

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO DA TREALASE  
INTESTINAL DA LARVA DE *Tenebrio molitor*  
E CLONAGEM DO cDNA QUE A CODIFICA**

**ANA GILHEMA GOMEZ DURAN**

**TESE DE DOUTORADO**

**Dra. CLÉLIA FERREIRA  
ORIENTADORA**

**SÃO PAULO  
14/10/2005**

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Gomez Duran, Ana Gilhema  
G633c      Caracterização de trealase intestinal da larva de *Tenebrio molitor* e clonagem do cDNA que a codifica / Gomez Duran Ana Gilhema -- São Paulo, 2005.  
107p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.  
Orientador : Ferreira, Clélia

I. Enzima : Inseto: Bioquímica animal 2. Bioquímica molecular I. T. II. Ferreira, Clélia, orientador

595.701925 CDD

# “Caracterização da trealase intestinal da larva de *Tenebrio molitor* e clonagem do cDNA que a codifica”

**ANA GILHEMA GOMEZ DURAN**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

**Aprovado(a) por:**

---

Profa. Dra. CLÉLIA FERREIRA TERRA  
(Orientadora e Presidente)

---

Profa. Dra. MARIA TERESA MACHINI DE MIRANDA  
IQ – USP

---

Profa. Dra. CARLA COLUMBANO DE OLIVEIRA  
IQ – USP

---

Prof. Dr. IVARNE LUIS DÓS SANTOS TERSARIOL  
UMC

---

Prof. Dr. ÍVO LEBRUN  
Instituto Butantan

SÃO PAULO  
14 DE OUTUBRO 2005

## **Dedicatoria.**

A **Dios**, quien me abriga entre sus brazos y por representarse en mi padre **Gilberto Gomez** y dame la felicidad de regalarme a mi madre **Helga María**, imagen terrenal de la Virgen María. Con ellos aprendí a conocer el nacimiento del amor, con una sonrisa, un abrazo y mucha unión.

A mi esposo **John Mantilla**, por ser parte de mi. Cada reto que emprendemos juntos es un nuevo recomenzar, espero siempre recomenzar a tu lado uniendo nuestras fuerzas. Que nuestros sueños estén llenos de alegría, aventuras y deleites.

A mi hijo **Daniel Alejandro**, eres la razón de mi existencia, la fuerza que necesito para continuar y mi puerto donde descansar. Te amo.

A **Chichita**, mi abuelita querida.

A mis queridos hermanos, Gilberto de Jesús, Mariana Mercedes, Pedro Ramón, Helga Mireya, Luís Ernesto, Carlos Alberto, apoyo incondicional.

A **Carlos Alberto**, mi hermano adorado.

A mis sobrinos.

A la familia Mantilla Ochoa, especialmente a la Sra. Miguelina por recordarnos en sus oraciones. Antonio y Raquel, por su apoyo incondicional.

A todos mis amigos, especialmente a Giancarlo Brito y Aline, Yamile Caceres, Paloma, Luciana, Andrea Moreno y Tibisay.

## **Agradecimentos**

À Dra. Clélia Ferreira, pela orientação durante o doutorado.

Ao Dr. Sandro Roberto Marana pelo apoio, orientação, discussão e amizade durante o desenvolvimento do doutorado. Muito obrigado! Sua ajuda foi essencial.

Ao Dr. Walter Ribeiro Terra, pelas discussões nas reuniões realizadas.

Aos colegas Alexandre H. P. Ferreira, Pedro Chimoy, Plínio T. Cristofolletti Jr. e Lucas Blanes, os quais foram importantes na minha adaptação no início do doutorado.

Aos colegas que estão atualmente no Laboratório de Bioquímica de Insetos, Maria Cícera Pereira da Silva, Daniela Beton, Marcelo Padilha, João Vasconcellos de Almeida, Lucas Guerra, Alexandra Dumont, Fábio Kendi Tamaki, Adriana Rios Lopes, Camila.

A meus amigos Paloma Mieko Sato, Átila Lamarino, Érica Moreira, Thaís Duarte Bifano, Fernando A. Genta, Mônica, por seu apoio e carinho.

Às técnicas Luiza, Ivanilde e Chistiani, pela amizade e colaboração.

Ao Pessoal da secretaria de pós-graduação: Cibele Rosane Carlos, Milton Santos, Emiliano R. Goncalves, Marcelo Alcântara.

À FAPESP, pela bolsa concedida. Durante a elaboração desta tese, o laboratório foi mantido por auxílios concedidos pela FAPESP, PRONEX e CNPq.

A todas as pessoas que foram meus amigos e me ofereceram seu carinho nos três anos em que trabalhei no IQUSP. Embora não me lembre neste momento de todos os seus nomes, com certeza me lembrarei deles em momentos especiais.

## Resumo

A trealase intestinal de *Tenebrio molitor* foi purificada após três etapas cromatográficas (interação hidrofóbica, troca iônica e gel filtração), obtendo-se uma recuperação de 46 %, uma atividade específica de 16,5 U/mg de proteína e um enriquecimento de 73 vezes. A proteína purificada apresenta uma massa molecular de 58 kDa estimada por plotes de Ferguson, pH ótimo de 5,3 e  $K_m$  de  $0,43 \pm 0,03$  mM.

Estudos de inibição com a enzima purificada mostraram que a mesma é inibida competitivamente por amigdalina ( $K_i = 0,22$  mM), prunasina ( $K_i = 0,43$  mM), florizina ( $K_i = 0,50$  mM), floretina ( $K_i = 0,008$  mM), metil- $\alpha$ -manosídeo ( $K_i = 43$  mM), salicina ( $K_i = 186$  mM) e glucono- $\delta$ -lactona ( $K_i = 1,4$  mM). Mandelonitrila apresentou inibição mista com  $K_i = 3,8$  e  $\alpha = 1,5$ .

A enzima não apresentou inibição por 1,10 fenantrolina, gentiobiase, metil- $\alpha$ -glucosídeo e Tris, em concentrações de 4 mM, 10 mM, 200 mM e 264 mM, respectivamente.

Experimentos de inibição, inibição múltipla e de proteção da enzima contra modificadores de resíduos específicos de aminoácidos permitiram idealizar um esquema para o sítio ativo da trealase. Esse sítio ativo teria dois sítios assimétricos para a ligação de glicose. Em um dos sub-sítios liga-se o inibidor floritina e no outro os inibidores metil- $\alpha$ -manosídeo e glucono- $\delta$ -lactona. Nesse último está presente um resíduo de histidina que tem como papel modular o  $pK_a$  do carboxilato catalítico. Esse e o resíduo de arginina que atua como doador de prótons, encontra-se na região entre os dois sub-sítios.

RT-PCR foi usado para clonar o cDNA que codifica a trealase intestinal de *T. molitor*. Esta proteína é solúvel e apresenta massa molecular prevista pela seqüência de 61 kDa. Tomando por base a seqüência de aminoácidos, esta trealase pode ser classificada na família 37 das glicosídeo hidrolases e faz parte do clã G, onde não se conhecem quais são os grupos envolvidos em catálise e nem a estrutura tridimensional de seus componentes.

## Abstract

Intestinal trehalase was purified from *Tenebrio molitor* larvae after three chromatographic steps (hydrophobic interaction, ion exchange chromatography and gel filtration). The pure enzyme has an specific activity of 16.5 U/mg, molecular mass of 58 kDa, optimum pH of 5.3 and  $K_m$  of  $0.43 \pm 0.03$  mM.

Amygdalin ( $K_i = 0.22$  mM), prunasin ( $K_i = 0.43$  mM), phlorizin ( $K_i = 0.50$  mM), phloretin ( $K_i = 0.008$  mM), methyl- $\alpha$ -mannoside ( $K_i = 43$  mM), salicin ( $K_i = 186$  mM) and glucone- $\delta$ -lactone ( $K_i = 1.4$  mM) are competitive inhibitors of the enzyme. Mandelonitrile (the aglycon of the glucosides amygdalin and prunasin) is a non-competitive mixed-type inhibitor ( $K_i = 3.8$  mM and  $\alpha = 1.5$ ).

Gentiobiose, methyl- $\alpha$ -glucoside, 1,10 phenanthroline and Tris in concentrations of 10 mM, 200 mM, 4 mM, and 264 mM, respectively, were unable to inhibit the enzyme.

We designed a model for trehalase active site, taking into account inhibition and multiple inhibition experiments plus protection afforded by competitive inhibitors against the chemical modification of amino acid residues. The site has two assymmetric subsites for glucose binding. Phloretin binds to subsite II and methyl- $\alpha$ -mannoside and glucone- $\delta$ -lactone bind to subsite I. In this subsite, one His residue modulates the  $pK_a$  of the carboxylate group that acts as a nucleophile in catalysis. The carboxylate and one Arg residue, that acts as a proton donor, are placed in the region between the two subsites.

Using RT-PCR techniques, the cDNA coding for *T. molitor* intestinal trehalase was cloned. From the sequence, we can suppose that the enzyme is soluble and calculate that the molecular mass of the protein would be 61 kDa. *T. molitor* trehalase can be classified as a member of family 37 of glycoside hydrolases. No member of this family has their catalytical groups nor its 3D structure known.

## Abreviações

<b>BLAST</b>	"Basic Local Alignment Search"
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>CAPS</b>	ácido (3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfônico)
<b>cDNA</b>	Ácido desoxiribonucleico complementar
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>DEPC</b>	Carbonato de dietila
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeo 5'-trifosfato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDC</b>	1-etil-3-(dimetilamino-propil)-carbodiimida
<b>EDTA</b>	Etilenodiaminotetracetato de sódio
<b>FG</b>	Fenilglioxal
<b>FPLC</b>	"Fast Protein Liquid Chromatography"
<b>HEPPES</b>	ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2 etanosulfônico
<b>IPTG</b>	Isopropil tiol beta D galactopiranosídeo
$k_{cat}$	Constante de catálise
$K_i$	Constante de inibição
$K_{e1}$ e $K_{e2}$	Constantes de dissociação de grupos prototrópicos envolvidos em catálise na enzima livre
$K_{es1}$ e $K_{es2}$	Constantes de dissociação de grupos prototrópicos envolvidos em catálise no complexo enzima substrato
$K_m$	Constante de Michaelis
$K_{mapp}$	Constante de Michaelis aparente
$k_{obs}$	Constante de inativação de pseudo-primeira ordem em uma reação de modificação química
<b>LB</b>	Meio de cultura de Luria-Bertani
<b>MES</b>	Ácido 2-(N-morfolino)etano sulfônico
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>MOPS</b>	Ácido morfolino propano sulfônico
<b>NBS</b>	N-Bromosuccinimida
<b>PCR</b>	Reação da polimerase em cadeia
<b>pHMB</b>	para-hidroximercuribenzoato
<b>PIPES</b>	Piperazina-N' N' – bis (2-etano ácido sulfônico)
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>RACE</b>	"Rapid amplification of cDNA ends"
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>SBTI</b>	Inibidor de tripsina de soja
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poli(acrilamida com dodecil sulfato de sódio
<b>TGO</b>	Reagente de tris - glicose oxidase
<b>TNM</b>	Tetranitrometano
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)-amino-metano
$V_{max}$	Velocidade máxima
$V_{maxapp}$	Velocidade máxima aparente
<b>Xgal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indoil beta D galactopiranosídeo



## Índice

1 Introdução.....	1
1.1 Considerações iniciais .....	1
1.2 O tubo digestivo de insetos .....	3
1.3 Trealose .....	5
1.4 Trealases.....	7
1.5 O sítio ativo das trealases .....	10
1.6 Os $\beta$ -glicosídeos tóxicos produzidos por plantas e as trealases.....	13
1.7 Classificação de trealases .....	15
2 Objetivos desse trabalho .....	17
3 Materiais e Métodos .....	18
3.1 Culturas de <i>Tenebrio molitor</i> .....	18
3.2 Preparação da fração solúvel do tubo digestivo de larvas de <i>T. molitor</i> .....	18
3.3 Determinação de atividade enzimática .....	18
3.4 Determinação da concentração de proteína.....	19
3.5 Purificação da trealase intestinal de <i>T. molitor</i> .....	19
3.5.1 Cromatografia de interação hidrofóbica .....	19
3.5.2 Cromatografia de troca iônica .....	20
3.5.3 Cromatografia de filtração em gel .....	20
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida para separação de proteína.. .....	21
3.6.1 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	21
3.6.2 Eletroforese em condições nativas (PAGE).....	22
3.6.3 Cálculo do peso molecular através de eletroforese.....	22
3.7 Determinação dos parâmetros de inibição da trealase por diferentes substâncias.....	23

3.8 Experimentos de modificação química.....	28
3.9 Determinação de $pK_s$ por modificação química.....	30
3.10 Determinação dos $pK_s$ dos grupos envolvidos em catalise.....	30
3.11 Clonagem do cDNA da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> .....	32
3.11.1 Extração do RNA total.....	32
3.11.2 RT-PCR e RACE PCR.....	32
3.11.2.1 RT.....	32
3.11.2.2 RACE .....	33
3.11.3 Reação em cadeia com DNA polimerase.....	33
3.11.4 Eletroforese em gel de agarose.....	35
3.11.5 Clonagem de fragmentos de DNA no plasmídeo pGEM-T.....	35
3.11.6 Preparação das bactérias competentes.....	36
3.11.7 Transformação de bactérias competentes.....	36
3.11.8 Obtenção de plasmídeos contendo o inserto da trealase.....	37
3.11.9 Seqüenciamento.....	38
3.12 Expressão da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> em bactérias BL21 DE3.....	39
4 Resultados .....	43
4.1 Purificação da trealase digestiva de <i>Tenebrio molitor</i> .....	43
4.2 Determinação dos $pK_s$ dos grupos envolvidos em catálise.....	47
4.3 Efeito de vários compostos na atividade da trealase.....	49
4.4 Detecção de aminoácidos importantes para a atividade enzimática.....	67
4.5 Clonagem e seqüenciamento do cDNA que codifica a trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> .....	78
4.6 Clonagem e expressão do cDNA que codifica a trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> .....	

<i>Tenebrio molitor</i> .....	89
5 Discussão .....	91
5.1 Características físicas da trealase .....	91
5.2 Efeito do pH e da concentração de substrato na trealase.....	91
5.3 Efeito de diferentes substâncias na atividade da trealase.....	92
5.4 Aminoácidos importantes para a catálise na da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> .....	95
5.5 Arquitetura do sítio ativo da trealase de <i>Tenebrio molitor</i> .....	96
6 Considerações finais.....	99
7 Referencias Bibliográficas .....	100

## Índice de figuras

Figura 1. Número de espécies descritas.....	2
Figura 2. Esquema geral do tubo digestivo de insetos.....	4
Figura3. Representação esquemática da clonagem do cDNA correspondente a trealase intestinal de <i>T. molitor</i> .....	42
Figura 4. Perfil da atividade enzimática obtido após cromatografia hidrofóbica.....	45
Figura 5. Perfil da atividade enzimática obtido após cromatografia de troca iônica...	45
Figura 6. Perfil da atividade enzimática obtido após cromatografia de filtração em gel.....	46
Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % em condições desnaturantes.....	46
Figura 8. (A) Efeito do pH no $V_{mapp}/K_m$ para a determinação do $pK_{e1}$ e $pK_{e2}$ . (B) Efeito do pH no $V_{mapp}$ para a determinação do $pK_{es1}$ e $pK_{es2}$ .....	48
Figura 9. Inibição da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> por Glucono- $\delta$ - lactona...	51

Figura 10. Inibição da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> por Metil- $\alpha$ -manosídeo	52
Figura 11. Inibição da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> por Amigdalina.....	53
Figura 12. Inibição da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> por Prunasina.....	54
Figura 13. Inibição da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> por Salicina.....	55
Figura 14. Inibição da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> por Florizina.....	56
Figura 15. Inibição da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> por Floretina.....	57
Figura 16. Inibição da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> por Mandelonitrila.....	59
Figura17. Inibição múltipla da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> por metil- $\alpha$ - manosídeo (I) e floretina (J).....	62
Figura 18. Inibição múltipla da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> por floretina (I) e glucono- $\delta$ -lactona (J).....	63
Figura 19. Inibição múltipla da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> por floretina (I) e mandelonitrila (J).....	64
Figura20. Inibição múltipla da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> por mandelonitrila (I) e metil- $\alpha$ -manosídeo (J).....	65
Figura 21. Inibição múltipla da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> por (I) metil- $\alpha$ - manosídeo e glucono- $\delta$ -lactona (J).....	66
Figura 22. Modificação da trealase intestinal de <i>T. molitor</i> por DEPC.....	70
Figura 23. Efeito do pH na atividade da trealase intestinal de <i>T. molitor</i> após modificação por DEPC.....	71
Figura 24. Modificação da trealase intestinal de <i>T. molitor</i> por Fenilglioxal.....	73
Figura 25. Efeito do pH na inativação da trealase intestinal de <i>T. molitor</i> por Fenilglioxal.....	74
Figura 26. Modificação da trealase intestinal de <i>T. molitor</i> por EDC.....	76
Figura 27. Efeito do pH na inativação da trealase intestinal de <i>T. molitor</i> por EDC..	77
Figura 28. Eletroforese em agarose 1 % de plasmídeos p-GEM-T contendo diferentes insertos após digestão EcoRI.....	84

Figura 29. Seqüência de nucleotídeos e seqüência de aminoácidos derivados do cDNA que codifica a trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> .....	85
Figura 30. Comparação da estrutura primaria da trealase intestinal de <i>T. molitor</i> .....	88
Figura 31. SDS-PAGE 12 % do lisado de bactérias transformadas com o plasmídeo contendo o fragmento de cDNA que codifica a trealase intestinal madura de <i>T. molitor</i> .....	90
Figura 32 Representação esquemática do sítio ativo da trealase intestinal de <i>T. molitor</i> .....	98

## Índice de tabelas

Tabela 1 Estruturas das substâncias utilizadas como inibidores da trealase intestinal de <i>Tenebrio molitor</i> .....	27
Tabela 2. Condições utilizadas para modificação química por diferentes compostos e inibição com EDTA da trealase digestiva de <i>Tenebrio molitor</i> .....	29
Tabela 3. Proteína e atividade recuperada nos passos usados para a purificação da trealase digestiva de <i>Tenebrio molitor</i> .....	44
Tabela 4. Inibição da trealase intestinal de <i>Tenebrio. Molitor</i> .....	50
Tabela 5. Valores obtidos para o parâmetro que mede a interferência que um inibidor ligado à enzima causa na ligação do outro.....	66
Tabela 6. Efeito de diferentes substâncias na atividade da trealase de <i>T. molitor</i> .....	67
Tabela 7. Identidade e similaridade dos resíduos de aminoácidos presentes na trealase de <i>Tenebrio molitor</i> com outras trealases de insetos.....	82

## 1 Introdução

### 1.1 Considerações iniciais

Os insetos são organismos que causam grandes danos à agricultura e à saúde humana, embora alguns sejam benéficos. O número de espécies de insetos existentes é estimado ser de um milhão, o que corresponde a 70 % do total de espécies animais atuais (figura 1). Apenas a ordem Coleoptera (besouros) corresponde a mais de 50% das espécies biológicas descritas até agora (Ruppert e Barnes, 1994; Brusca e Brusca, 1990).

A enorme diversidade e capacidade de ocupação dos mais variados nichos ecológicos é decorrente, entre outros fatores, da capacidade dos insetos de alimentarem-se das mais variadas dietas. Desse modo, o tubo digestivo destes organismos é de particular importância já que este representa a maior e mais desprotegida superfície de contato entre o inseto e o meio ambiente (Terra e Ferreira, 1994; 2005). Conhecer o funcionamento do seu tubo digestivo é essencial para desenvolver estratégias de controle desses organismos, seja visando atacar alguma das estruturas do tubo digestivo ou desorganizar alguma de suas funções, como por exemplo, produção de inibidores do processo digestivo (Jouaning *et. al.*, 1998; Franco *et. al* 2002). Uma vez que a capacidade de criar resistência por parte dos insetos é grande, preconiza-se que um número mais variado possível de estratégias de controle deve ser usado para não exercer uma pressão seletiva muito grande (Bauer, 1995; Franco *et. al* 2002).

Os insetos são muito diversificados e as diferenças observadas entre suas ordens são muito maiores do que aquelas encontradas entre os mamíferos.

Devido a isso, generalizações não podem ser feitas estudando-se uma só ordem de insetos.

No presente trabalho nós utilizamos como objeto de estudo a larva de *Tenebrio molitor* (ordem Coleoptera; subordem Polyphaga; superfamília tenebrionoidea; família tenebrionidae; gênero tenebrio; espécie molitor), que é uma praga de alimentos estocados.

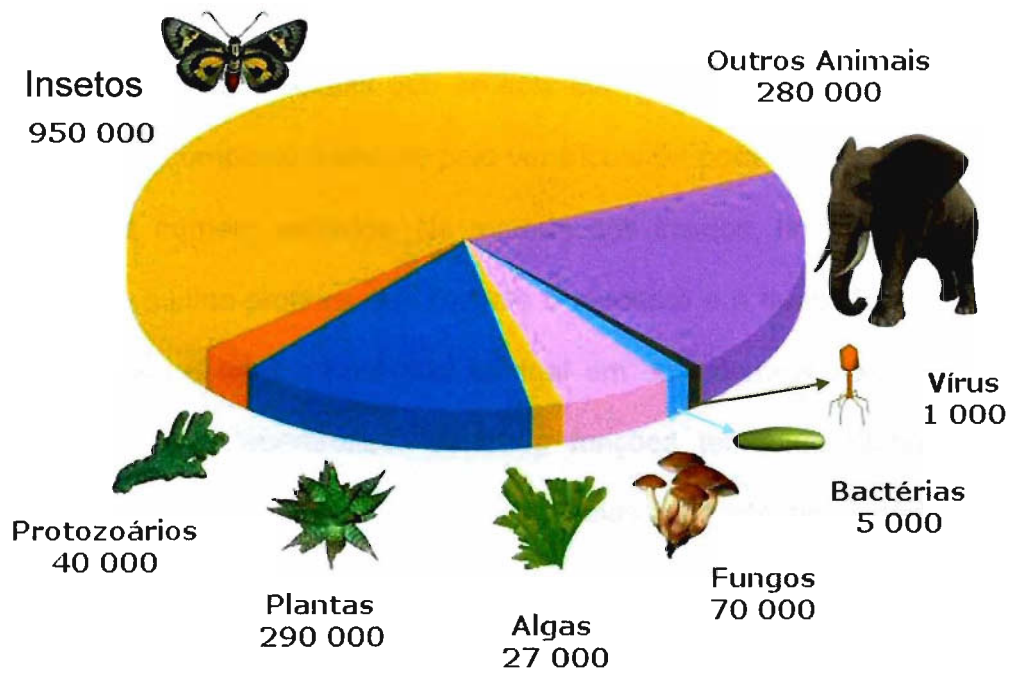


Figura 1. Número de espécies descritas.

