2009.

ALI, A. , HOEFLICH, K. P. ; WOODGETT, J. R. Glycogen Synthase Kinase -3: Properties, Functions and Regulation. **Chemical Reviews**, v. 101, p. 2527 – 2540, 2001.

ANDRADE, C. P. , Clonagem e caracterização do gene da Glicogênio Sintase Quinase de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, 2008.

BARRIGA, O.O. , DA SILVA S. , AZEVEDO J. S. C. Inhibition and Recovery of Tick Functions in Cattle Repeatedly Infested with *Boophilus microplus*. **The Journal of Parasitology**, v. 79, n. 5, p. 710 - 715, 1993.

CABRERA-JIMÉNEZ, D. , RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I. , ROSADO-AGUILAR, J. A. Evaluación de la resistencia a la cipermetina en cepas de campo de *Boophilus microplus* obtenidas de ranchos bovinos del estado de Yucatán, México. **Técnica Pecuaria en México**, v. 46, n. 4, p. 439 - 448, 2008.

COHEN, P. *et al.*, Separation and characterisation of Glycogen Synthase Kinase 3, Glycogen Synthase Kinase4 and Glycogen Synthase Kinase 5 from rabbit skeletal muscle. **European Journal of Biochemistry**, v.124, p.21 – 35, 1982.

DA SILVA VAZ JR. , I. *et al.* Caracterização de novos antígenos em *boophilus microplus*. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.13, p. 146 - 149, 2004.

DA SILVA VAZ JR. , I. *et al.* Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 66, p. 331 - 334, 1998.

DE LA FUENTE, J. *et al.* A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 88, p. 23-28, 2007.

FABRES, A. *et al.* Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. **Parasitology**, Article in press, 2010.

GÁRCIA-GÁRCIA, J. C. *et al.* Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 18, p. 2275 - 2287, 2000.

GOMES, A. **Carrapato-de-boi: prejuízos e controle** (EMBRAPA). Campo Grande. 2000. Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicações/divulga/GCD42.html>> Acesso em: Maio de 2010.

HEDGEPEETH, C. *et al.* Regulation of Glycogen Synthase Kinase 3 β and Downstream Wnt Signaling by Axin. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 10, p. 7147 – 7157, 1999.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 1 - 10, 2006.

LAZZAROTO BRESOLIN, I. T. *et al.* Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: Aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v.32, n.5, p. 1288 - 1296, 2009.

MORAES, J. *et al.* Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.146, p. 528 - 533, 2007.

MURREL, A. , BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Crutice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169 - 172, 2003.

PATARROYO, J.H., *et al.* **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 88, p.163 - 72, 2002.

RAGANO-CARACCILO M. *et al.*, Nuclear Glycogen and Glycogen Synthase Kinase 3. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249, n. 2, p. 422 - 427(6), 1998.

REDONDO *et al.*, Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac™ and amidine treatments. **Experimental and Applied Acarology**, v. 23, p. 841 – 849, 1999.

ROBERTS, J.A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini) II. Stages of the cycle of the parasite against which resistance is manifest. **Journal of Parasitology**, v. 54, p.667-673, 1968.

ROSA DE LIMA M. F. *et al.* Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 747 - 754, 2002.

ROSADO-AGUILAR, J. A. *et al.* Actividad ixodida de extractos crudos de *Diospyros anisandra* contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.8, p. 297 – 301, 2008.

SAMBROOK, J. , FRITSCH, E. F. , MANIATS, T. **Molecular Cloning - a laboratory manual**. 2nd Edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAPPINGTON, T. W. , RAIKHEL A. S. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, p. 277 - 300, 1998.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. v. 1, 1991.

SUMMERS A. S. *et al.*, Regulation of Insulin-Stimulated Glucose Transporter GLUT4 Translocation and Akt Kinase Activity by Ceramide. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 9, p. 5457 - 5464, 1998

THULLNER F. , WILLADSEN P. , KEMP D. Acaricide Rotation Strategy for Managing Resistance in the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acarina: Ixodidae): Laboratory Experiment with a Field Strain from Costa Rica. **Journal of Medical Entomology**, v.44, n.5, p. 817 - 821, 2007.

WALADDE, S. M. , RICE, J.M. The sensory basis of tick feeding behaviour. **Physiology of ticks**, p 71–118, 1982.

WILLADSEN, P. *et al.* Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasite vaccines Symposium**, V. 110, p. 43 - 50, 1995.

WIKEL, S. K. , ALLEN, J.R. Acquired resistance to ticks. I. Passive transfer of resistance. **Immunology**, v. 30, n. 3, p. 311 – 316, 1976.

WOODGETT J. R, Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/ factor A. **EMBO Journal**, v. 9, n.8, p. 2431 – 2438, 1990.