## 1.2 O tubo digestivo de insetos

O tubo digestivo dos insetos pode ser dividido em três partes: Intestino Anterior, Intestino Médio (Ventrículo contendo ou não cecos gástricos) e Intestino Posterior (figura 2). O papo, na maioria dos insetos é uma estrutura que participa do armazenamento do alimento e em vários insetos serve como sítio de digestão, sob ação de enzimas digestivas que são provenientes do intestino médio ou da glândula salivar (Terra e Ferreira, 2003). A digestão, na maioria desses organismos ocorre no intestino médio aonde as enzimas são secretadas (Terra e Ferreira, 2005). Essa região do tubo digestivo é formada por células colunares, células regenerativas e células que se acredita ter função endócrina. O intestino médio pode ser composto somente pelo ventrículo ou pode conter cecos gástricos de tamanho e número variados. Na maioria dos insetos, no intestino médio há uma estrutura quitino-protéica que reveste o alimento e é denominada Membrana Peritrófica. Essa separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço endoperitrófico e ectoperitrófico. Variadas funções tem sido atribuída a essa estrutura: proteção mecânica para as células do intestino médio, barreira fisiológica para microorganismos, prevenção da excreção de enzimas digestivas, aumento da eficiência digestiva (Terra e Ferreira, 1994; 2003; 2005). No intestino médio ocorre toda a secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes. Os túbulos de Malpighi, que é um órgão excretor, marca a divisão entre o intestino médio e o intestino posterior, aonde ocorre a absorção de água e sais.



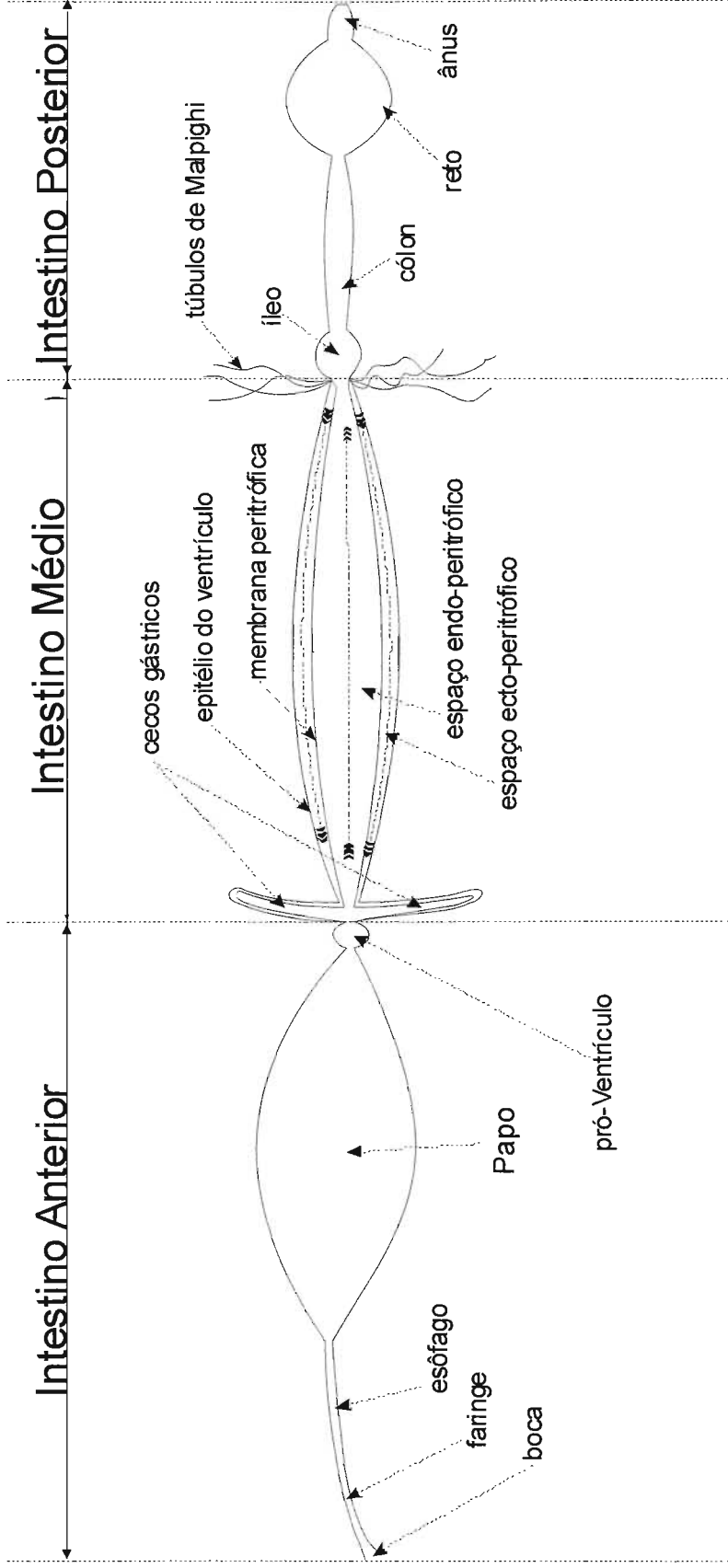


Figura 2. Esquema geral do tubo digestivo de insetos.

### 1.3 Trealose

Trealose é um dissacarídeo formado por duas glicoses unidas por ligação  $\alpha$  1-1. Esse dissacarídeo é um dos açúcares mais estáveis que existe. Ela é resistente a amplas faixas de pH e temperatura, não é redutora, sendo geralmente quimicamente inerte em interagir com proteínas (Richards *et. al*, 2002). Reações de proteínas com carboidratos podem levar a perda da estrutura e/ou função dos polípeptídeos causando danos ao organismo. Exemplo desse fato são as várias glicações danosas que ocorrem em portadores de Diabetes melitus. Além dessas propriedades, trealose é pouco viscosa.

Diversas funções têm sido atribuídas a esse dissacarídeo em diferentes organismos tais como: regulação de certas vias; reserva e transporte de glicose utilizada como fonte de energia; sinalização em algumas células; participação na síntese de componentes celulares ou proteção de membranas e proteínas em situações de estresse (Elbein *et al*. 2003).

A distribuição da trealose na natureza tem se mostrado cada vez mais ampla, assim como sua importância.

Em plantas verificou-se que os organismos que sofrem dessecação e depois voltam ao seu estado normal possuem altos níveis de trealose, que supostamente funciona como um protetor para os danos causados pela ausência de água. Na verdade a presença de trealose parece ser ampla no reino vegetal. Nesses organismos, a concentração do dissacarídeo é mantida sob um controle estrito por ação das enzimas responsáveis pela sua síntese e por uma trealase (Wingler, 2002). Na verdade o composto funcional nos vegetais é a trealose-6-

fosfato. Já era conhecido o papel desse composto na regulação do metabolismo de carboidratos em fungos e parece que ele também apresenta vários papéis em vegetais superiores. Além de regular o metabolismo fotossintético (aumentando a velocidade da fotossíntese por unidade de área de folha), trealose-6-fosfato tem papel no desenvolvimento do vegetal, pois concentrações anômalas causam efeitos fenotípicos. (Wingler, 2002).

Os fungos possuem trealose como carboidrato de reserva. Nesses organismos, a trealose também protege as células contra estresses provocados pelo ambiente, tais como altas temperaturas, dessecação e congelamento. Além disso, mostrou-se mais recentemente que esse dissacarídeo participa na sinalização de certas vias (Kadowaki *et al.*, 1996).

Os nematodas possuem trealose como principal açúcar circulante e ela serve como fonte de energia, como crioprotetor, como protetor contra dessecação e é importante no desenvolvimento embrionário (Behm, 1997).

Em insetos a trealose também é o principal açúcar circulante e sua concentração na hemolinfa normalmente é bem maior que a concentração de glicose no sangue humano (5 mM). Em Lepidópteros a trealose hemolinfática é normalmente cerca de 100 mM. Em insetos a glicose é geralmente muito baixa (menos que 1 mM) e em algumas exceções ela encontra-se entre 1 e 5 mM (Thompson e Suarez, 2003).

A trealose é sintetizada no corpo gorduroso a partir de glicose, glicose-1-fosfato ou glicose-6-fosfato, que são obtidas a partir da dieta, da quebra de glicogênio ou de gliconeogênese (Thompson e Suarez, 2003).

Hormônios peptídicos liberados pela corpora cardíaca são hipertrealosêmicos. Na sua presença, a quantidade de frutose 2,6 bis-fosfato nas células do corpo gorduroso cai. Esse composto ativa a fosfofrutoquinase-1 e inibe fructose 1,6-bisfosfatase. Desse modo, na sua ausência, menor quantidade de glicose será usada pela via glicolítica, aumentando a síntese de trealose (Becker *et al*, 1996).

Insetos utilizam açúcares (sobretudo trealose), ácidos graxos e proteína como fonte de energia para o voo. A quantidade relativa com que esses compostos são usados varia entre os insetos (Thompson e Suarez, 2003). Em algumas espécies de mariposas e gafanhotos o voo é iniciado utilizando carboidratos e ácidos graxos só são consumidos em vôos mais longos. Abelhas aparentemente só usam carboidratos como combustível para o voo, enquanto prolina é utilizada como fonte de carbono para aumentar a concentração de intermediários do ciclo de Krebs. Carboidratos e prolina são usados simultaneamente por besouros e moscas. Curiosamente, a mosca tsé-tsé usa somente prolina como fonte de energia para o voo (Thompson e Suarez, 2003).

#### **1.4 Trealases (3.2.1.28)**

Trealase é uma enzima que tem como substrato natural somente trealose (glicose- $\alpha$ -1,1-glicose). Seus substratos sintéticos são alguns análogos desse carboidrato (Labat-Robert *et al.*, 1978). Essa enzima foi demonstrada pela primeira vez em fungos em 1983 e tem sido detectada em bactérias, fungos, algas, plantas, vertebrados e invertebrados (Elbein, 1974). Trealases são encontradas em vários organismos, tanto naqueles que estocam trealose como os fungos, quanto

naqueles que não a estocam, como por exemplo mamíferos, provavelmente devido ao fato desses organismos ingerirem trealose.

Recentemente alguns relatos foram feitos na literatura sobre enzimas com especificidade mais ampla. Xia e colaboradores (2002) mencionam a existência de uma enzima capaz de clivar trealose e maltose no fungo *Metarhizium anisopliae* e Dmitryjuk e Zoltowska (2003) reportaram uma enzima capaz de clivar, além de trealose, sacarose, isomaltose, maltose e melezitose, presente na musculatura do nematóide de *Ascaris suum*. A ocorrência dessa última enzima não parece plausível, principalmente porque nenhuma evidência da pureza da preparação foi mostrada, além do fato de haver uma só banda de proteínas após eletroforese e coloração com Coomassie Blue. Embora a preparação do fungo pareça mais pura, nenhuma comparação entre propriedades da enzima é feita usando-se os dois possíveis substratos, trealose e maltose. Uma inativação térmica e/ou química, talvez ajudasse a refutar ou corroborar a clivagem dos dois dissacarídeos pela mesma enzima.

Em fungos há muitos anos mostrou-se a presença de duas trealases, denominadas de ácida e neutra, assim chamadas devido ao valor de seu pH ótimo. As trealases neutras de fungos são citossólicas e estão envolvidas no catabolismo intracelular de trealose, sendo reguladas por fosforilação dependente de AMP cíclico. Por outro lado, as trealases ácidas são extracelulares ou estão presentes em vacúolos e não são reguladas. Os dois tipos de proteínas são filogeneticamente distantes e pertencem a diferentes famílias das glicosídeo hidrolases, o que indica que sua estrutura também é diferente (Kadowaki *et al.*, 1996; Lúcio-Eterovic *et al.*, 2005). Recentemente, uma trealase que possui

algumas características semelhantes a trealases ácidas e outras semelhantes a trealases neutras foi descrita em um fungo termofílico (Lúcio- Eterovic *et. al.*, 2005).

Duas trealases também foram isoladas de músculo do nematodo *Ascaris suum*. Uma delas é solúvel e outra ligada à membrana (Dmitryjuk e Zoltowska, 2003).

Em mamíferos, trealase não é uma enzima muito importante e provavelmente devido a isso tenha sido pouco estudada. Ele é encontrada ligada às membranas microvilares dos enterócitos e só é importante quando grandes quantidades de trealose são ingeridas (Van Beers *et. al.*, 1995). O fato de trealose estar sendo usada como preservativo na preparação de certos alimentos secos (Murray *et. al.*, 2000), pode levar um maior número de pessoas a ingerirem esse açúcar, tornando a trealase intestinal de humanos importante na digestão. A trealase também está presente nas microvilosidades das células epiteliais dos túbulos renais, onde seu papel não é claro (Van Beers *et al.*, 1995). RNA mensageiro para trealase foi detectado em pâncreas e trealase urinária aumenta em problemas renais e em pacientes com diabetes, sendo que seu uso como diagnóstico desses problemas foi proposto (Ishihara *et al.*, 1997).

Em insetos essa enzima é de crucial importância, uma vez que esses organismos possuem trealose como principal açúcar circulante. Nos insetos a trealose é encontrada em todos os órgãos e na hemolinfa, podendo apresentar-se somente na forma solúvel ou ligada a membranas, ou em ambas (Wigglesworth, 1972; Vonk e Western, 1984; Bounias *et al.*, 1993).

## 1.5 O sítio ativo das trealases

Pouco se conhece sobre o sítio ativo das trealases, e nem mesmo ao certo quais são os aminoácidos envolvidos em catálise está elucidado.

Em 1979, Terra e colaboradores trabalharam com a trealase intestinal solúvel presente no tubo digestivo de *Rhynchosciara americana*. A enzima aparentemente apresentava duas carboxilas envolvidas em catálise. Para a carboxila que atuaria como doador de prótons na catálise, detectou-se um pK de 5,0 cineticamente (Terra *et al.*, 1978) ou de 5,3 por modificação química (Terra *et al.*, 1979). Para a carboxila que atuaria como nucleófilo, determinou-se um pK de 7,7 cineticamente (Terra *et al.*, 1978) e de 8,8 por modificação química (Terra *et al.*, 1979). A carboxila desprotonada não tem sua modificação protegida por substrato. Essa ausência de proteção, aliada a grande diferença de pK determinado por métodos cinéticos e por modificação química, levou os autores a sugerirem que ela deve estar próxima mas não no sítio ativo e aventou-se que ela poderia participar da catálise interagindo com um outro aminoácido, talvez histidina (Terra *et al.*, 1979). Outra indicação de que a histidina poderia estar de algum modo envolvida na catálise de trealase é a ocorrência de inativação por dietilpirocarbonato, encontrada em *Lymantria dispar* (Valaitis e Bowers, 1993). Terra e colaboradores (1978) afirmaram que a trealase de *Rhynchosciara americana* não possuía grupos SH que afetassem a catálise porque tratamento com iodoacetato não levou à inativação da enzima. Talvez não estivesse completamente demonstrado que iodoacetato não inative a trealase de *Rhynchosciara americana*, porque os ensaios foram realizados em tampão fosfato

e Chen e colaboradores (1987) mostraram que íons fosfato protegem a trealase intestinal de rato da inativação por iodoacetato.

Chen e colaboradores (1987), determinaram  $pK_s$  de 4,8 e 7,2 para os grupos envolvidos em catálise na trealase intestinal de rato. Mostraram que a enzima é inativada por carbodimida, modificador de grupos carboxila, e que essa modificação podia ser protegida pela presença de trealose, sacarose e Tris (esses dois últimos compostos são inibidores competitivos da enzima). Como Tris só inibe bem a enzima em pH 6 ou inferior (portanto na forma protonada com uma carga positiva) e ele é um inibidor competitivo que protege a enzima da inativação de um grupo carboxila, os autores concluíram que um grupo carboxila no sítio ativo seria necessário para a ligação do Tris e para a catálise, embora não soubessem se uma só carboxila era responsável pela catálise e pela ligação do Tris. Os autores verificaram que a enzima era inativada por iodoacetato, modificador de grupos sulfidríla e que essa inativação também era protegida por trealose e sacarose, mas não por Tris. Devido a esses resultados, mais ao fato do  $K_m$  para a trealase não variar entre os pHs 6 e 8 eles concluíram que o sítio ativo poderia ser funcionalmente dividido em um sítio de ligação (com  $pK$  4,8) e um sítio de catálise (com  $pK$  7,2). Essa proposição não tem sentido, uma vez que o mecanismo de catálise das trealases, como da maioria das glicosidases deve ser uma catálise ácida básica onde os dois grupos são responsáveis pela catálise e estão no sítio ativo. O  $K_m$  pode não variar com o pH em toda a região usada para determinar os  $pK_s$  (Segel, 1975) e os resultados obtidos pelos autores poderiam ser explicados pelo fato do Tris e do iodoacetato serem moléculas menores do que trealose e



sacarose (que ocupariam todo o sítio ativo) e cada um deles se ligaria a um dos dois sub-sítios de ligação de glicose presentes no sítio ativo da trealase.

Lee e colaboradores (2001) repetiram os experimentos realizados por Terra e colaboradores, utilizando uma trealase purificada de adultos da abelha *Apis mellifera*. Eles determinaram  $pK$ s dos grupos envolvidos em catálise como sendo 5,3 e 8,5 e comentaram (embora não mostrem os resultados) que a enzima foi modificada tanto por carbodimida (modificador de grupos carboxila) como por dietilpirocarbonato (modificador de grupos imidazol) e que embora o grupo com  $pK$  menor seja uma carboxila dizem que não ficou claro qual era o grupo com  $pK$  maior. Acabam concluindo que seria uma carboxila, usando os mesmos argumentos iniciais dados por Terra e colaboradores (1978), de que a entalpia de ionização do grupo e seu comportamento frente à alteração na constante dielétrica do meio era mais condizente com uma carboxila.

O estudo mais completo sobre o sítio ativo de uma trealase foi realizado por Silva e colaboradores (2004), utilizando a trealase solúvel presente no intestino médio do Lepidoptero *Spodoptera frugiperda*. Devido a coincidência entre os  $pK$ s dos grupos prototrópicos da enzima determinados por dados cinéticos e por modificação por carbodimida (modificador de carboxila) e fenilglioxal (modificador de grupo guanidino), os autores propõem que o carboxilato, com  $pK$  4,5 seria o nucleófilo e o grupo guanidino de um resíduo de arginina ( $pK = 8$ ) seria o doador de prótons durante o ciclo catalítico. Essa é a primeira vez em que uma arginina é implicada como grupo catalítico de uma glicosidase. Os autores mostraram também que a enzima é inativada por dietilpirocarbonato, mas isso ocorre na presença do inibidor competitivo metil- $\alpha$ -glicosídeo. A enzima com o resíduo de

histidina modificado apresenta o mesmo  $K_m$  e um  $k_{cat}$  duas vezes menor que o da enzima não modificada. Foi mostrado que o papel desse resíduo de histidina é modular o  $pK$  do resíduo de arginina, que muda de 7,8 na enzima nativa para 8,5 na enzima com o resíduo de histidina modificado.

Reunindo os dados de modificação de resíduos de aminoácidos e a proteção dessas modificações por diferentes inibidores, Silva e colaboradores (2004) desenharam o seguinte modelo para o sítio ativo da trealase intestinal de *S. frugiperda*: O sítio ativo seria composto por dois sub-sítios de ligação de glicose. Em um deles está presente o carboxilato e no outro o resíduo de arginina, ambos responsáveis pela catálise. No primeiro sub-sítio ligam-se os inibidores competitivos metil- $\alpha$ -glicosídeo e mandelonitrila, enquanto no sub-sítio que contém o resíduo de arginina liga-se Tris, que só inibe a enzima em pHs altos (9,0).

### 1.6 Os $\beta$ -glicosídeos tóxicos produzidos por plantas e as trealases

As plantas se defendem do ataque de herbívoros através de substâncias químicas que podem afetar o desenvolvimento, a sobrevivência, a biologia da população ou o comportamento de uma espécie de animal. Entre essas substâncias estão os glicosídeos tóxicos.

A especificidade para clivar glicosídeos ligados a compostos hidrofóbicos que muitas  $\beta$ -glicosidases possuem em maior ou menor grau, levou as plantas a evoluírem para produzir  $\beta$ -glicosídeos que possuem o grupo aglicone hidrofóbico, muitas vezes aromático, e muito tóxico quando separado da porção glicosídica. Alguns desses grupos são cianogênicos, liberando ácido cianídrico espontaneamente após a ação de uma  $\beta$ -glicosidase. (Spencer, 1998; Vetter,

2000). Entretanto, não é só a cianogênese que é importante para repelir o inseto predador. Uma das indicações disso é o fato do esqueleto químico que carrega o cianeto ser bastante variado e muitas vezes bastante complexo, o que demanda mais energia para sua síntese (Spencer, 1998).

Os insetos que conseguem alimentar-se de dietas contendo esses glicosídeos defendem-se deles de modos variados: Não sendo capaz de clivá-los, como ocorre com as  $\beta$ -glicosidases de *Spodoptera frugiperda* (dados não publicados), por reduzir a atividade da  $\beta$ -glicosidase capaz de clivar a substância que geraria o composto tóxico como acontece em *Diatraea saccharalis* (Ferreira *et al.*, 1997) ou por selecionar-se uma linhagem resistente, como acontece em *calosobruchus maculatus* (Desroches *et al.*, 1997).

Aparentemente o tipo de enzima mais importante no inseto em relação aos  $\beta$ -glicosídeos tóxicos eram as  $\beta$ -glicosidases. Em 1984, Nakano e Sacktor mostraram que o glicosídeo florizina e seu aglicone floretina inibiam a trealase renal de coelhos. O efeito de  $\beta$ -glicosídeos naturais e seus aglicones em trealase de insetos foi primeiro demonstrado por Silva e colaboradores (2004) com a trealase intestinal de *S. frugiperda*. Essa enzima é inibida competitivamente pelos glicosídeos salicina, amigdalina e prunasina e pelo aglicone mandelonitrila. Florizina, outro  $\beta$ -glicosídeo, é inibidor incompetitivo da enzima.

Face a esses resultados, o efeito de alguns glicosídeos (florizina, amigdalina, prunasina, esculina) e do aglicone mandelonitrila foram estudados em diferentes tecidos de *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* (Diptera), *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* (ambos Lepidopteros) (Silva *et al.*, 2005). Os autores verificaram que todas as trealases de todos os tecidos desses insetos são

inibidas por um ou alguns dos compostos utilizados. Esse trabalho evidencia que os glicosídeos tóxicos produzidos pelos vegetais podem ser bem mais danosos do que se imaginava, pois podem afetar uma enzima chave no metabolismo; a trealase.

As perguntas que ficam para ser respondidas são se os glicosídeos podem ser absorvidos sem serem hidrolisados como foi mostrado ocorrer com alguns glicosídeos em mamíferos (Gopalan, 1992) e como os insetos se defendem dos glicosídeos ou de seus aglicones.

Pelo exposto acima ficam claras as lacunas existentes na compreensão de como atuam as trealases. Essas lacunas também estão presentes no que se refere às propriedades estruturais das trealases, como será comentado a seguir.

### **1.7 classificação de trealases**

Atualmente as glicosidases estão classificadas em famílias, tomando como base a similaridade de seqüências de aminoácidos e os dobramentos das proteínas. Várias vantagens decorrem desse sistema de classificação: as características estruturais das enzimas são melhor refletidas que quando se leva em consideração só a especificidade pelo substrato; ajuda a esclarecer melhor as relações evolutivas entre essas enzimas e providencia uma ferramenta para obter informações sobre o mecanismo enzimático (Henrissat, 1991, Henrissat e Bairoch 1993). Estas famílias foram posteriormente agrupadas em clãs baseando-se nos dobramentos das proteínas que são mais conservados que suas seqüências (Henrissat e Bairoch 1996). Até o momento, as glicosidases estão classificadas

em 100 famílias e 12 clãs, estes dados estão disponíveis na internet e são atualizados constantemente (<http://www.afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>).

As trealases são encontradas nas famílias 37 e 65 das glicosídeo hidrolases (<http://a,fmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY>). A família 65 engloba, além de trealases, maltose fosforilase, trealose fosforilase e kojiobiose fosforilase. Nessa família há somente uma trealase comprovada, de *Aspergillus nidulans*. A família 37 só contém trealases e faz parte do clã G, que também contém as manosil-oligossacarídeo glicosidases. Nessa família são encontradas trealases derivadas de plantas, bactérias, fungos, mamíferos e invertebrados, incluindo os insetos. As trealases de insetos que foram seqüenciadas e encontram-se nessa família são do tubo digestivo de *Bombyx mori*, da glândula acessória de macho de *Tenebrio molitor* e da glândula de veneno de *Pimpla hypochondriaca*. As duas famílias possuem ORFs encontradas em *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster*. Em nosso laboratório já foram obtidas seqüências de duas trealases presentes no tubo digestivo de *Spodoptera frugiperda*. Na família 65 sabe-se o nucleófilo é um grupo fosfato e o doador de prótons é um resíduo de glutamato. Nessa família sabe-se a estrutura de uma maltose fosforilase de *Lactobacillus brevis*. Já na família 37 não são conhecidos os resíduos catalíticos e não há nenhuma proteína cuja estrutura tenha sido determinada.

Só a trealase renal humana foi expressa a partir de um clone de cDNA até o momento (Ishihara *et al.*, 1997), mas ela não foi utilizada em estudos de estrutura.

## 2 Objetivos desse trabalho

Em insetos assim como em nematoda e fungos, a trealase é uma enzima de crucial importância. Em insetos e nematóides a trealose é o principal açúcar circulante. Sabendo que a literatura não apresenta dados claros sobre o sítio ativo e não se sabe quais são os grupos envolvidos em catálise e nem qual é a estrutura tridimensional dessa enzima derivada de qualquer fonte, nosso laboratório decidiu estudar essas enzimas, caracterizando-as cineticamente, clonando o cDNA correspondente, expressando e utilizando a proteína para estudos futuros de estrutura e de grupos envolvidos em catálise.

Uma vez que os insetos são muito diferentes entre si e generalizações não podem ser feitas estudando-se uma só ordem e, além disso, nem todas as proteínas são cristalizadas com sucesso, mais que uma trealase de insetos diferentes começou a ser estudada.

O objetivo desse trabalho é iniciar esses estudos com a trealase intestinal da larva de *Tenebrio molitor*.

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Culturas de *Tenebrio molitor***

As culturas de *T. molitor* foram mantidas em farelo de trigo a temperatura de 24-26 °C e umidade relativa de 70 -75 %. As larvas do último instar foram utilizadas para dissecação.

#### **3.2 Preparação da fração solúvel do tubo digestivo de larvas de *T. molitor***

Larvas de *Tenebrio molitor* foram dessecadas em solução de cloreto de sódio 342 mM a 4 °C. O ventrículo inteiro foi retirado e a porção correspondente ao ventrículo anterior mais ventrículo médio com conteúdo foi homogeneizado em água bidestilada gelada utilizando o homogeneizador Potter-Elvehjem, acoplado a um homogeneizador mecânico (Tecnal, modelo TE-039). O homogeneizado foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 10.000 g. Ao sobrenadante obtido (fração solúvel) foi adicionado sulfato de amônio para uma concentração final de 1,7 M e centrifugado novamente a 15.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para purificar a enzima.

#### **3.3 Determinação de atividade enzimática**

A trealose foi utilizada como substrato da enzima a uma concentração de 7 mM e a atividade enzimática sobre este substrato foi medida pela detecção de glicose, pelo método do Tris-Glicose Oxidase (Dahlqvist, 1968).

Os ensaios foram realizados incubando a mistura de reação em banho termostático a 30°C em diferentes tempos. Foram realizados controles sem enzima e sem substratos (branco de enzima e de substrato respectivamente).

As atividades foram determinadas em condições que a formação de produto é proporcional ao tempo e a concentração de enzima e foram expressas em miliunidades (quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu$ mol de substrato por minuto).

### **3.4 Determinação da concentração de proteína**

A concentração de proteína foi determinada pelo o método descrito por Smith e colaboradores (1985) e modificado por Morton e Evans (1992), usando-se a curva padrão da albumina sérica bovina. Todas as amostras obtidas durante as etapas de purificação foram quantificadas por este método.

### **3.5 Purificação da trealase intestinal de *T. molitor***

A trealase de *T. molitor* foi purificada a partir de três etapas cromatográficas. Nas frações eluídas em cada cromatografia foi medida a atividade enzimática (ver 3.3).

#### **3.5.1 Cromatografia de interação hidrofóbica**

Essa cromatografia foi realizada em sistema de baixa pressão usando a coluna Econo-Pac Methyl HIC, com volume 5mL (Bio Rad), acoplada ao aparelho Econo System (Bio Rad). A coluna foi equilibrada com tampão citrato-fosfato 100 mM pH 6, contendo 1,7 M de sulfato de amônio. Nessa coluna foi aplicado 500  $\mu$ L de material solúvel do ventrículo mais conteúdo, provenientes de 15 intestinos de *T. molitor* preparado como descrito acima. A eluição foi realizada com gradiente decrescente de 1,7 M a 0 M de sulfato de amônio no mesmo tampão de equilíbrio, sendo usado um fluxo de 1mL/minuto e frações de 1mL foram coletadas. As



frações eluídas com atividade foram coletadas e dialisadas por 3 horas em tampão imidazol 20 mM, pH 6, para a dessalinização da amostra.

### **3.5.2 Cromatografia de troca iônica**

As frações acima foram submetidas a uma cromatografia de troca iônica em coluna resource™ Q, volume de 1 mL (Pharmacia Biotech), acoplada ao sistema de alta pressão FPLC (AKTA Pharmacia). A coluna foi equilibrada com 5 volumes com tampão imidazol 20 mM, pH 6. A eluição foi realizada com gradiente crescente de 0 mM a 600 mM de NaCl no mesmo tampão de equilíbrio, sendo usado um fluxo de 1 mL/minuto e frações de 0,4 mL coletadas. As frações eluídas com atividade foram reunidas.

### **3.5.3 Cromatografia de filtração em gel**

Essa cromatografia foi realizada com o material proveniente da cromatografia de troca iônica (item 3.5.2), utilizando a coluna Superdex™ 75 10/30, volume aproximado de 24 mL (Pharmacia Biotech), acoplada ao sistema de alta pressão FPLC (AKTA Pharmacia). A coluna foi equilibrada com 2 volumes com tampão imidazol 20 mM, pH 6. A cromatografia foi feita utilizando-se sistema isocrático, sob fluxo de 1 mL/minuto e frações de 0,4 mL foram coletadas. As frações eluídas com atividade foram reunidas, obtendo-se a enzima purificada.

Nesta cromatografia de filtração em gel a eluição da atividade de interesse foi comparada com a eluição das seguintes proteínas de massa molecular conhecida (padrões): ribonuclease A (13.700 Da), SBTI (20.100 Da), ovoalbumina (43.000 Da), BSA (67.000 Da) e tiroglobulina (669.000 Da). Para cálculos de

massa molecular relativa usou-se a relação linear entre o logaritmo da massa

molecular e o parâmetro  $K_{av} = \frac{(V_e - V_o)}{V_t - V_o}$  (Amersham Biosciences, 2004),

onde:

$V_e$  - volume de eluição da proteína de interesse;

$V_o$  - volume de eluição da tiroglobulina (volume de exclusão da coluna);

$V_t$  - volume total da coluna.

### 3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida para separação de proteína

#### 3.6.1 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada em placa fina de poliacrilamida na presença de SDS utilizando o sistema de tampões descritos por Laemmli (1970). A concentração de poliacrilamida no gel de corrida foi de 12 % e no gel de empilhamento 4 %, ambos continham SDS 0,1 %. As amostras foram dialisadas contra água milli Q para a dessalinização das mesmas, liofilizadas em Speed Vac, ressuspensas em 20  $\mu$ L de tampão de amostra (Tris-Hcl 60 mM pH 6,8; EDTA 0,5 mM; SDS 2,5 % (p/v); 2- $\beta$ -mercaptoetanol 0,36 M; glicerol 10 % (v/v); azul de bromofenol 0,005 % (p/v) e finalmente aquecidas por 4 minutos a 95°C. A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 200 V a temperatura ambiente, até que o azul de bromofenol utilizado como marcador de frente estivesse na borda inferior da placa. O gel de poliacrilamida foi corado com prata (Blum *et al.*, 1987).

### 3.6.2 Eletroforese em condições nativas (PAGE)

Foram usados géis de separação apresentando concentrações de poliacrilamida variadas e gel de empilhamento na concentração de 4 %. Os géis foram feitos como descrito no item 3.6.1 sem conter SDS e 2- $\beta$ -mercaptoetanol.

A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 100 V a 4°C, até que o azul de bromofenol, utilizado como marcador de frente estivesse a na borda inferior da placa. Após da eletroforese, o gel que continha os padrões de peso molecular foi corado com Coomassie Blue e o gel a ser corado para evidenciar a atividade da trealase foi lavado a 4°C com quatro trocas de 30 mL de tampão imidazol 20 mM, pH 6 a cada 15 minutos com agitação. Após isso, o gel foi incubado por 40 minutos a 30 °C no mesmo tampão contendo 20 mM de trealose. O produto da atividade enzimática foi evidenciado mergulhando o gel numa solução 1 M de NaOH contendo 0,15 % de cloreto trifenil tetrazolium e esquentando-o no microondas por aproximadamente 1 minuto na potencia máxima (Pan *et. al.*, 1989; Trudel *et. al.*, 1998).

### 3.6.3 Cálculo do peso molecular através de eletroforese

O peso molecular da proteína em SDS-PAGE foi determinado através de uma curva padrão traçada do logaritmo de peso molecular contra a mobilidade relativa das seguintes proteínas padrões: fosforilase B (97.400 Da), BSA (66.200 Da), ovalbumina (45.000 Da), anidrase carbônica (31.000 Da), SBTI (20.100 Da), lisozima (14.400 Da).

Para proteínas migrando em eletroforese nativa (PAGE), empregou-se o tratamento matemático apresentado por Andrews (1995). As proteínas padrões e a de interesse foram submetidas a eletroforeses em géis contendo diversas concentrações de poliacrilamida. Para cada padrão é traçado um gráfico de migração relativa obtida contra a porcentagem de poliacrilamida do gel. Da inclinação obtida é traçado um gráfico em função do peso molecular de cada um dos padrões, sendo essa reta utilizada para determinar o peso molecular da amostra desconhecida. Os padrões usados para a determinação do peso molecular para a eletroforese nativa foram: BSA (66.000 Da), ovalbumina (45.000 Da), anidrase carbônica (29.000 Da),  $\alpha$ -lactolbumina (14.000 Da), Uréase (trímero, 272.000 Da).

### **3.7 Determinação dos parâmetros de inibição da trealase por diferentes substâncias**

O  $K_m$  e a velocidade máxima de hidrólise do substrato foram determinados pelo método dos quadrados mínimos usando o software Enzfitter (LeatherBarrow, R.J., Elsevier-Biosoft, 1987).

Nos experimentos com inibidores a enzima foi incubada em cinco concentrações de substrato em cinco concentrações diferentes de inibidor e os  $K_{is}$  foram determinados como descrito em Segel (1975).

Uma vez que Glucono- $\delta$ -lactona, utilizada como inibidor, pode decompor-se espontaneamente, ela foi incubada por 30 minutos nas condições de ensaio e detectou-se que cerca de 8 % do composto se decompõe durante o ensaio.

A Floretina utilizada como inibidor foi solubilizada em etanol 50 %. No experimento de inibição com esta substância a concentração de etanol final no ensaio ficou entre 15 % e 5 %. Foram realizados controles da atividade enzimática nestas concentrações de etanol, e a mesma não foi afetada.

A tabela 1 apresenta a estrutura das substâncias utilizadas como inibidores da trealase de *T. molitor*.

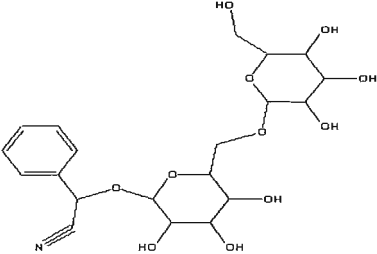
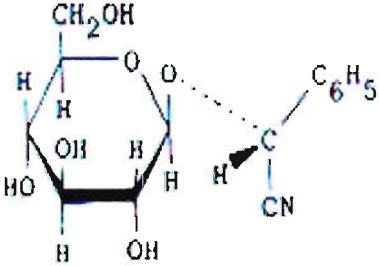
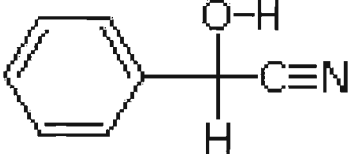
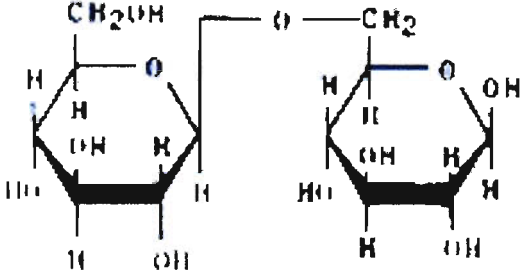
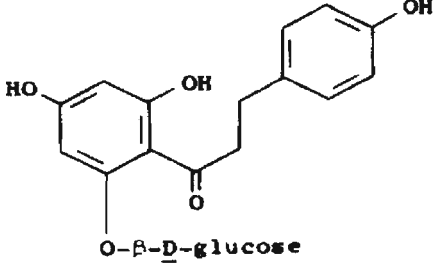
Os experimentos de inibição múltipla foram realizados em tampão imidazol 20 mM, pH 6. A enzima foi incubada a 30 °C com trealose 4 mM, em cinco concentrações de um inibidor em cada uma de cinco concentrações diferentes do outro. As substâncias utilizadas foram: metil- $\alpha$ -manosídeo (0; 48; 160; 240; 340 mM), glucono- $\delta$ -lactona (0; 2,4; 5,6; 8,4; 11,2 mM), floretina (0; 0,04; 0,12; 0,2; 0,3 mM) e mandelonitrila (0; 4,5; 8,25; 10,2; 12 mM).

Para verificarmos se dois inibidores competitivos estariam se ligando ou não ao mesmo local da enzima, a equação utilizada foi a seguinte (Segel, 1975):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_s}{[S]V_{m\acute{a}x}} \left[ 1 + \frac{[J]}{\alpha K_j} \right] \frac{[I]}{K_i} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \left[ 1 + \frac{K_s}{[S]} + \frac{K_s[J]}{[S]K_j} \right]$$

Para os experimentos de inibição múltipla utilizando o inibidor tipo misto contra os inibidores competitivos simples foi deduzida a seguinte equação:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_s}{[S]V_{máx}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[J]}{K_j} + \frac{[I][J]}{\alpha' K_i K_j} \right) + \frac{[J]}{[S]V_{máx}} \left( 1 + \frac{[J]}{\alpha K_j} \right)$$

Substâncias	Estruturas
Amigdalina (glicose-β-1,6glicose- β-mandelonitrila)	
Prunasina	
Mandelonitrila	
Gentiobiose (glicose-β-1,6-glicose)	
Florizina (glicose-β-floretina)	 <p style="text-align: center;"><b>O-β-D-glucose</b></p>

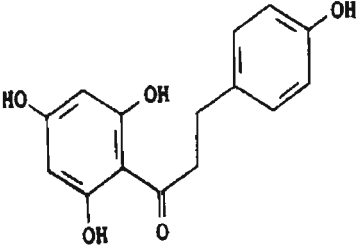
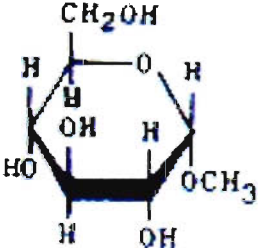
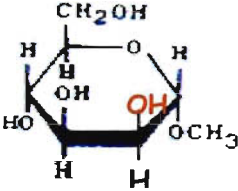
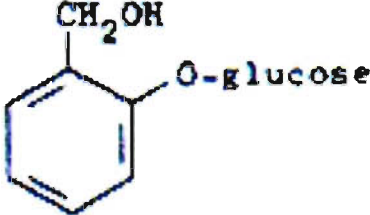
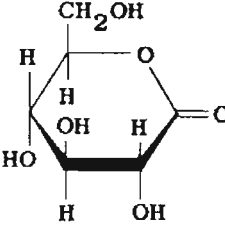
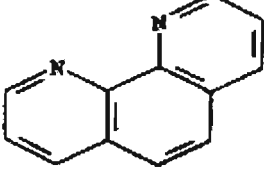
Substâncias	Estruturas
Floretina	
Metil- $\alpha$ -glicosídeo	
Metil- $\alpha$ -manosídeo	
Salisina	
Glucono- $\delta$ -lactona	
1,10 Fenantrolina	

Tabela 1 Estruturas das substâncias utilizadas como inibidores da trealase intestinal de *Tenebrio molitor*.



### 3.8 Experimentos de modificação química

A Tabela 2 apresenta os modificadores químicos utilizados e as condições em que foram realizadas as modificações. Em todos os casos a enzima foi dialisada contra o tampão na qual foi feita a modificação e a reação foi realizada a 30 °C e interrompida em diferentes tempos, determinando-se a atividade remanescente.

As reações de modificação realizadas com tetranitrometano, N-bromo-succinamida e *p*-hidroximercuriobenzoato foram interrompidas diluindo o meio de reação 40 vezes em tampão citrato-fosfato 5 mM pH 6,0 e a seguir as amostras foram submetidas a cromatografia de filtração em gel em coluna HiTrap Desalting utilizando o tampão de ensaio da trealase. As reações de modificação com fenilgloxal, dietilpirocarbonato e carbodimida, foram interrompidas respectivamente com: tampão citrato-fosfato 100 mM pH 6,0 contendo arginina mais lisina (40 mM cada); tampão MES 20 mM pH 6,0 contendo histidina 60 mM e tampão citrato 200 mM pH 6,0. Quando o efeito de EDTA foi verificado, o meio de reação foi tratado como descrito para modificações com tetranitrometano.

Controles revelaram que a enzima não perde atividade na ausência dos modificadores químicos, nas condições usadas em cada um dos experimentos.

Para determinar a ordem de reação em relação ao modificador, foram feitas reações de modificação com diferentes concentrações de modificador e a seguir foi realizado o plote de  $\log k_{obs}$  (constante de segunda ordem da reação de modificação) contra o logaritmo da concentração do modificador. A inclinação da reta obtida è igual a *n* (número de moléculas de modificador que se ligam à enzima).

As reações de modificação foram realizadas também com proteção do substrato numa concentração igual a  $10 K_m$  e de inibidores competitivos numa concentração igual a  $10 K_i$  a fim de verificar se o resíduo alterado pela substância estava presente no sítio ativo da enzima.

<b>Modificador Químico</b>	<b>Grupo afetado</b>	<b>Tampão de modificação</b>	<b>Concentrações de modificador (mM)</b>	<b>Referencias</b>
Fenilgloxal	Guanidino	HEPPES 20 mM pH 8,0	0; 0,5; 12,5; 15; 17,5; 20.	Takahashi, 1968
Tetranitrometano	Fenol	HEPPES 20 mM pH 8,0	20	Riordan e Valee, 1972
N-bromo-succinamida	Triptofano	Imidazol 20 mM pH 6,0	20	Poulos e Price, 1971
EDTA	Cátion divalente	Imidazol 20 mM pH 6,0	20	Cristofolletti e Terra, 2000
Dietilpirocarbonato	Imidazol	MES 20mM pH6	0; 10; 25; 30; 40.	Miles, 1977
Carbodimida	Carboxila	Imidazol 20 mM pH 6,0	0; 1,25; 2,5; 5; 10; 15.	Carraway e Koshland, 1972
<i>p</i> -hidroximercuribenzoato	Sulfidril	Imidazol 20 mM pH 6,0	20	Strange <i>et al.</i> , 1993

Tabela 2. Condições utilizadas para modificação química por diferentes compostos e inibição com EDTA da trealase digestiva de *Tenebrio molitor*.

### 3.9 Determinação de $pK_s$ por modificação química

Para verificar o  $pK$  dos grupos modificados por fenilgloxal, DEPC ou EDC, foram realizadas modificações em diferentes pHs. Os tampões utilizados foram: MOPS 400 mM para pH de 7 a 8,25 na modificação com fenilgloxal, tampão citrato-fosfato 100 mM para pH de 5 a 7 para a modificação com DEPC e Temed/HCl na modificação com EDC para pH de 4 a 6. O valor de  $pK$  foi estimado pelo software Enzfitter utilizando a seguinte equação:

$$k_{obs} = \frac{k'_{obs}}{1 + \frac{K_a}{[H^+]}} + \frac{k''_{obs}}{1 + \frac{[H^+]}{K_a}}$$

Onde:  $k_{obs}$  é a constante de segunda ordem observada,  $k'_{obs}$  é a constante de segunda ordem aparente para a modificação da espécie protonada,  $k''_{obs}$  é a constante de segunda ordem aparente para a modificação da espécie desprotonada e  $K_a$  é a constante de dissociação do grupo modificado.

### 3.10 Determinação dos $pKs$ dos grupos envolvidos em catalise

Para a determinação das constantes de dissociação de grupos prototrópicos envolvidos em catálise, os valores da constante de Michaelis e da Velocidade Máxima foram estimados em 10 valores de pH nos quais a enzima é estável utilizando 7 mM de substrato.  $V_{máx}$  e  $K_m$  foram calculados pelo método dos quadrados mínimos usando o software Enzfitter. Foram utilizados os tampões acetato 50 mM para pHs de 3,5 a 6 e fosfato 50 mM para pHs de 7 a 8. A força iônica dos tampões foi acertada com NaCl para uma força iônica

correspondente à de uma solução de NaCl 100 mM e seu pH foi ajustado na temperatura do ensaio.

As equações 1 e 2 descritas abaixo foram utilizadas para calcular os valores dos p*K*s dos grupos ionizáveis do sítio ativo da enzima livre (equação 1) e do complexo enzima-substrato (equação 2), (Segel, 1975). Estes valores foram estimados pelo software Enzfitter.

$$(1) \quad \frac{K_{mapp}}{V_{máxapp}} = \frac{K_m}{V_{máx}} \left[ 1 + \frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]} \right]$$

Onde  $K_{e1}$  e  $K_{e2}$  correspondem as constantes de dissociação dos grupos prototrópicos da enzima livre.

$$(2) \quad V_{máxapp} = \frac{V_{máx}}{\left[ 1 + \frac{[H^+]}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{[H^+]} \right]}$$

Onde  $K_{es1}$  e  $K_{es2}$  correspondem as constantes de dissociação dos grupos prototrópicos do complexo enzima-substrato.

Os p*K*s da enzima livre (p*K<sub>e</sub>*) e do complexo enzima substrato (p*K<sub>es</sub>*) também foram determinados depois de modificar a enzima com DEPC.

### 3.11 Clonagem do cDNA da trealase intestinal de *Tenebrio molitor*

#### 3.11.1 Extração do RNA total

Para a extração do RNA total foi dessecado o epitélio do intestino de 40 larvas de *T. molitor* em solução salina (NaCl 2%), que foram estocados imediatamente em tubo de microcentrífuga mergulhado em um banho de gelo seco em etanol e ao final, estocados a -80 °C.

Na obtenção do RNA total foi usado o reagente TRIZOL (Gibco) segundo as indicações do fabricante. O material final foi ressuspendido em 25 µL de água com DEPC a 0,01 % v/v, incubado a 65 °C por 10 minutos, agitando-se a cada 2 minutos.

O rendimento do RNA foi calculado a partir de sua absorbância a 260nm empregando o fator de 40 µg correspondente a uma absorbância de 1,0. A relação  $A_{260}/A_{280}$  permitiu estabelecer a pureza do RNA obtido.

Todo o material de vidro utilizado foi esterilizado a 150 °C por 12 horas e as soluções preparadas com água com DEPC a 0,01 % v/v para evitar a contaminação com RNase.

#### 3.11.2 RT-PCR e RACE PCR

##### 3.11.2.1 RT

O RNA obtido como descrito em 3.11.1 foi utilizado para a síntese da fita de DNA complementar (cDNA) realizada com a transcriptase reversa (RT), usando o kit Superscript First Strand (Invitrogene). Preparou-se a mistura RNA/iniciador utilizando 5 µg de RNA total, 1 mM de dNTP e 0,2 µM do iniciador Q+T (5'-GACTTGAGCTTAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'), a qual foi incubada a 75 °C por 10 minutos e a seguir colocada no banho de gelo por 1

minuto para desnaturação da estrutura secundária do RNA. Posteriormente foi feita a reação da transcriptase reversa adicionando os componentes na ordem indicada: 2 µL de 10 X RT buffer; 11,11 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,22 mM DTT; 1 µL de RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor. Nesta reação foi adicionada a mistura de RNA/iniciador, que foi incubada a 42 °C por 2 minutos, imediatamente foram acrescentadas 50 U de SuperScript II RT a mistura e incubada a 42 °C por 1 hora e 30 minutos. A reação foi finalizada incubando-se a mistura a 70 °C por 15 minutos, que a seguir foi transferida para o banho de gelo. Para a degradação do RNA, foi adicionado 1 µL de RNase H incubando-se a 37 °C por 20 minutos e os produtos da reação foram purificados utilizando o Kit Quiagen (Quick PCR purification). A eluição foi feita com 50 µL de água milli Q pH 8, obtendo-se o cDNA.

#### 3.11.2.2 RACE

Para obter a seqüência codificante das extremidades amino e carboxila da trealase do tubo digestivo de *T. molitor* foi feito um RACE. A estratégia basicamente foi a descrita por Frohman (1995), assim na extremidade 3' do cDNA obtido como descrito em 3.11.2.1 foi adicionada uma cauda de poli A usando a enzima TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase-Invitrogen). Este material foi usado como molde para realizar os PCR.

#### 3.11.3 Reação em cadeia com DNA polimerase

O fragmento de DNA que codifica a trealase intestinal do tubo digestivo de *T. molitor* foi conseguido a partir da combinação de vários fragmentos de DNA obtidos em diferentes PCR (figura 3). Os PCR foram realizados usando

como molde 10 % do cDNA (obtido como descrito no item 3.11.2.1) em tampão 10 mM Tris-HCL pH 8, contendo 50 mM KCl; 0,01 % (p/v) gelatina; 0,1 % (p/v) triton X-100; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNTP; 0,5 mM de cada iniciador utilizado; 5 U de taq DNA Polimerase. Cada reação foi incubada a 94 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos como descrito a seguir: 45 segundos a 94 °C, para a desnaturação da dupla fita do DNA; 30 segundos em uma temperatura de pareamento dos iniciadores (escolhida de acordo com os iniciadores usados) e finalmente 2 minutos a 72 °C, para o alongamento da fita complementar de DNA.

Inicialmente amplificamos um fragmento interno da trealase intestinal, utilizando os iniciadores TREGSMFW (5'-GAGTTTTACTACTGGGATTC-3') e TREGSMRV (5'-CATTGTACTTCTCAAACAT-3'). Estes iniciadores são específicos para a trealase da glândula sexual do macho de *T. molitor* (Takiguchi *et al.*, 1992) e foram desenhados em base nas regiões conservadas das trealases, a partir de seqüências encontradas no "National Center for Biotechnology Information" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A extremidade que codifica a porção carboxila da proteína foi amplificada com o iniciador Q+T (5'-GACTTGAGCTTAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') e o iniciador TREGSMFW. Para a amplificação da região que codifica a extremidade amino terminal da proteína, foram desenhados novos iniciadores denominados NTER24RV1 (5'-AGCTTCACAATTCCCCTCTTGGC-3') e NTER24RV2 (5'-GTGCATGTCCTCAGCAGAAGTCC-3'). Estes iniciadores foram fundamentados na seqüência de DNA obtida para a extremidade 3'. Finalmente o fragmento de DNA que codifica a trealase intestinal de *T. molitor* madura foi obtido com os iniciadores TREX3C (5'-TCATTACCTAGAGGTTTTTTTTGGA-3')

e TREX5N (5'-CCATCATGTGACAGTCTGATGTAC-3'), que foram desenhados com base nas extremidades 3' e 5' do gene.

Os fragmentos de DNA obtidos das ampliações por PCR foram recuperados diretamente dos géis de agarose (ver 3.11.4) usando o protocolo de extração QIAEX II (Quiagem), o qual baseia-se na dissolução da agarose em um tampão de alta força iônica e ligação do DNA a uma resina de troca iônica. Estes fragmentos foram clonados no plasmídeo pGEM-T (ver 3.11.5).

#### **3.11.4 Eletroforese em gel de agarose**

Para analisar os fragmentos de DNA derivados da amplificação por PCR foram preparados géis de agarose na concentração final de 1 % (p/v) em tampão TAE (8 mM Tris-Acetato; 0,4 mM EDTA pH 8,5) e as amostras de DNA foram resolvidas em uma diferença de potencial de 90 V. O tampão de amostra (2:5 volumes de amostra) contendo azul de bromofenol, utilizado na eletroforese, foi usado para monitorar a migração da amostra e determinar o encerramento da eletroforese.

Após a eletroforese, o DNA foi evidenciado utilizando-se brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado em transiluminador de luz UV (312 nm).

#### **3.11.5 Clonagem de fragmentos de DNA no plasmídeo pGEM-T**

Os fragmentos de DNA obtidos nas ampliações por PCR, foram clonados no plasmídeo pGEM-T, utilizando o Kit de ligação pGeneT-Easy vector Sistem I (Promega). A reação de ligação consistia de T4 DNA ligase, 1µg de plasmídeo juntamente com o fragmento de PCR (purificado de géis de agarose, ver ultimo parágrafo do item 3.11.3) a ser clonado no tampão



apropriado. Esta mistura foi incubada “over night” a 4 °C. O produto de ligação foi utilizado para transformar bactérias competentes (ver 3.11.6).

### **3.11.6 Preparação das bactérias competentes**

Um pré-inóculo de *Escherichia coli* da linhagem XL1-blue MRF' foi preparado a partir de uma colônia isolada, crescida em meio LB líquido durante 16 horas a 37 °C e sob agitação de 250 rpm. Este pré-inóculo foi adicionado a 400 mL de meio LB líquido e mantido nas condições anteriormente descritas até obtermos uma  $DO_{600} = 0,3$ . A cultura foi mantida no gelo por 10 minutos. Este material foi submetido as centrifugações descritas abaixo e o precipitado que continha as células em cada centrifugação foi ressuscitado em tampão PIPES 10 mM, pH 7, contendo  $CaCl_2$  60 mM e glicerol 15 % (v/v). As condições de centrifugação foram as seguintes: (a) centrifugação a 1.600x g, por 7 minutos a temperatura ambiente, precipitado ressuscitado em 10 mL de tampão. (b) centrifugação a 1.000x g, por 5 minutos a temperatura ambiente, precipitado ressuscitado em 10 mL de tampão, esta ressuspensão foi mantida no gelo por 30 minutos. (c) centrifugação a 1.000x g, por 5 minutos a temperatura ambiente, precipitado ressuscitado em 2 mL de tampão. Finalmente foi alíquotado e estocado a -80 °C.

### **3.11.7 Transformação de bactérias competentes**

Foram utilizados 30 µL das células competentes XL1-blue (ver 3.11.6) e 10 µL dos reagentes utilizados na reação de ligação dos fragmentos ao plasmídeo vetor (ver 3.11.5). Esta mistura foi mantida no banho de gelo por 20 minutos e imediatamente submetida a um choque térmico a 42 °C por 90

segundos, retornado ao gelo por 2 minutos. Adicionou-se 80  $\mu$ L de meio LB líquido e as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora para a recuperação e expressão do gene de resistência a ampicilina (presente no plasmídeo pGeneT-Easy vector). Finalmente as células foram plaqueadas em LB ágar contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina; 100  $\mu$ L de IPTG 100 mM e 50 mg/mL de Xgal e incubadas a 37 °C por 16 horas. As bactérias transformadas com o plasmídeo contendo o inserto originaram colônias de cor branca.

### **3.11.8 Obtenção de plasmídeos contendo o inserto da trealase**

Foram selecionadas colônias transformadas (ver 3.11.7) para serem crescidas em 5 mL de meio LB-líquido a 37 °C sob agitação de 250 rpm. A partir destas culturas de bactérias foram extraídos os plasmídeos usando o protocolo "Wizard Miniprep" (Promega). As bactérias foram precipitadas por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, ressuspensas em 200  $\mu$ L de tampão de ressuspensão (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 contendo EDTA 10 mM e RNase 100  $\mu$ g/mL) e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a lise alcalina das bactérias, adicionando-se 200  $\mu$ L de tampão de lise (NaOH 0,2 M; SDS 1 % (p/v)), agitado-se suavemente e incubando-se novamente por 5 minutos a temperatura ambiente. Após adição de 200  $\mu$ L de tampão de neutralização (acetato de potássio 1,32 M, pH 4,8). Este material foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi aplicado em mini coluna contendo uma resina de troca iônica. A coluna foi lavada com uma mistura de tampão acetato 80 mM, EDTA 40  $\mu$ M e etanol 55 % (p/v) para retirar o material

contaminante. A eluição dos plasmídeos pela coluna foi realizada com água Milli Q pH 8.

Para confirmar a presença do fragmento inserido nestes plasmídeos foi utilizada a enzima de restrição EcoRI (Promega), usando o tampão e o número de unidades indicadas pelo fabricante. A mistura foi incubada por 1 hora a 37 °C. Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose 1 % (p/v) (ver 3.11.4), gerando os fragmentos de pares de bases esperados.

### 3.11.9 Seqüenciamento

Os plasmídeos que continham os fragmentos de interesse, foram seqüenciados pelo método de Sanger e colaboradores (1977), usando os iniciadores T7 e Sp6, que anelam na região do vetor pGEM-T. A reação de seqüenciamento foi realizada usando 500 ng de plasmídeo; 3 µL de iniciador na concentração de 3,3 pmol/µL; 2 µL de “Terminator Ready Reaction Mix” (Perkin Elmer); 3 µL de tampão Tris-HCl 200mM, pH 9; MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 9; para um volume final de 15 µL. A reação foi realizada num aparelho de Perkin-Elmer modelo GeneAmp PCR System 9700 com 35 ciclos em que as amostras permaneceram, sucessivamente a: 96 °C por 45 segundos; 50 °C por 30 segundos e 60 °C por 4 minutos. As amostras foram analisadas utilizando um seqüenciador automático ABI373A (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) (serviço de seqüenciamento do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo). As seqüências de nucleotídeos resultantes do seqüenciamento foram comparadas com outras seqüências de trealase depositadas em bancos de dados. Para isto foi feita uma consulta ao “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando o

programa de alinhamento de seqüências BLAST (Altschul et al., 1990). Para o alinhamento múltiplo de seqüências de polipeptídios foi usado o programa Clustal disponível no “Expasy Molecular Biology Server” e as seqüências para comparação foram obtidas do Gen Bank.

### 3.12 Expressão da trealase intestinal de *Tenebrio molitor* em bactérias BL21 DE3

Os iniciadores TRESP 3C (5' *cta* **TCT AGA** TCA TTA CCT AGA GGT TTT TTT GGA 3') e TRESP 5N (5' *ggaattc* **CAT ATG** CCA TCA TGT GAC AGT CTG ATG TAC 3') foram empregados para realizar um PCR utilizando como molde o plasmídeo pGEM-T que continha o fragmento de DNA da trealase clonado (ver 3.11.3). Na descrição dos iniciadores acima os nucleotídeos em negrito representam os sítios de restrição de *NdeI* e *XbaI* em TRESP 5N e TRESP 3C, respectivamente. Os nucleotídeos grifados correspondem a seqüências específicas da extremidade 5' e 3' do gene que codifica a trealase madura; os nucleotídeos em itálico correspondem à extensões que visam aumentar a eficiência de digestão dos produtos amplificados. O plasmídeo PT7 e o produto amplificado foram recuperados diretamente do gel de agarose (ver 3.11.3 último parágrafo) e foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XbaI*, como descrito a seguir. Para a digestão do produto de PCR incubou-se 48 µL da solução que o continha com 4,8 µL de *XbaI* 3 U / mL; 4,8 µL de *NdeI* 4U / mL; 4,8 µL de tampão NEB 3 (50 mM de acetato de potássio; 20 mM de Tris-acetato; 10 mM de acetato de magnésio; 1 mM de DTT; pH 7) e 28,8 µL de água. Para a digestão do plasmídeo, 31 µL da solução contendo o plasmídeo PT7 foi incubada com 3,1

$\mu\text{L}$  de *XbaI* 3 U / mL; 4,8  $\mu\text{L}$  de *NdeI* 4U / mL; 4,8  $\mu\text{L}$  de tampão NEB 3 e 28,8  $\mu\text{L}$  de água. As incubações foram realizadas a 37°C por 16 horas e os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8 % (ver 3.11.4). A seguir, o plasmídeo e o produto de PCR digeridos foram ligados enzimaticamente incubando-se a 16 °C por 16 horas uma mistura de 6  $\mu\text{L}$  da solução que continha o plasmídeo digerido; 6  $\mu\text{L}$  da solução contendo o produto de PCR digerido; 0,5  $\mu\text{L}$  T4 DNA ligase 20 U / mL; 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão para T4 DNA ligase (50 mM tris-HCl; 10 mM cloreto de magnésio; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 25 mg/mL de BSA; pH 7,8) e 10  $\mu\text{L}$  água. Após esse período de incubação, 1  $\mu\text{L}$  dessa mistura de reação foi adicionado a 250  $\mu\text{L}$  da solução contendo bactérias BL21DE3 competentes. Esta mistura foi mantida no banho de gelo por 30 minutos e imediatamente submetida a um choque térmico a 42 °C por 30 segundos, retornado ao gelo por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de meio LB líquido e as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora para a seleção e expressão do gene de resistência a ampicilina. Finalmente as células foram plaqueadas em LB ágar contendo 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina e incubadas a 37 °C por 16 horas.

Para expressão da trealase foi escolhida uma colônia BL21 DE3 transformada com pT7 TER a qual foi crescida em 4 mL de meio LB líquido com carbenicilina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 16 horas, a 37 °C e sob agitação de 200 rpm. Este pré-inóculo foi adicionado a 500 mL do mesmo meio e mantido nas mesmas condições de crescimento até atingir uma  $\text{DO}_{600} = 0,8$ . Atingida esta absorbância procedeu-se à indução da produção da enzima recombinante, adicionando-se IPTG para uma concentração final de 2mM. Foram retiradas alíquotas de 1 mL antes da indução e durante a indução de hora em hora, por

um período de 6 horas, para realizar o SDS-PAGE e monitorar a expressão da proteína. As condições de crescimento durante a indução foram 25 °C agitação a 150 rpm.

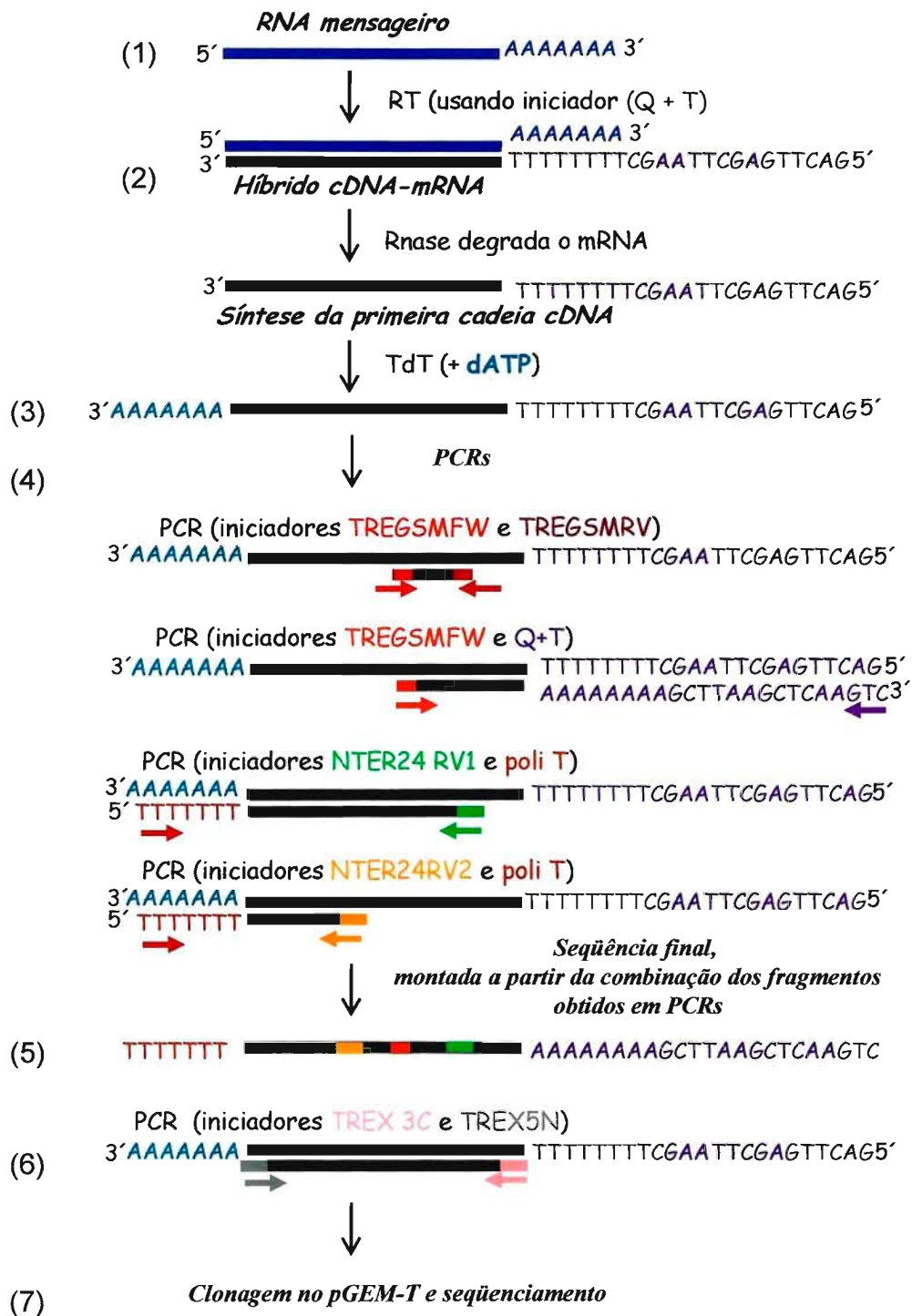


Figura 3. Representação esquemática da clonagem do cDNA correspondente a trealase intestinal de *T. molitor*. (1) extração do RNA total do epitélio do intestino das larvas de *T. molitor*. (2) O RNA foi utilizado como molde para a síntese da fita de DNA complementar (cDNA). (3) A este cDNA foi adicionada uma cauda de poli A com a enzima TdT na extremidade 3'. (4) Amplificação por PCR de vários fragmentos correspondentes à trealase intestinal utilizando diferentes iniciadores, tendo como molde o cDNA obtido na etapa 3. (5) Montagem da seqüência final a partir das seqüências obtidas na etapa 4. (6) PCR para obtenção do fragmento de DNA que codifica a trealase completa utilizando iniciadores específicos das extremidades 3' e 5' da trealase. (7) Os fragmentos obtidos por PCR foram clonados no plasmídeo pGEM-T. Estes plasmídeos foram seqüenciados usando os iniciadores T7 e Sp6

## 4 Resultados

### 4.1 Purificação da trealase digestiva de *Tenebrio molitor*

A purificação da enzima foi constituída de três etapas cromatográficas e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3. Inicialmente realizou-se a precipitação de proteínas presentes no homogeneizado, pela adição de sulfato de amônio em uma concentração final de 1,7 M. Após ser centrifugado, o material que permaneceu no sobrenadante foi submetido a uma cromatografia hidrofóbica em sistema de baixa pressão (coluna Econo Pac Methyl HIC), obtendo-se um pico único de atividade (figura 4), com uma recuperação de 78 % e enriquecimento da preparação em 6,5 vezes, com relação ao material inicial. As frações que apresentaram mais atividade (frações 19-24) neste passo foram reunidas e dialisadas, sendo que a recuperação da atividade enzimática na diálise é quase total. A seguir foi realizada uma cromatografia de troca iônica em sistema FPLC (coluna resource™ Q), onde foi encontrado um único pico correspondente a atividade da trealase (figura 5), com recuperação da atividade de 69 % e um enriquecimento de 7 vezes em relação ao material anterior. As frações que apresentaram maior atividade enzimática (frações 50-57), foram aplicadas numa cromatografia de filtração em gel (coluna Superdex™ 75 ), resultando também em único pico de atividade (figura 6), com uma recuperação de 85 % e enriquecimento de 1,5 vezes em relação ao passo anterior. Dessa cromatografia foram coletadas as frações 19-20, cuja massa molecular determinada por esse método foi de 97.000 Da.

Foi feito SDS-PAGE (figura 7) das frações ativas eluídas da cromatografia de filtração em gel, obtendo-se, nas frações 19 e 20, uma banda



única com massa molecular de 49.000 Da. Essas duas frações são as que apresentaram maior atividade enzimática. A enzima, após os passos cromatográficos apresenta enriquecimento de 73 vezes em relação ao material inicial e a atividade específica calculada de 16,5 U/mg.

<b><i>Etapas de purificação</i></b>	<b><i>Atividade total (mU)</i></b>	<b><i>Proteína total (mg)</i></b>	<b><i>Atividade específica (mU/mg)</i></b>	<b><i>Enriquecimento</i></b>	<b><i>Recuperação (%)</i></b>
Homogeneizado	4303	19,00	226	1	100
Cromatografia hidrofóbica (Econo-Pac Meththyl HIC)	3363	2,30	1462	6,5	78
Cromatografia de troca iônica (resource™ Q)	2334	0,22	10609	47	54
Cromatografia filtração em gel (Superdex™ 75)	1984	0,12	16533	73	46

Tabela 3. Proteína e atividade recuperada nos passos usados para a purificação da trealase digestiva de *Tenebrio molitor*

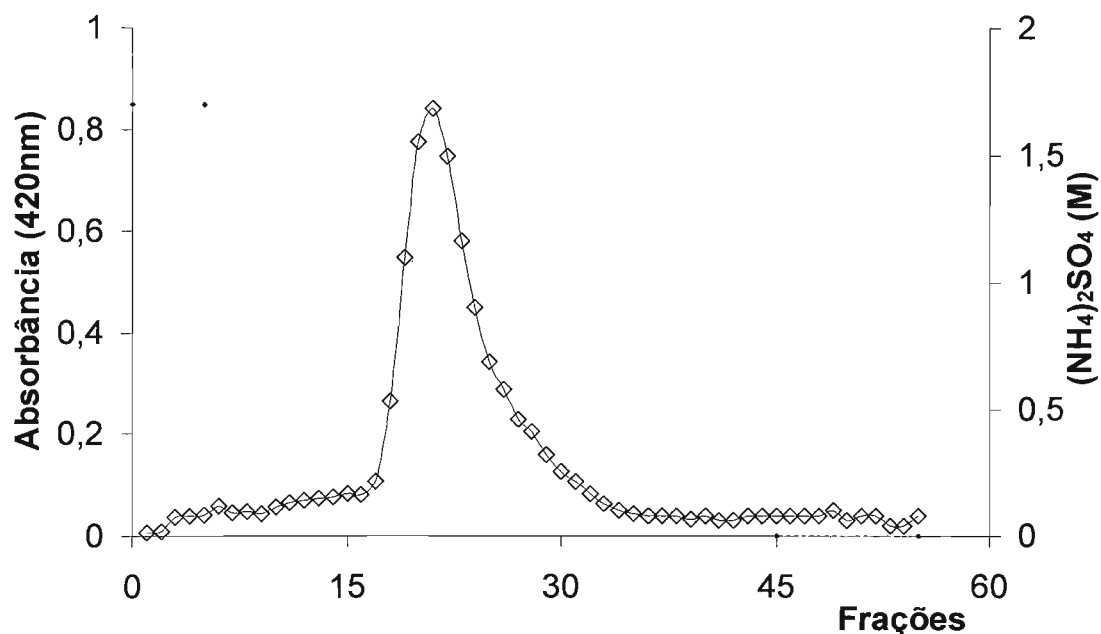


Figura 4. Perfil da atividade enzimática obtido após cromatografia hidrofóbica realizada em sistema de baixa pressão Econosystem (Bio Rad) em coluna Econo Pac Methyl HIC, da fração solúvel do intestino médio de *T. molitor*.  
 ----- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (M); ◇ absorbância (420 nm).

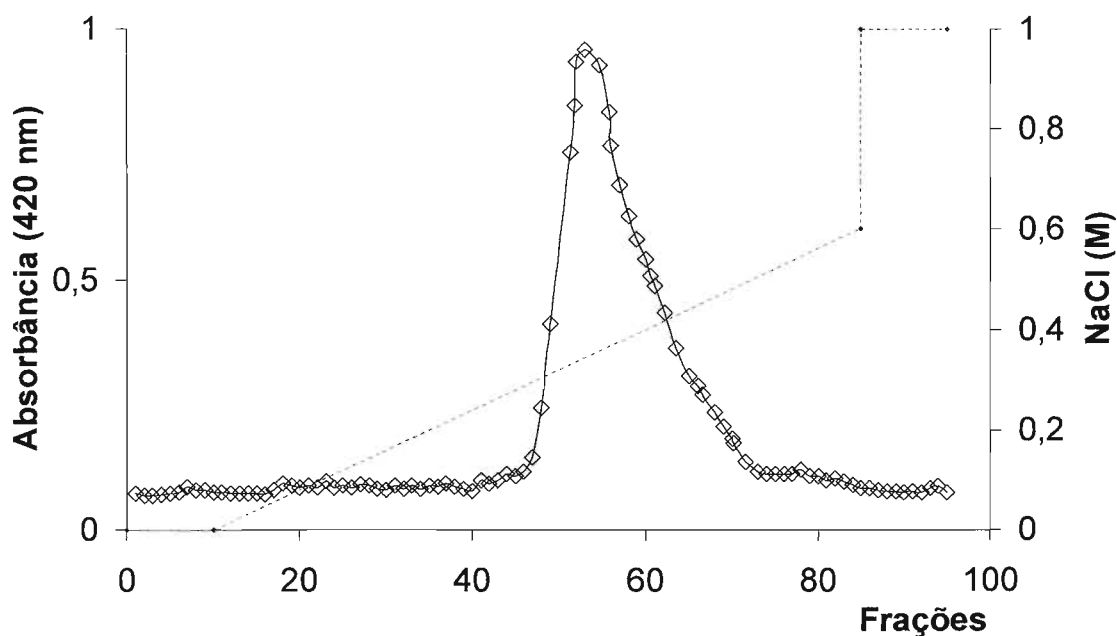


Figura 5. Perfil da atividade enzimática obtido após cromatografia de troca iônica, realizada em coluna resource<sup>TM</sup>Q acoplada em sistema FPLC, das frações mais ativas obtidas na cromatografia hidrofóbica ( ver Fig. 4).  
 ----- NaCl (M); ◇ absorbância (420 nm).

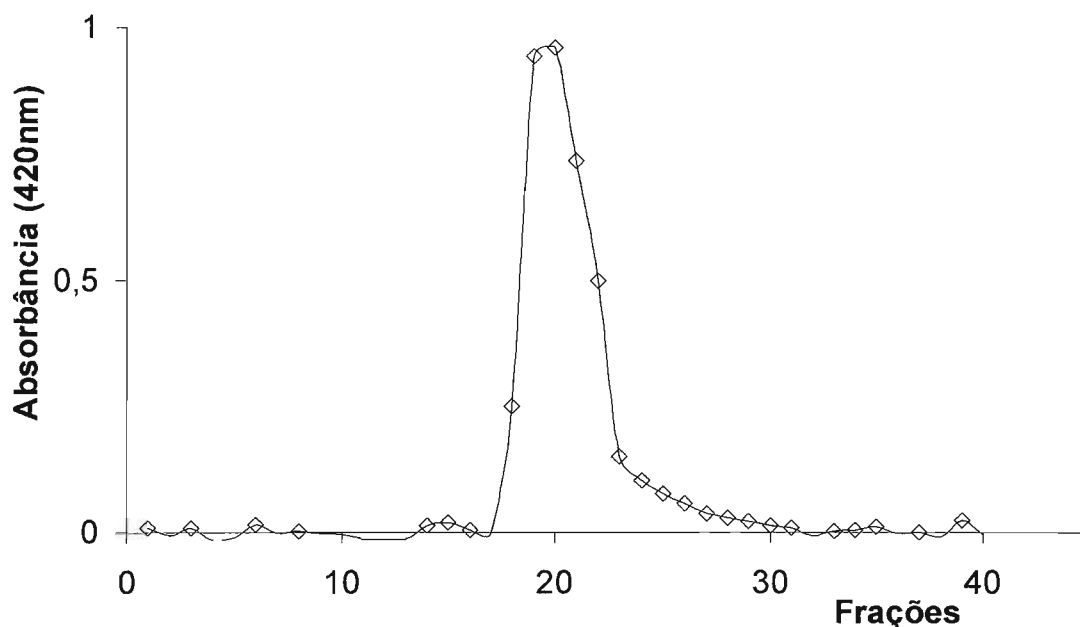


Figura 6. Perfil da atividade enzimática obtido após cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex<sup>T</sup> 75, realizada em sistema FPLC, das frações mais ativas eluídas da cromatografia de troca iônica (ver Fig. 5).

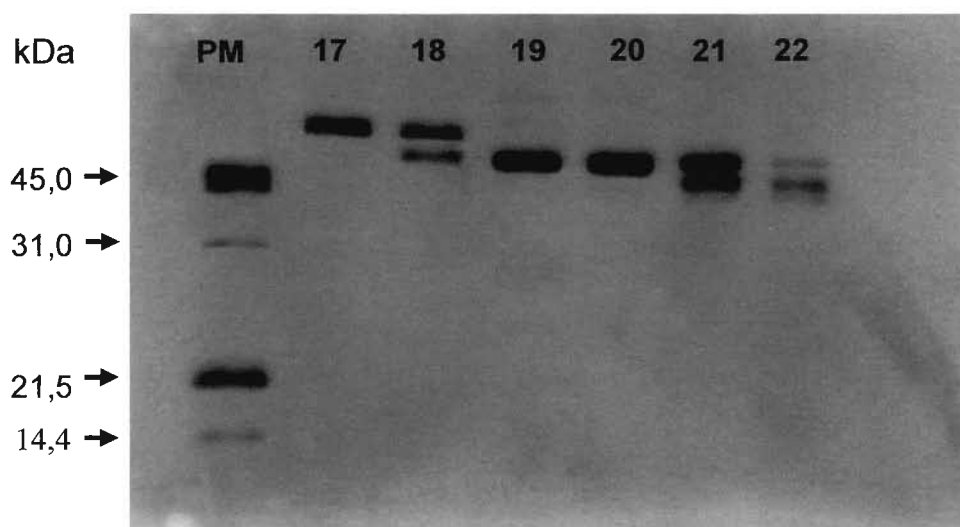


Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % em condições desnaturantes, das frações eluídas na cromatografia de filtração em gel. Gel corado com prata segundo Blum e colaboradores (1987). A banda mais intensa presente nas frações 19 e 20 com massa molecular de aproximadamente e 49.000 Da, deve corresponder a trealase.

#### 4.2 Determinação dos pKs dos grupos envolvidos em catálise.

Com o objetivo de determinar os grupos ionizáveis envolvidos em catálise na trealase de *T. molitor*, foram determinados os pKs da enzima livre ( $pK_e$ ) e do complexo enzima substrato ( $pK_{es}$ ) a partir de valores de  $V_{m\acute{a}x}$  e  $V_{m\acute{a}x}/K_m$  obtidos em vários pHs. Os dados obtidos indicam que a enzima de *T. molitor* possui dois grupos prototrópicos envolvidos em catálise. Um grupo desprotonado de  $pK_{e1}$  igual a  $3,8 \pm 0,2$  e um grupo protonado de  $pK_{e2}$  igual a  $7,4 \pm 0,2$  (figura 8 A). Os valores obtidos para o complexo enzima-substrato foram de  $pK_{es1}$  igual a  $3,9 \pm 0,2$  e  $pK_{es2} = 6,9 \pm 0,2$  (figura 8 B). O pH ótimo da enzima pode ser calculado a partir dos valores de pKs:  $pH = \frac{pK_{e1} + pK_{e2}}{2}$ , aplicando esta relação para os valores de pKs obtidos, o pH ótimo é igual a 5,6, muito semelhante ao valor obtido na curva de pH feita em uma só concentração de substrato (resultados não mostrados).

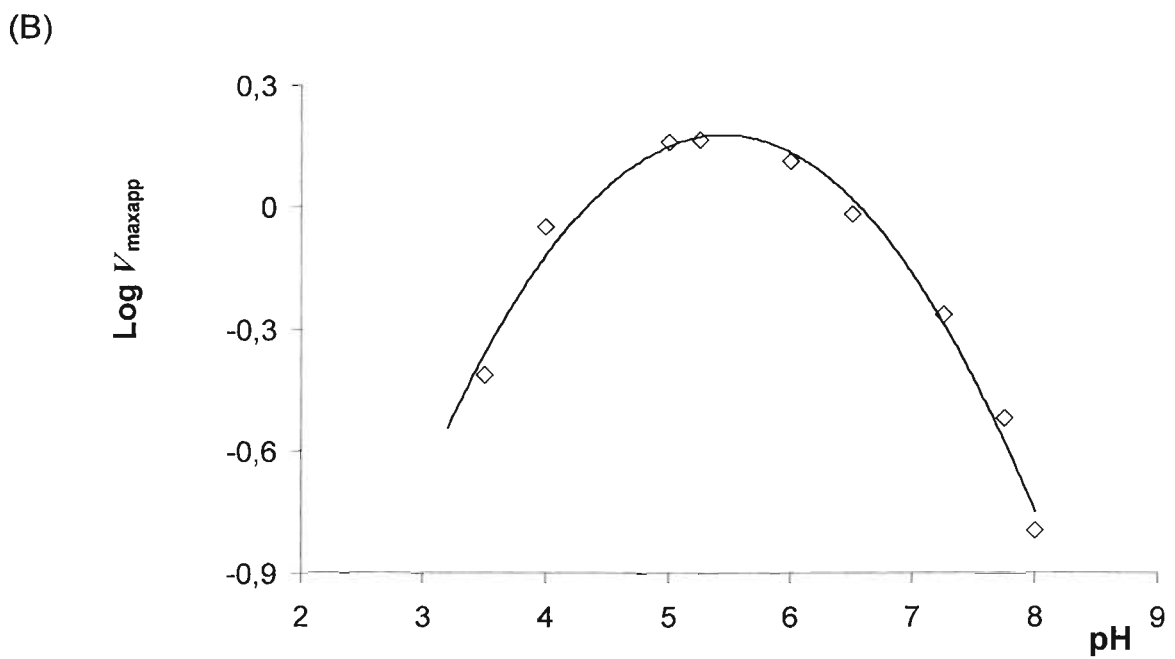
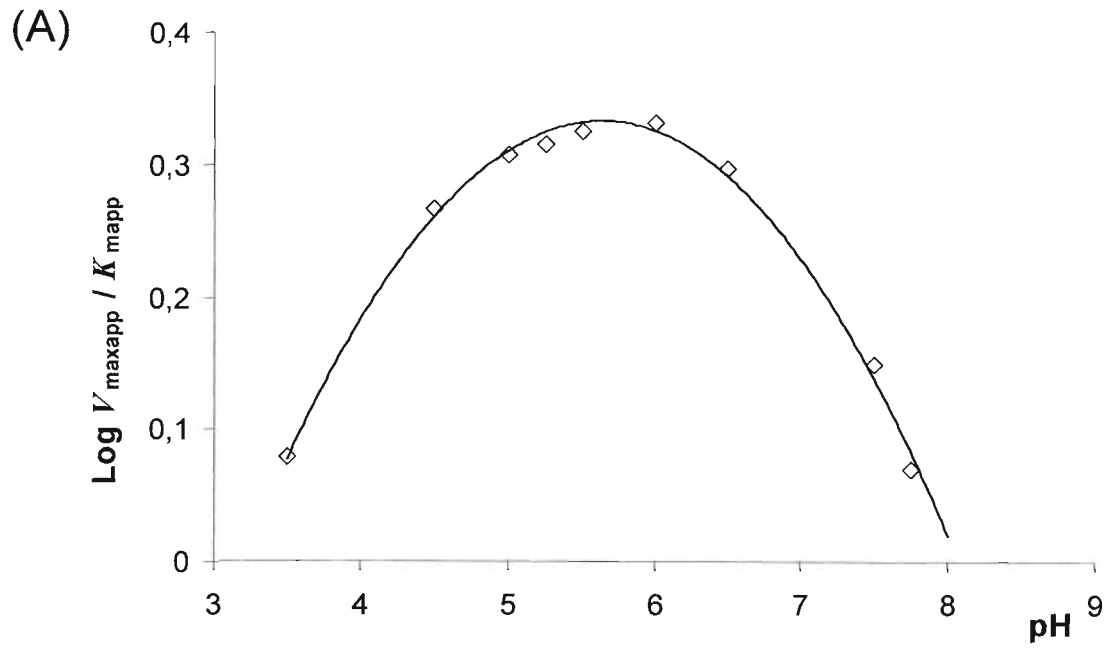


Figura 8. (A) Efeito do pH no  $V_{\text{mapp}}/K_m$  para a determinação do  $pK_{e1}$  e  $pK_{e2}$ .

(B) Efeito do pH no  $V_{\text{mapp}}$  para a determinação do  $pK_{es1}$  e  $pK_{es2}$ .

### 4.3 Efeito de vários compostos na atividade da trealase

A tabela 4 apresenta os parâmetros de inibição da enzima por várias substâncias. Glucono- $\delta$ -lactona, metil- $\alpha$ -manosídeo, os glicosídeos tóxicos amigdalina, prunasina, salicina, florizina e seu aglicone floretina inibiram competitivamente a trealase de *T. molitor* (ver figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

O aglicone presente na amigdalina e prunasina, a mandelonitrila, é um inibidor não competitivo linear misto (figura 16). Nessa inibição, há formação de um complexo enzima-substrato-inibidor que não é produtivo ( $\beta = 0$ ) e há um parâmetro  $\alpha > 1$ . Esse parâmetro  $\alpha$  mede quanto a ligação do substrato ou do inibidor à enzima dificulta a ligação do outro composto. O  $K_i$  para inibição por mandelonitrila foi de 3,8 mM e o  $\alpha$  de 1,5.

<b><i>Inibidor</i></b>	<b><i>K<sub>i</sub> (mM)</i></b>	<b><i>Tipo de inibição</i></b>
Floretina	0,008	IC
Amigdalina	0,22	IC
Prunasina	0,43	IC
Florizina	0,50	IC
Glucono- $\delta$ -lactona	1,40	IC
Metil- $\alpha$ -manosídeo	43,00	IC
Salicina	186	IC
Mandelonitrila	3,80	IM
Gentibiose	-----	NI
Metil- $\alpha$ -glucosídeo	-----	NI
1,10 fenantrolina	-----	NI
Tris pH 6	-----	NI

Tabela 4. Inibição da trealase intestinal de *Tenebrio. Molitor*

Condições de ensaio: Os ensaios foram realizados em banho termostático a 30°C. A enzima foi incubada em concentrações diferentes de substrato com concentrações diferentes de inibidor. As velocidades de hidrólise das diferentes concentrações de substratos foram determinadas e usadas para traçar o gráfico de Lineweaver-Burk. As inclinações obtidas desses gráficos foram traçadas em função das respectivas concentrações de inibidor permitindo assim a determinação de  $K_i$  do complexo enzima/inibidor Segel (1975). (NI: não inibe; IC: inibição competitiva simples; IM: inibição mista).

Gentibiose (10 mM), metil- $\alpha$ -glucosídeo (200 mM), 1,10-fenantrolina (4 mM) e Tris (264 mM) não foram capazes de inibir a enzima

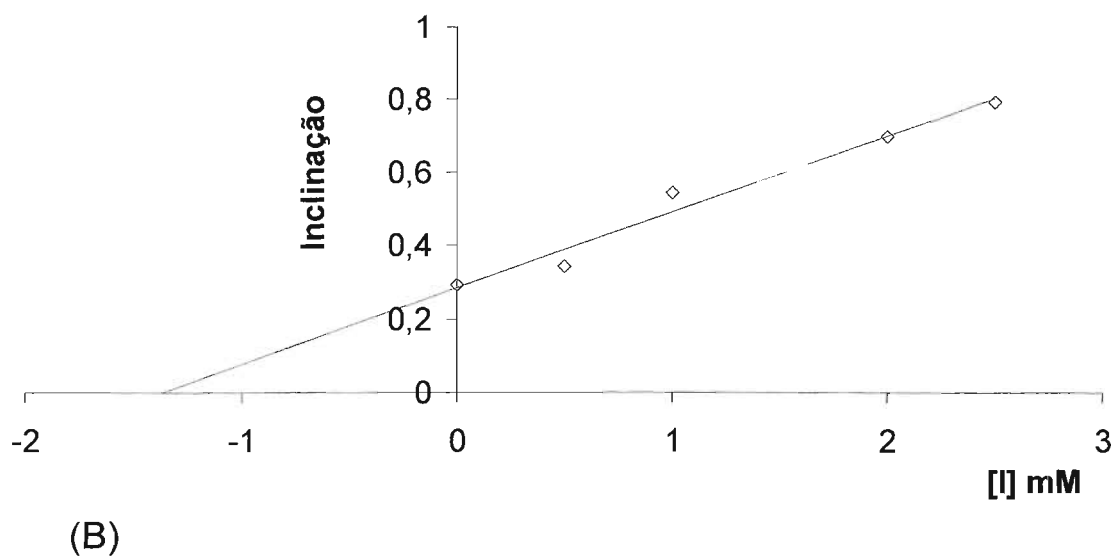
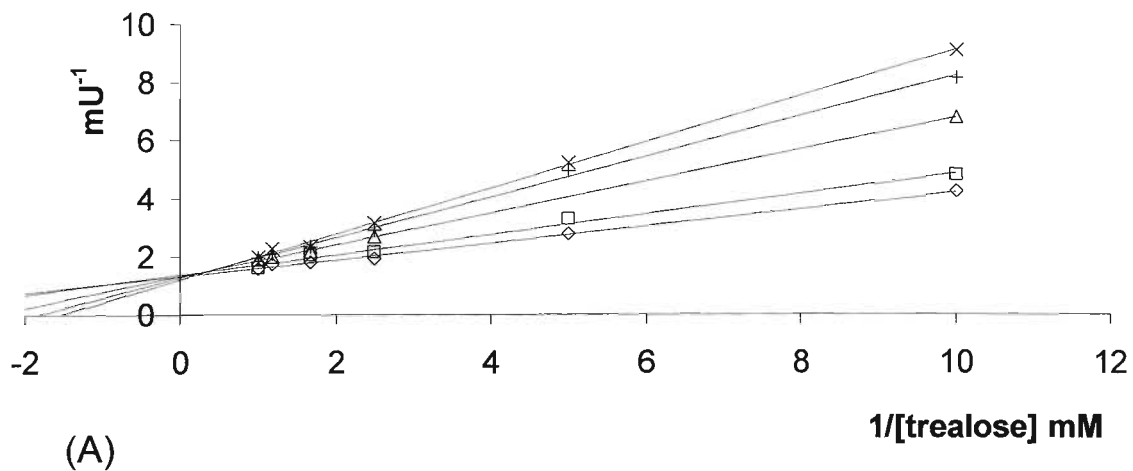
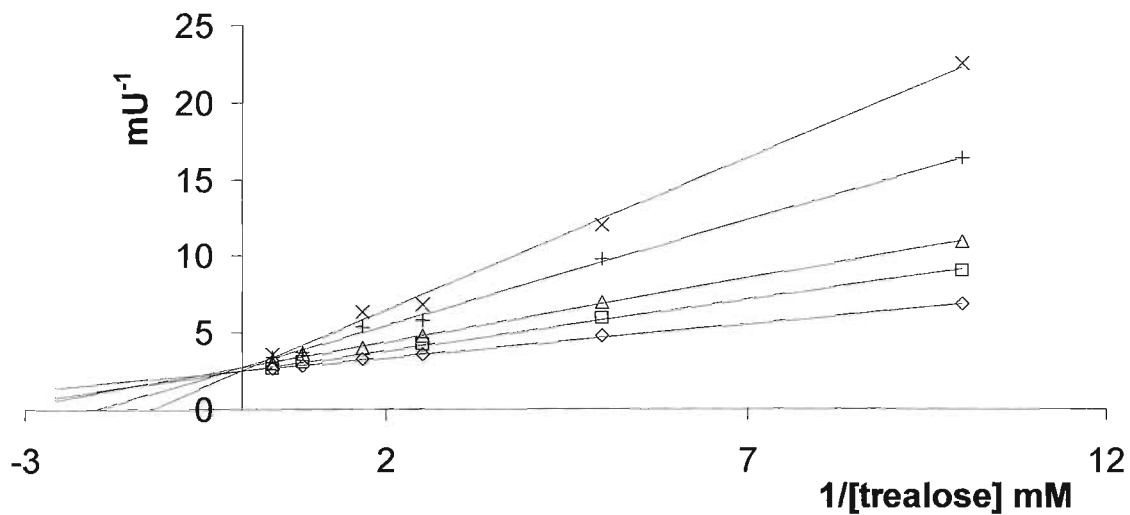
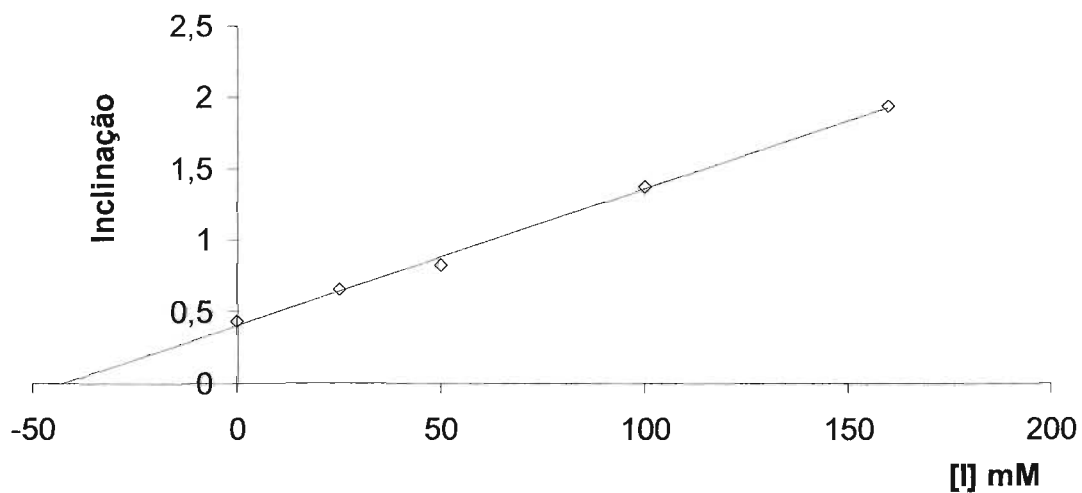


Figura 9. Inibição da trealase intestinal de *Tenebrio molitor* por Glucono- $\delta$ -lactona. (A) Plote de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de inibidor ( $\diamond$  [0];  $\square$  [0,5];  $\Delta$  [1]; + [2]; x [2,5] mM). (B) Plote das inclinações obtidas no gráfico de Lineweaver-Burk contra as concentrações de Glucono- $\delta$ -lactona utilizadas.





(A)



(B)

Figura 10. Inibição da trealase intestinal de *Tenebrio molitor* por Metil- $\alpha$ -manosídeo. (A) Plote de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de inibidor ( $\diamond$  [0];  $\square$  [25];  $\Delta$  [50];  $+$  [100];  $\times$  [160] mM). (B) Plote das inclinações obtidas no gráfico de Lineweaver-Burk contra as concentrações de Metil- $\alpha$ -manosídeo utilizadas.

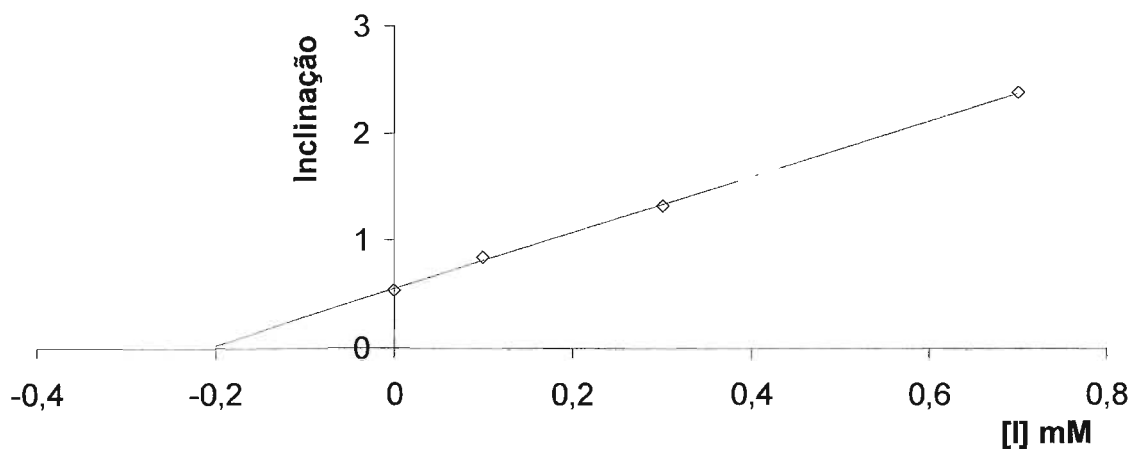
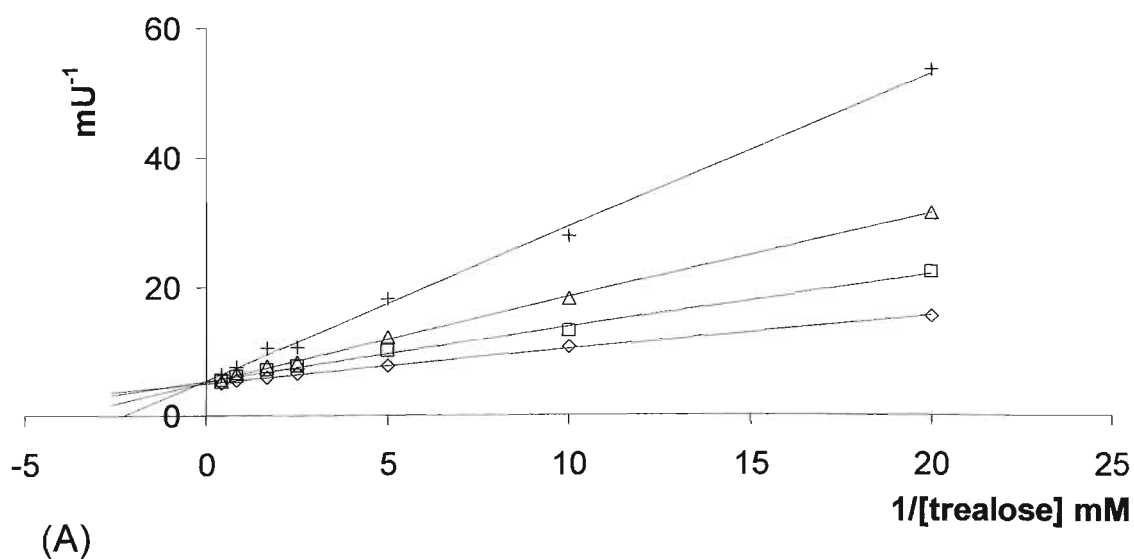
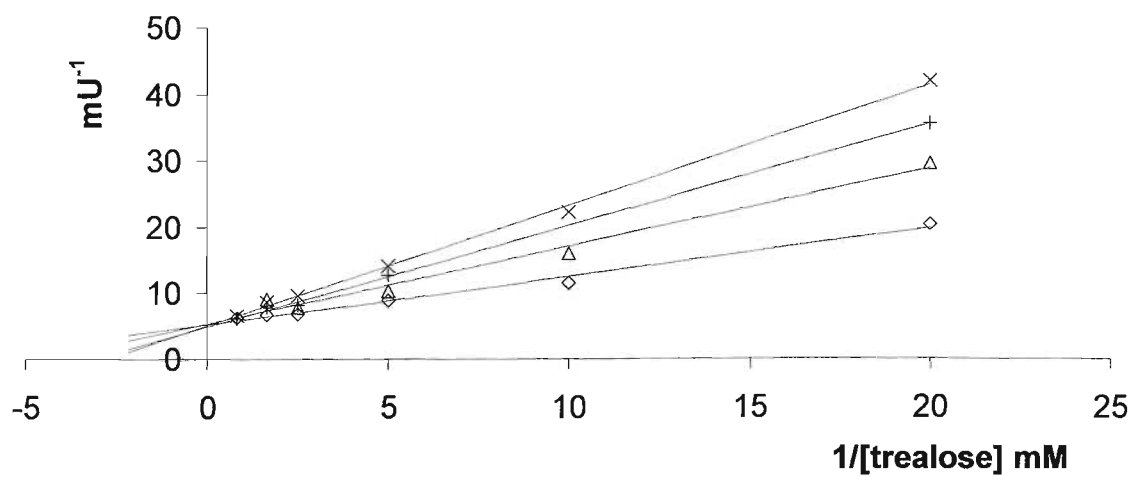
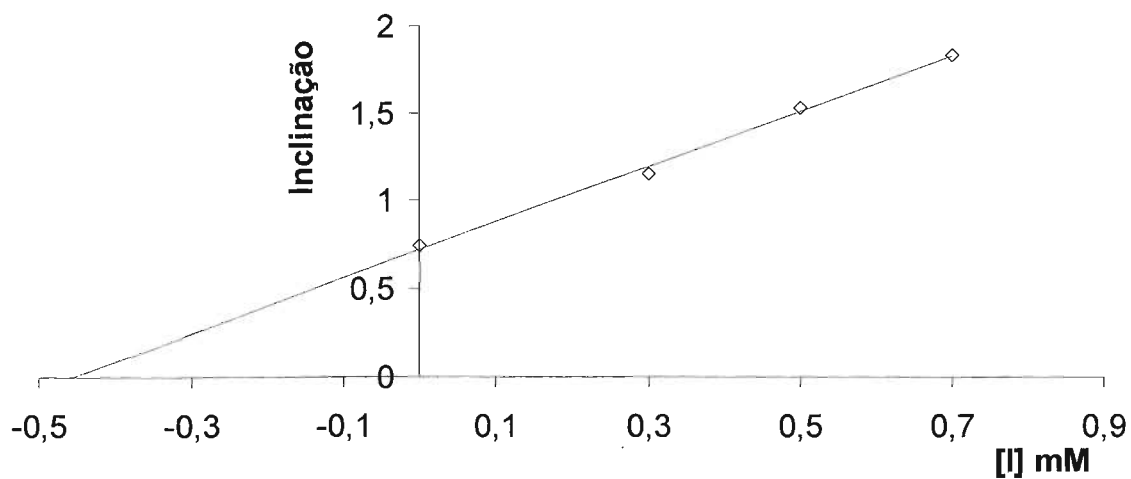


Figura 11. Inibição da trealase intestinal de *Tenebrio molitor* por Amigdalina. (A) Plote de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de inibidor ( $\diamond$  [0];  $\square$  [0,1];  $\Delta$  [0,3];  $+$  [0,7] mM). (B) Plote das inclinações obtidas no gráfico de Lineweaver-Burk contra as concentrações de Amigdalina utilizadas.

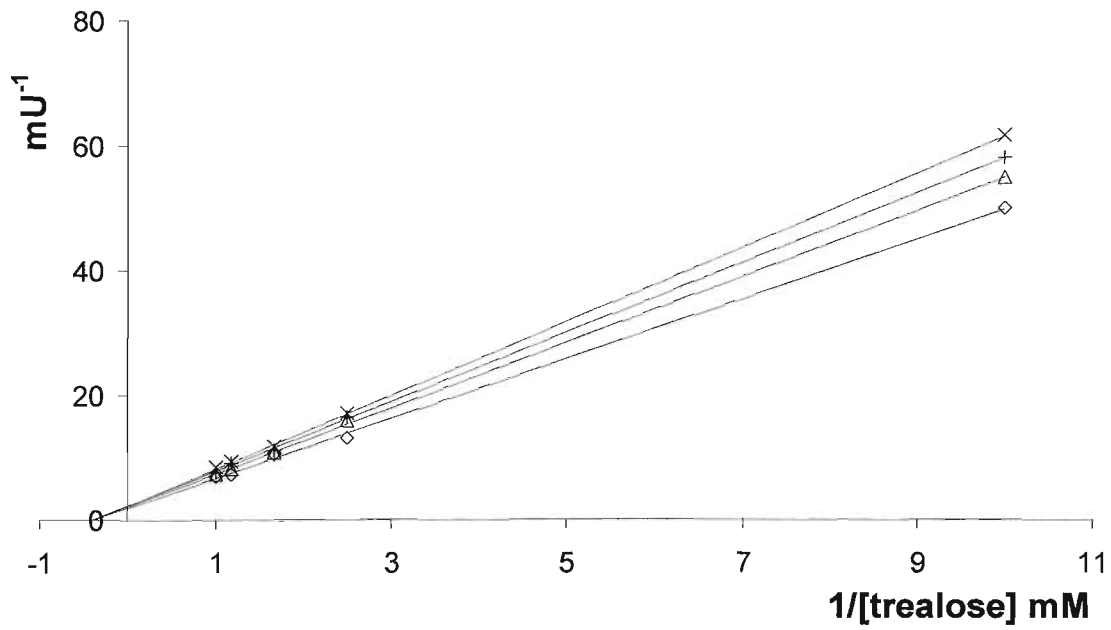


(A)

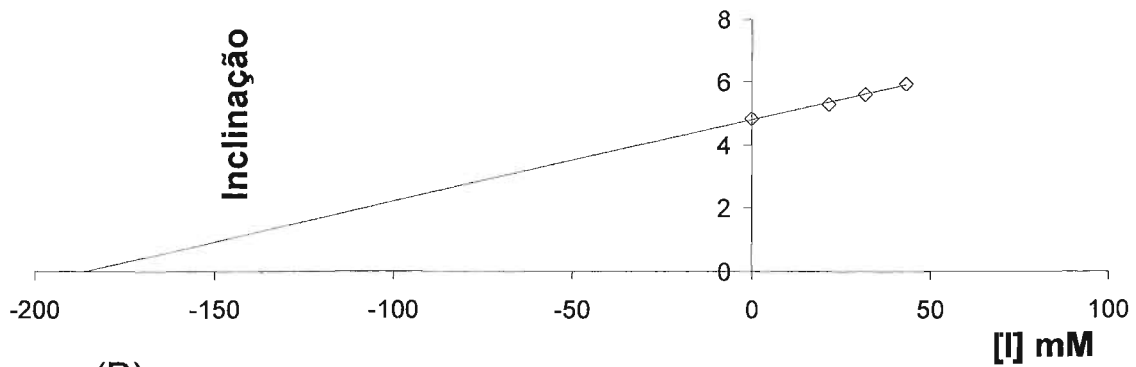


(B)

Figura 12. Inibição da trealase intestinal de *Tenebrio molitor* por Prunasina. (A) Plote de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de inibidor ( $\diamond$  [0];  $\square$  [0,1];  $\Delta$  [0,3]; + [0,7] mM). (B) Plote das inclinações obtidas no gráfico de Lineweaver-Burk contra as concentrações de Prunasina utilizadas.



(A)



(B)

Figura 13. Inibição da trealase intestinal de *Tenebrio molitor* por Salicina. (A) Plote de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de inibidor ( $\diamond$  [0];  $\Delta$  [21,66]; + [32]; x [43,33] mM). (B) Plote das inclinações obtidas no gráfico de Lineweaver-Burk contra as concentrações de Salicina utilizadas.

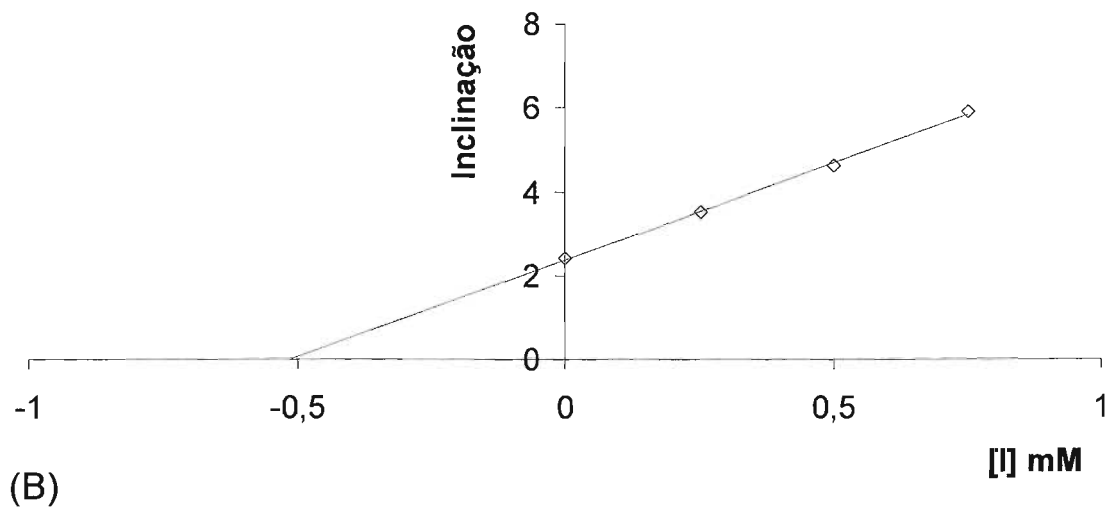
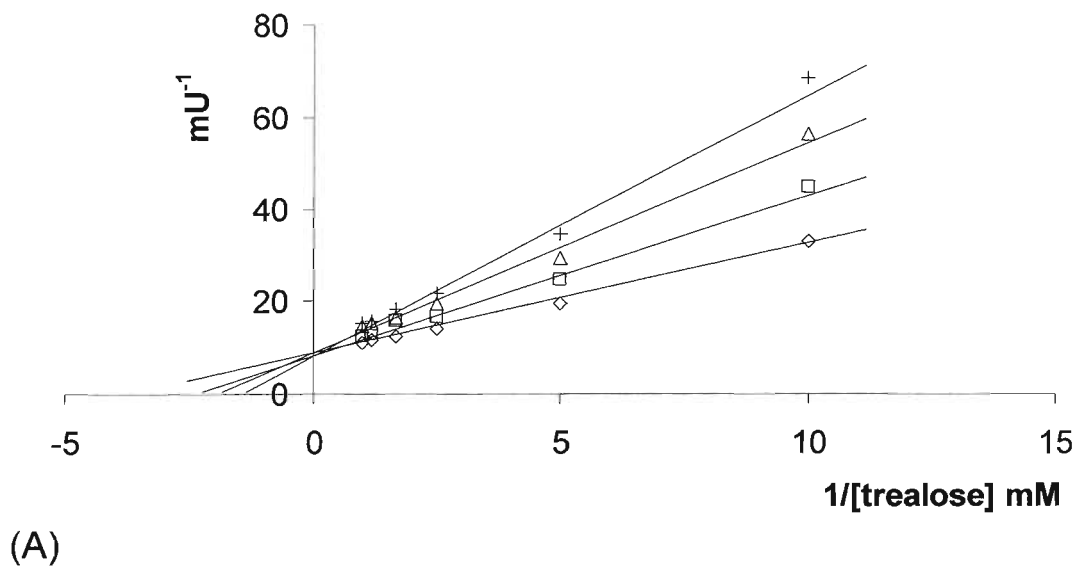
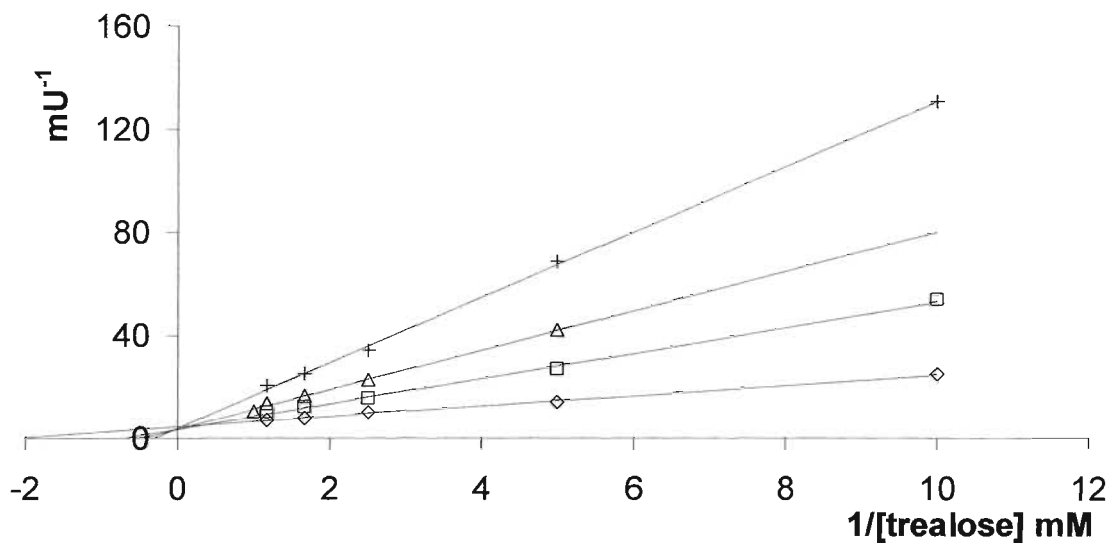
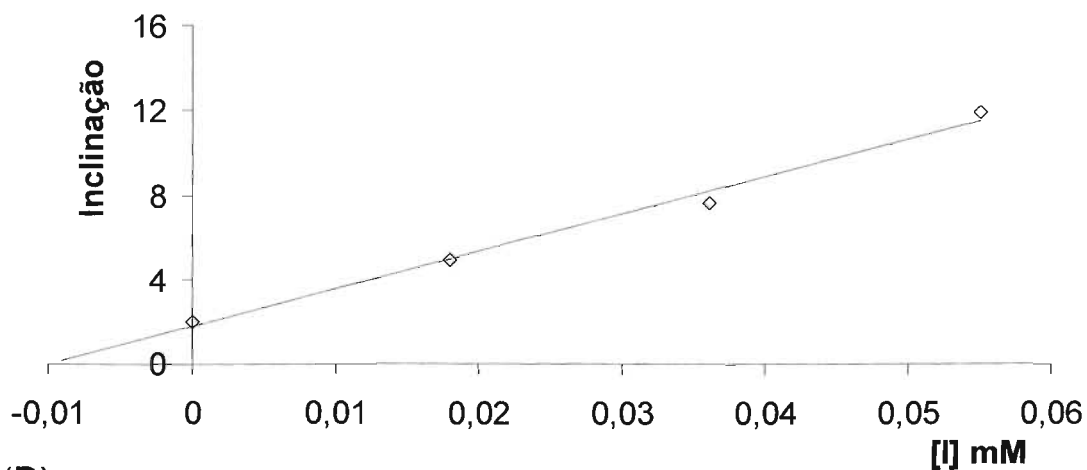


Figura 14. Inibição da trealase intestinal de *Tenebrio molitor* por Florizina. (A) Plote de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de inibidor ( $\diamond$  [0];  $\square$  [0,25];  $\Delta$  [0,5];  $+$  [0,75]; mM). (B) Plote das inclinações obtidas no gráfico de Lineweaver-Burk contra as concentrações de Florizina utilizadas.

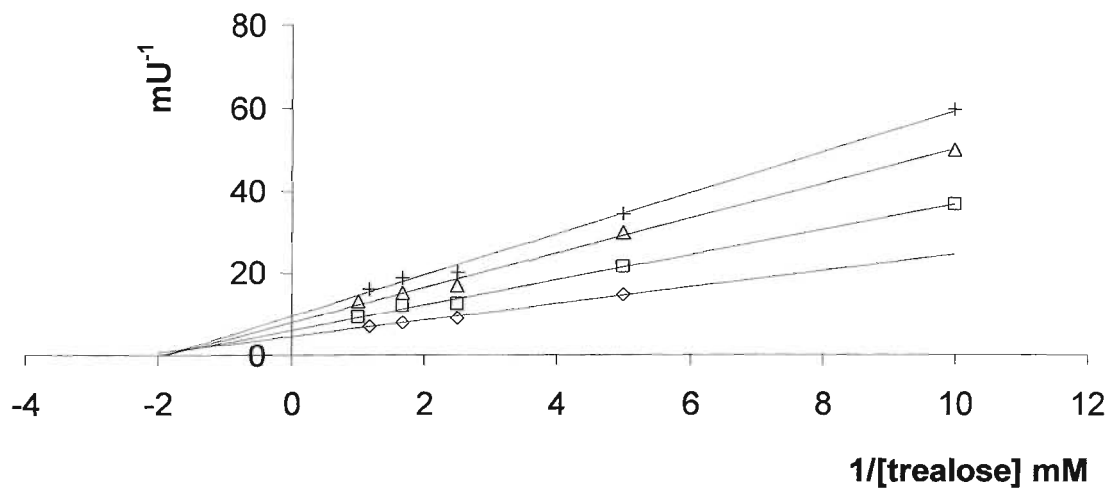


(A)

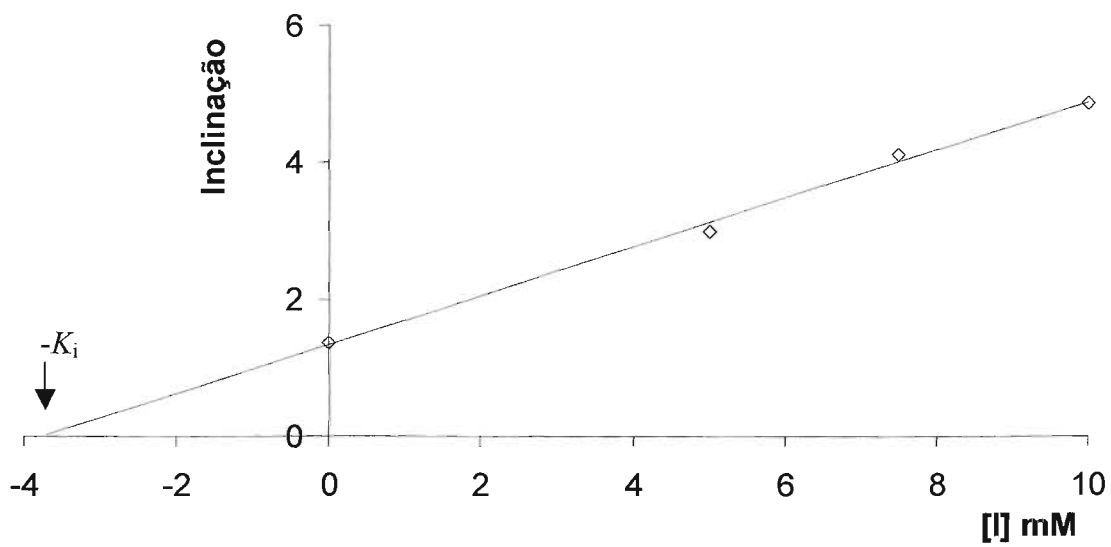


(B)

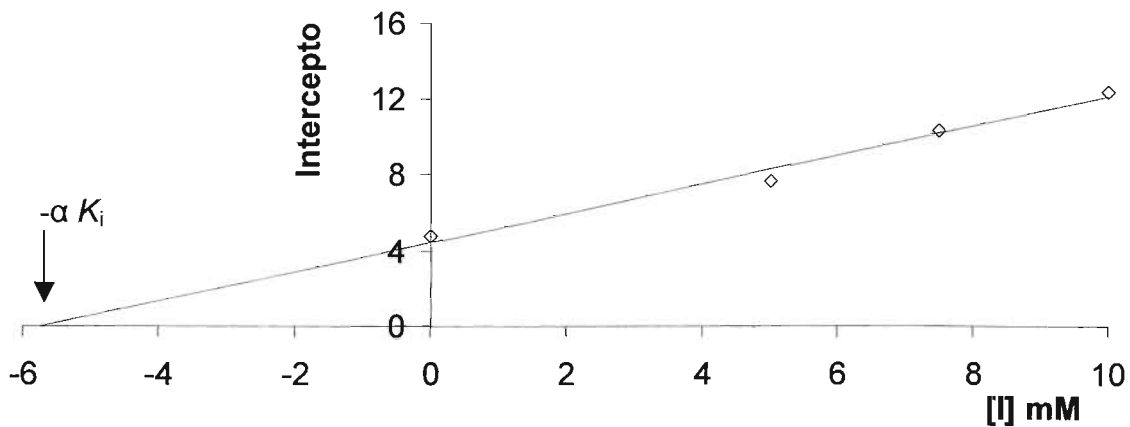
Figura 15. Inibição da trealase intestinal de *Tenebrio molitor* por Floretina. (A) Plote de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de inibidor ( $\diamond$  [0];  $\square$  [0,018];  $\Delta$  [0,036]; + [0,055]; mM). (B) Plote das inclinações obtidas no gráfico de Lineweaver-Burk contra as concentrações de Floretina utilizadas.



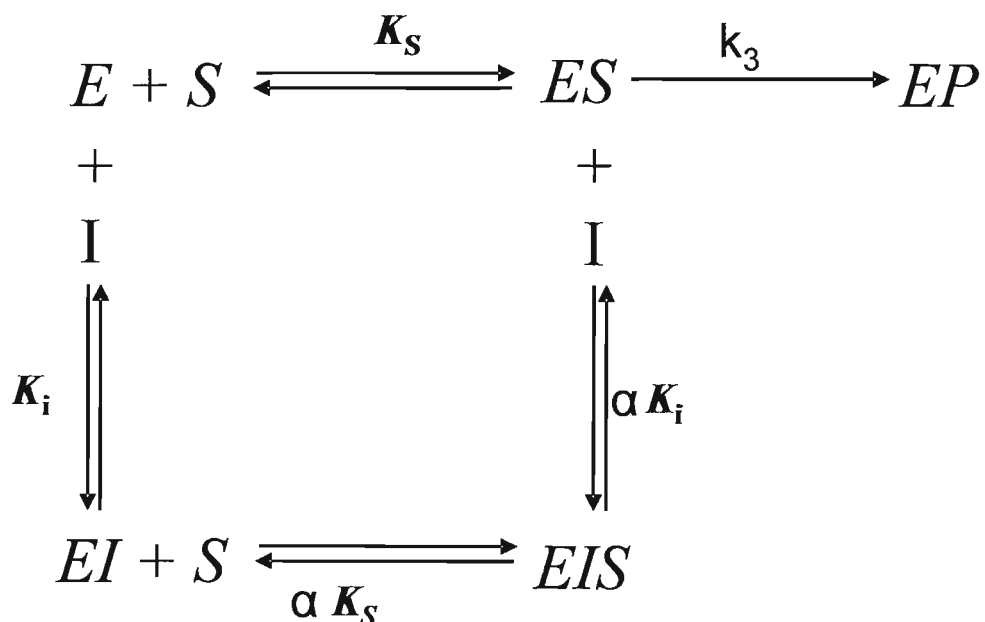
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 16. Inibição da trealase intestinal de *Tenebrio molitor* por Mandelonitrila. (A) Plote de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de inibidor ( $\diamond$  [0];  $\square$  [5];  $\Delta$  [7,5];  $+$  [10]; mM). (B) Plote das inclinações obtidas no gráfico de Lineweaver-Burk contra as concentrações de Mandelonitrila utilizadas. (C) Plote dos interceptos obtidos no gráfico de Lineweaver-Burk contra as concentrações de Mandelonitrila utilizadas. (D) Esquema cinético de um inibidor não competitivo linear misto.



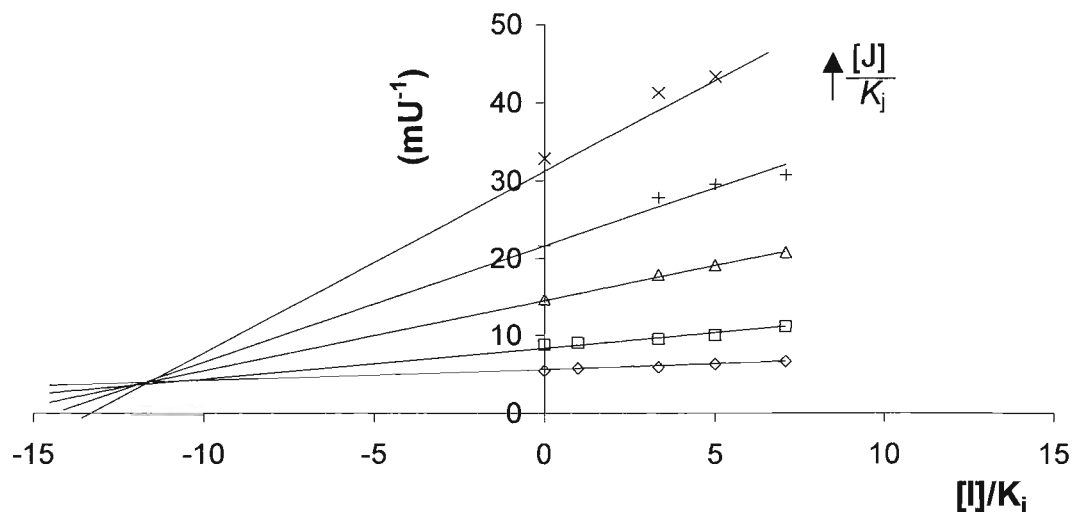
Após verificar o efeito de várias substâncias na atividade da trealase intestinal de *T. molitor*, algumas delas foram escolhidas para realizar os experimentos de inibição múltipla para mapear o sítio ativo da enzima. Foram selecionados inibidores de menor tamanho, que poderiam interagir ao mesmo tempo com a enzima.

Foram feitas inibições múltiplas utilizando dois inibidores competitivos (metil- $\alpha$ -manosídeo e floretina; glucono- $\delta$ -lactona e floretina; figuras 17 e 18 respectivamente) ou um inibidor competitivo (floretina ou metil- $\alpha$ -manosídeo) com o inibidor não competitivo misto mandelonitrila (figuras 19 e 20, respectivamente).

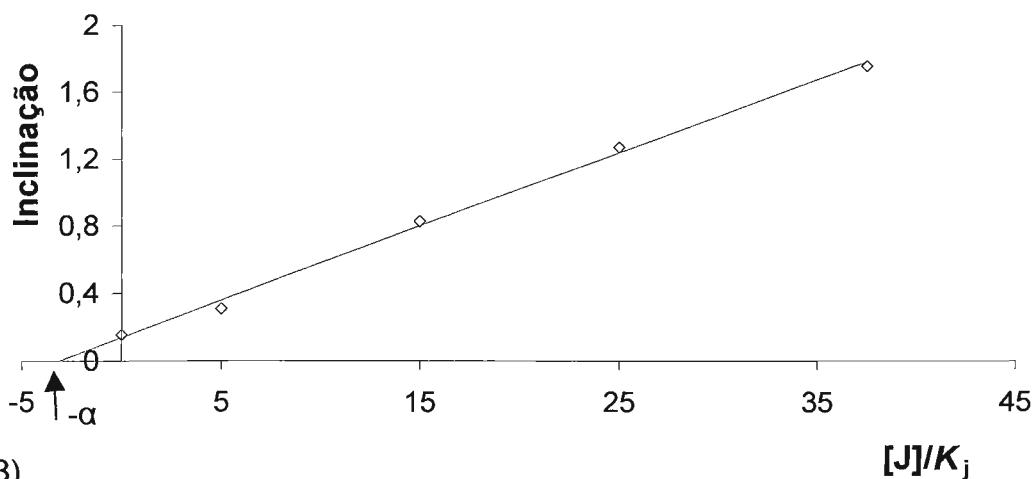
Quando dois inibidores são utilizados (I e J), o plote de  $1/v$  contra a concentração de um inibidor, utilizando diferentes concentrações do segundo inibidor resulta em um conjunto de retas paralelas ou interceptantes. Quando o conjunto de retas é paralelo, significa que os dois compostos não podem ligar-se ao mesmo tempo à enzima, indicando que eles interagem com o mesmo local na molécula protéica. Quando o conjunto de retas é interceptante os dois inibidores podem ligar-se concomitantemente à enzima. Nesse caso há um parâmetro que mede o quanto o fato de um dos inibidores estar ligado a enzima interfere na ligação do outro inibidor. Esse parâmetro assume valores iguais ou maiores que 1. Quando ele é 1, indica a ligação completamente independente das duas substâncias e quando maior o seu valor, mais próximos são os sítios de ligação das duas substâncias na enzima. Esse parâmetro é denominado  $\alpha$  quando se usa dois inibidores competitivos e  $\beta$  quando se estuda a interação de um inibidor competitivo e um não competitivo misto. Isso porque no competitivo misto o  $\alpha$  representa o quanto a ligação do substrato ou

do inibidor interfere na ligação do outro (Segel, 1975). Quando utilizou-se: metil- $\alpha$ -manosídeo e floretina (figura 17), glucono- $\delta$ -lactona e floretina (figura 18), mandelonitrila e floretina (figura 19) ou mandelonitrila e metil- $\alpha$ -manosídeo (figura 20) o padrão de retas foi interceptante, indicando ligação a regiões diferentes da enzima. Entretanto, a interação desses compostos com a enzima não é completamente independente, pois calculando-se o valor do parâmetro que representa o quanto a ligação de um dos compostos a enzima atrapalha a ligação do segundo composto ele foi sempre maior do que 1 (tabela 5).

Os resultados da inibição concomitante por glucono- $\delta$ -lactona e metil- $\alpha$ -manosídeo em plotes realizados como descrito acima resultaram em retas paralelas com  $\alpha = \infty$  (figura 21), portanto estes dois compostos se ligam à enzima na mesma região.



(A)



(B)

Figura 17. Inibição múltipla da trealase intestinal de *Tenebrio molitor* por metil- $\alpha$ -manosídeo (I) e floretina (J) a  $\diamond$  [0],  $\square$  [0,04],  $\Delta$  [0,12],  $+$  [0,2],  $\times$  [0,3] mM. (A) Plotes de  $1/v$  contra  $[I]/K_i$ . (B) Plotes das inclinações obtidas no gráfico (A) contra as concentrações de  $[J]/K_j$ .

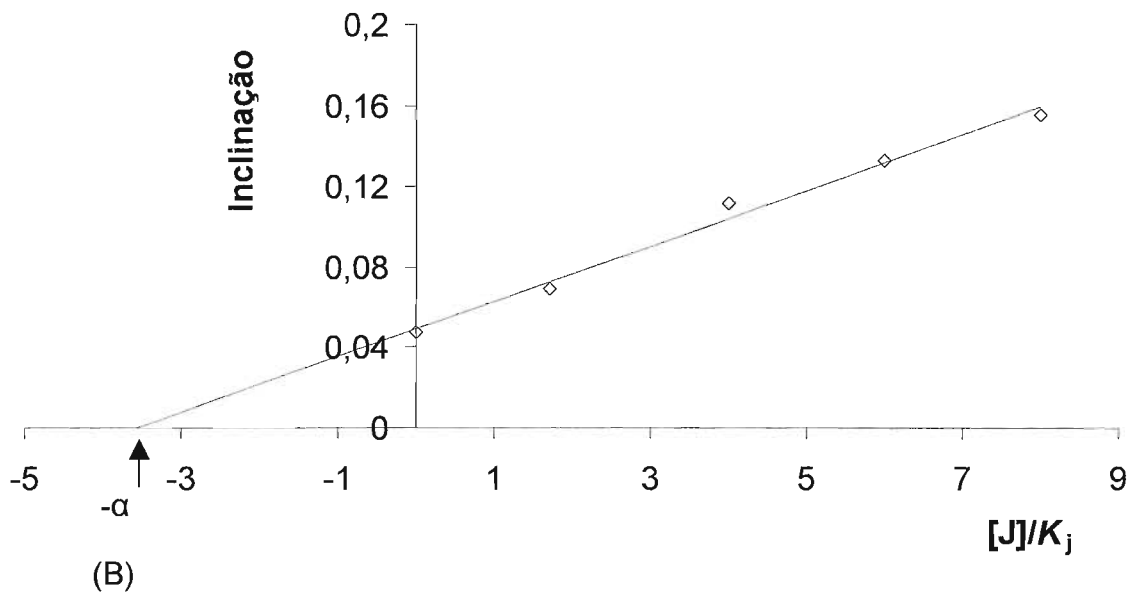
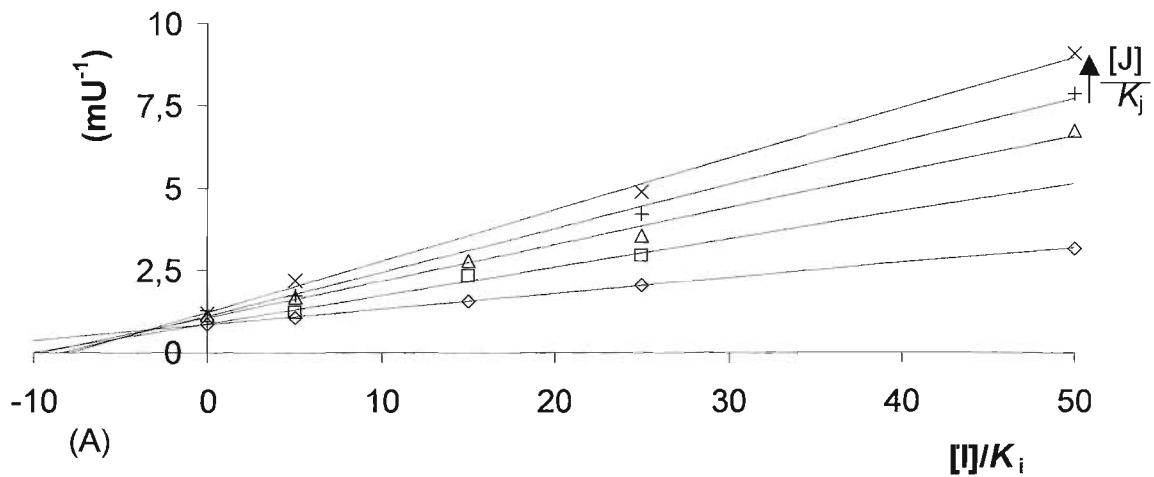


Figura 18. Inibição múltipla da trealase intestinal de *Tenebrio molitor* por foretina (I) e glucono- $\delta$ -lactona (J) a  $\diamond$  [0],  $\square$  [2,4],  $\Delta$  [5,6],  $+$  [8,4],  $\times$  [11,2] mM. (A) Plotes de  $1/v$  contra  $[I]/K_i$ . (B) Plotes das inclinações obtidas no gráfico (A) contra as concentrações de  $[J]/K_j$ .

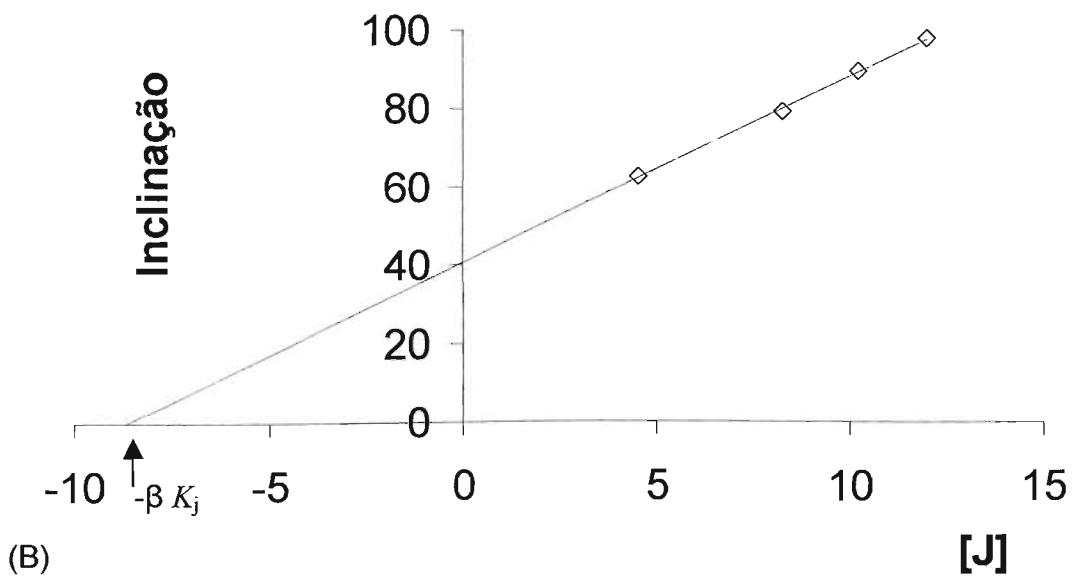
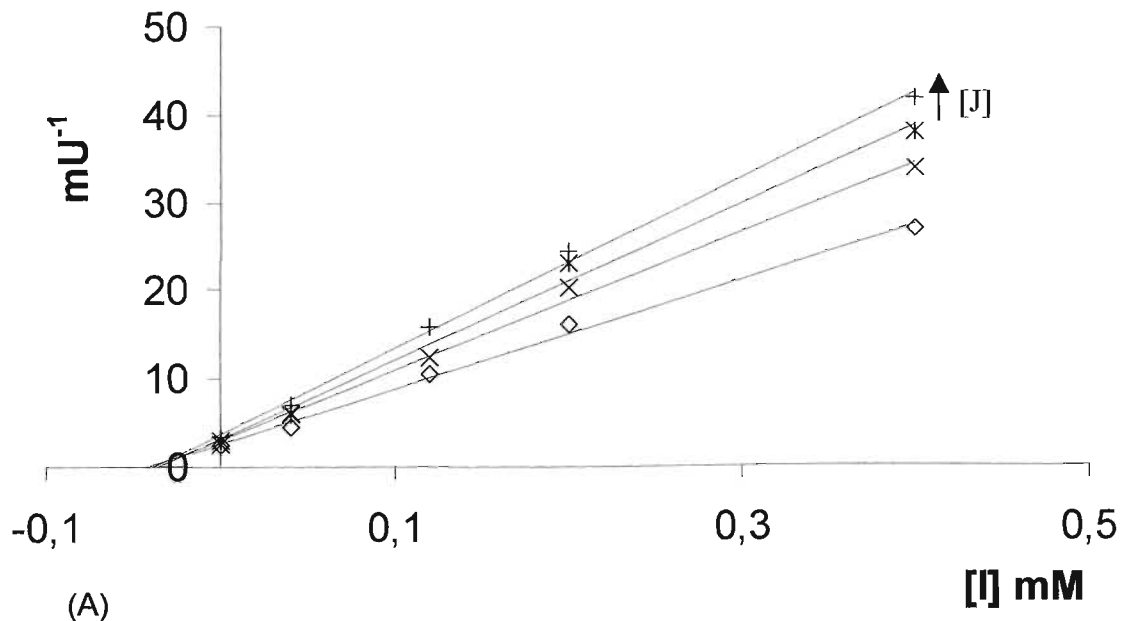


Figura 19. Inibição múltipla da trealase intestinal de *Tenebrio molitor* por fletetina (I) e mandelonitrila (J) a  $\diamond$  [4,5],  $\times$  [8,25],  $*$  [10,2],  $+$  [12] mM. (A) Plotes de  $1/v$  contra [I]. (B) Plotes das inclinações obtidas no gráfico (A) contra as concentrações de [J]

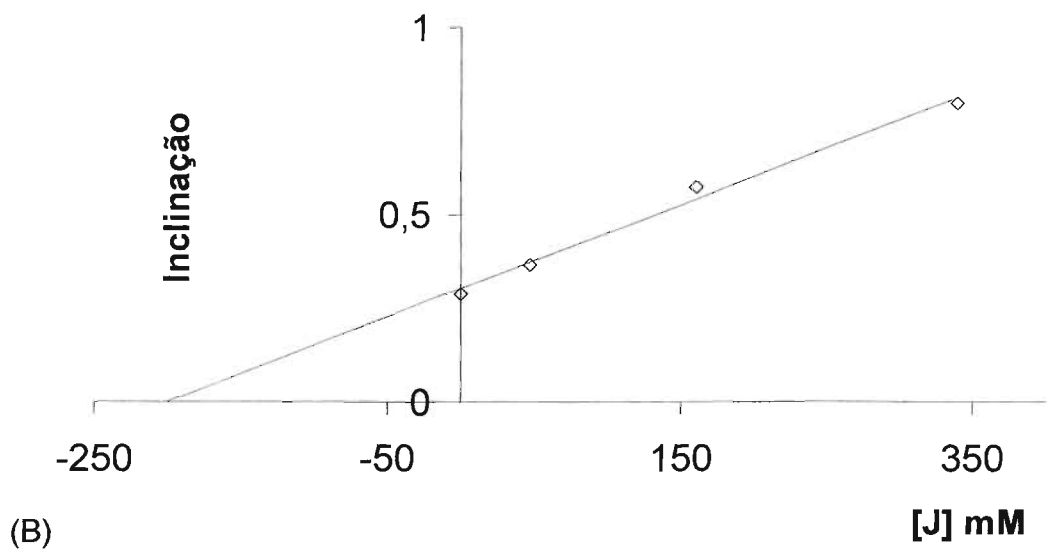
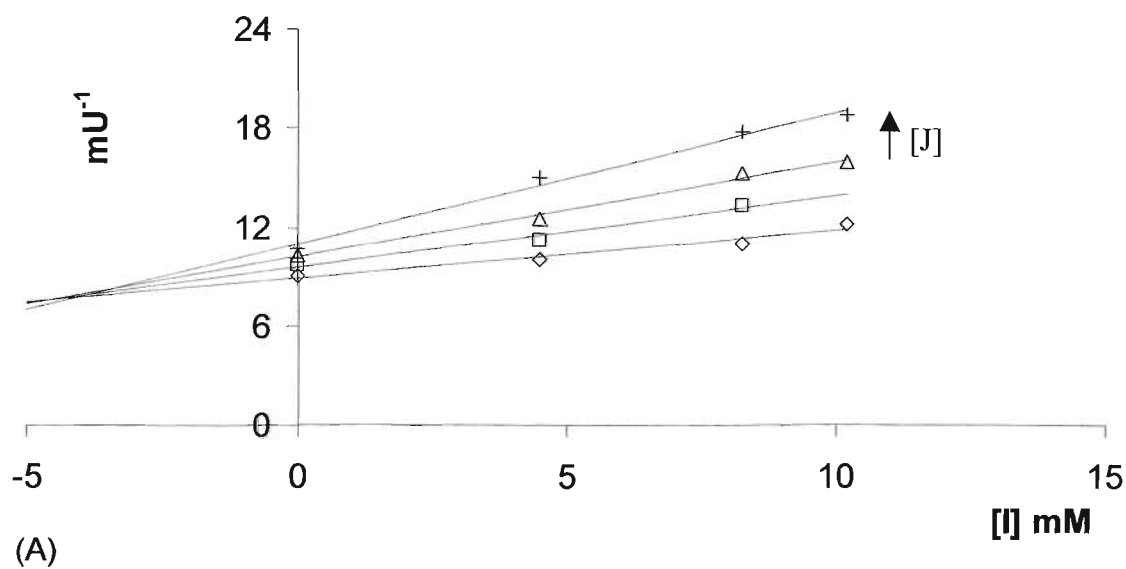


Figura 20. Inibição múltipla da trealase intestinal de *Tenebrio molitor* por mandelonitrila (I) e metil- $\alpha$ -manosídeo (J) a  $\diamond$  [0],  $\square$  [48],  $\Delta$  [160], + [340] mM. (A) Plotes de  $1/v$  contra [I]. (B) Plotes das inclinações obtidas no gráfico (A) contra as concentrações de [J].

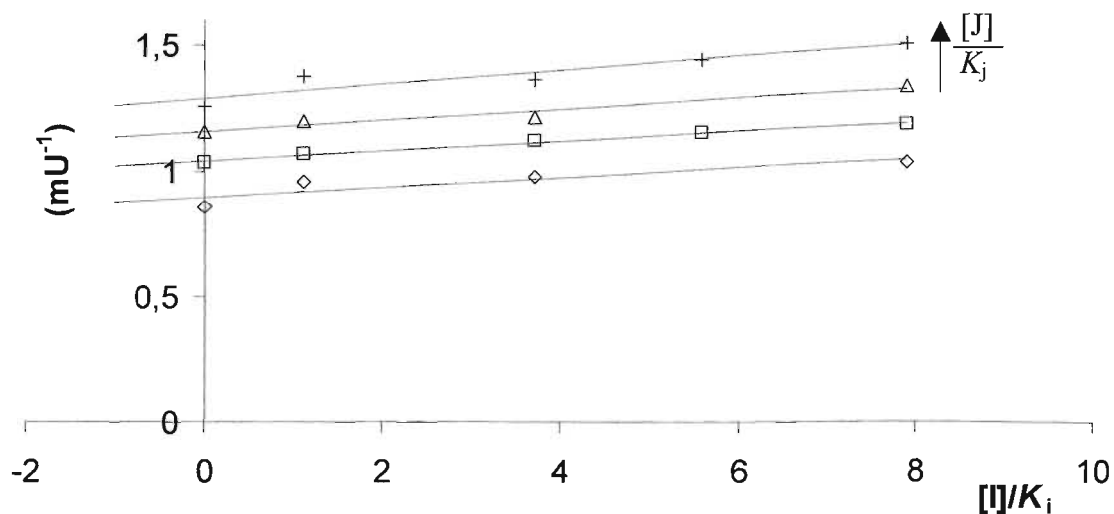


Figura 21. Inibição múltipla da trealase intestinal de *Tenebrio molitor* por (I) metil- $\alpha$ -manosídeo e glucono- $\delta$ -lactona (J) a  $\diamond$  [0],  $\square$  [2,4],  $\Delta$  [5,6], + [8,4] mM

<b><i>Inibidores</i></b>	<b><i>Tipo de inibidor</i></b>	<b><i>Fator Interferência</i></b>
Metil- $\alpha$ -manosídeo e Floretina	Competitivos	3,12
Glucono- $\delta$ -lactona e Floretina	Competitivos	3,57
Mandelonitrila e Floretina	Não competitivo Competitivo	2,27
Mandelonitrila e Metil- $\alpha$ -manosídeo	Não competitivo Competitivo	1,21
Glucono- $\delta$ -lactona e Metil- $\alpha$ -manosídeo	Competitivos	$\infty$

Tabela 5. Valores obtidos para o parâmetro que mede a interferência que um inibidor ligado à enzima causa na ligação do outro.

#### 4.4 Detecção de aminoácidos importantes para a atividade enzimática

Para verificar os resíduos de aminoácidos que afetam a atividade da enzima, foram realizados experimentos de modificação química, ou do efeito de EDTA. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 6.

<b>Composto</b>	<b>Grupo Afetado</b>	<b>Resultado</b>	<b>Ordem de reação em relação ao modificador</b>
Dietilpirocarbonato	Imidazol	Afeta atividade	1,20
Fenilglioxal	Guanidino	Afeta atividade	0,83
Carbodimida	Carboxila	Afeta atividade	0,80
Tetranitrometano	Fenol	Não tem efeito	-----
N-bromo-succinamida	Triptofano	Não tem efeito	-----
EDTA	Cátion divalente	Não tem efeito	-----
<i>p</i> -hidroximercuribenzoato	Sulfidrila	Não tem efeito	-----

Tabela 6. Efeito de diferentes substâncias na atividade da trealase de *Tenebrio molitor*.



DEPC pode reagir com o grupo Imidazol presente na histidina e também com cisteína e tirosina. Foi feita modificação da trealase na presença de *p*-hidroximercuribenzoato e Tetranitrometano, que são reagentes específicos para grupos sulfidríla e fenol, respectivamente. Nesses experimentos não houve decréscimo na atividade enzimática, enquanto o experimento de modificação química com DEPC realizado nas condições máximas que o reagente permite (40 minutos de modificação e 40 mM de DEPC) (Roosemont, 1978) levou a uma queda de aproximadamente 50 % da atividade enzimática, com um  $k_{obs}$  de  $1,19 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (figura 22 A). Quando a enzima foi incubada com DEPC na presença de trealose (numa concentração igual a  $10 K_m$ ) e na presença dos inibidores: metil- $\alpha$ -manosídeo, glucono- $\delta$ -lactona, mandelonitrila e floretina mais metil- $\alpha$ -manosídeo (numa concentração igual a  $10 K_i$  de cada inibidor) houve proteção total da inativação por DEPC. A presença de floretina numa concentração igual a  $10 K_i$  não afetou a inativação da enzima (figura 22 B). O sítio ativo da trealase contém um só resíduo de histidina importante para sua atividade, uma vez que a ordem de reação em relação ao modificador, calculada a partir dos resultados apresentados na figura 22 C é de 1.2.

Tentamos determinar o  $pK$  do grupo modificado por DEPC. Para isto, fizemos modificações da trealase por DEPC em pHs que variaram de 5 a 7 e não houve alteração na quantidade de enzima modificada conforme alterava-se o pH. Não foi possível realizar a modificação em valores maiores de pH porque a estabilidade do DEPC decresce em valores de pH acima de 7, sendo estável só os primeiros 10 minutos. Além disso, sua especificidade para reagir com resíduos de histidina diminui (Kinnunen *et. al* 1988).

A fim de evidenciar o papel do resíduo de histidina na atividade da trealase, os p*K*s de grupos envolvidos em catalise foram determinados após a enzima ser modificada por DEPC. Os resultados obtidos foram  $pK_{e1} = 4,8 \pm 0,2$  ;  $pK_{e2} = 7,3 \pm 0,1$  ;  $pK_{es1} = 4,1 \pm 0,1$  ;  $pK_{es1} = 7,0 \pm 0,1$  (figura 23).

Foi determinado o  $K_m$  da enzima após modificação com DEPC a pH 6. A enzima modificada apresentou o mesmo  $K_m$  ( $K_m = 0,46 \pm 0,05$ ) que a enzima não modificada ( $K_m = 0,43 \pm 0,03$ ). Por outro lado, a  $V_{max}$  da enzima modificada (0,32 mU) diminuiu aproximadamente 50 % em relação a enzima nativa (0,67 mU).

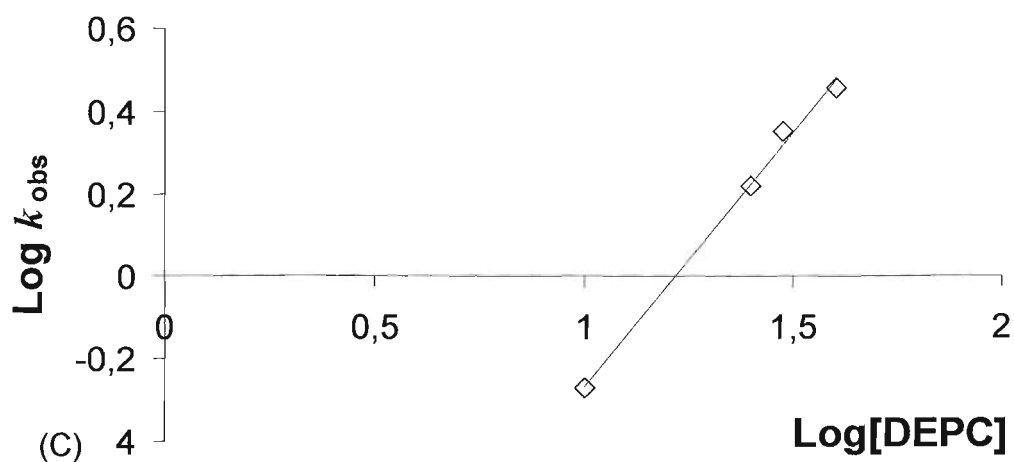
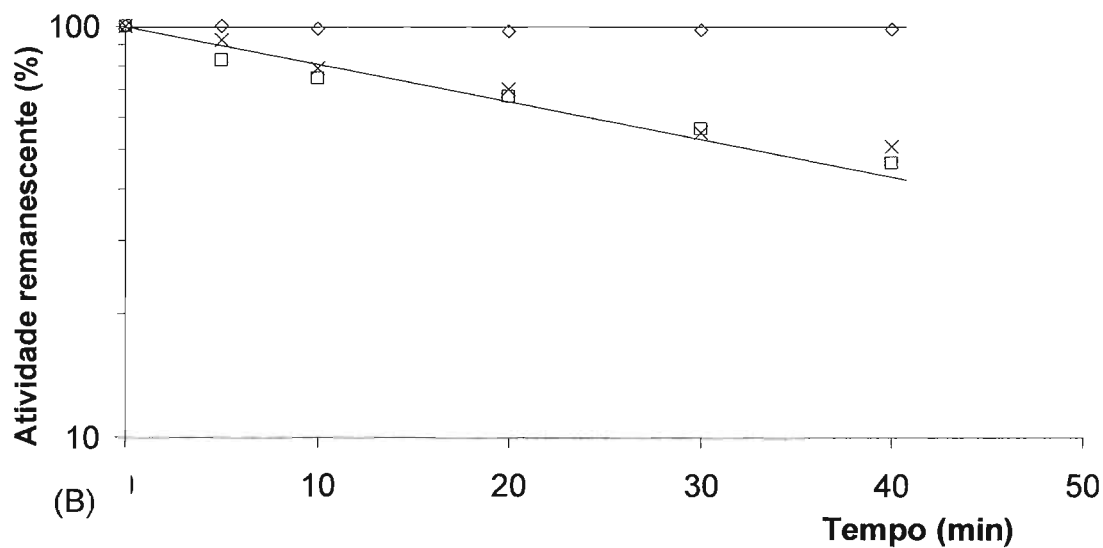
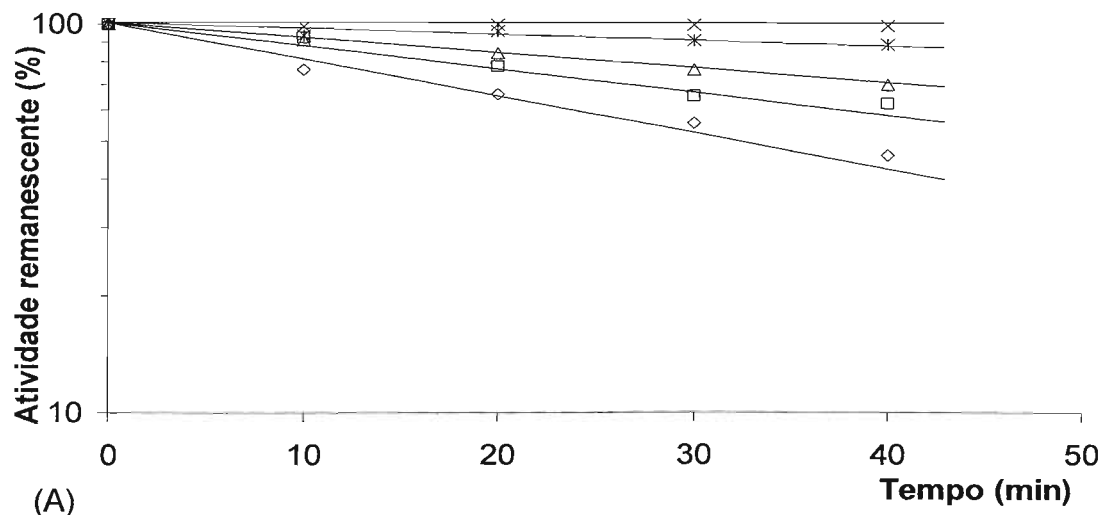
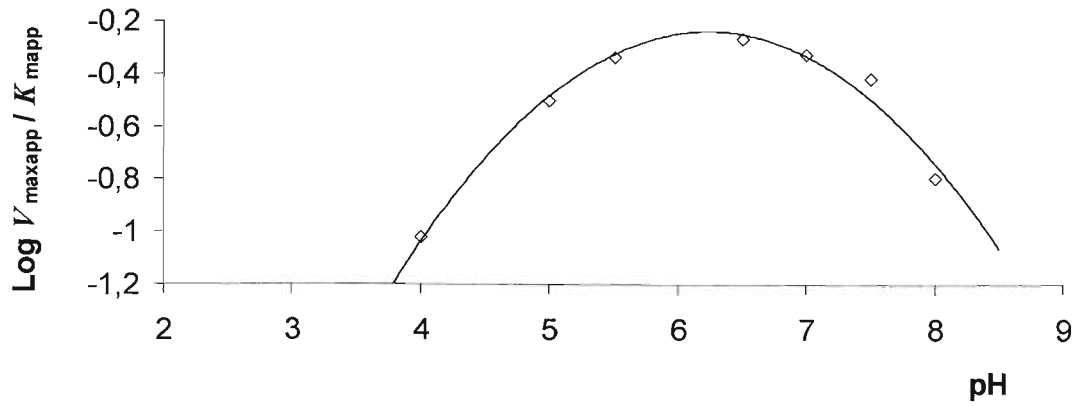
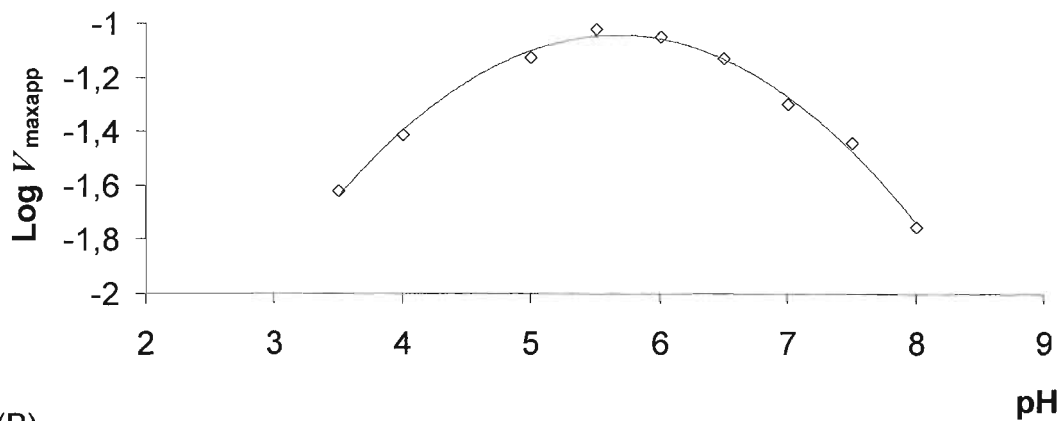


Figura 22. Modificação da trealase intestinal de *T. molitor* por DEPC. (A) Atividade remanescente após diferentes concentrações de DEPC ( $\diamond$  [40],  $\square$  [30],  $\Delta$  [25],  $*$  [10],  $\times$  [0] mM) em diferentes tempos. (B) Modificação realizada na ausência  $\square$  ou presença  $\diamond$  de trealose e floretina  $\times$ . (C) Logaritmo de  $k_{obs}$  contra logaritmo das concentrações de DEPC utilizadas, a inclinação desta reta corresponde ao número de moléculas do modificador que se ligam à enzima ( $n = 1,2$ ).



(A)



(B)

Figura 23. Efeito do pH na atividade da trealase intestinal de *T. molitor* após modificação por DEPC. (A) Efeito do pH no  $V_{\max\text{app}}/K_m$  para a determinação do  $pK_{e1}$  e  $pK_{e2}$ . (B) Efeito do pH no  $V_{\max\text{app}}$  para a determinação do  $pK_{es1}$  e  $pK_{es2}$ .

A trealase de *T. molitor* também é modificada por Fenilglioal, obtendo-se um decréscimo na atividade enzimática de aproximadamente 90 % para uma concentração de 20 mM de Fenilglioal com  $k_{obs}$  de  $1,63 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (figura 24 A). A reação de modificação foi realizada em pH 8,0. Neste pH o reagente torna-se específico para o grupo guanidino. A inativação por Fenilglioal é protegida por trealose numa concentração igual a  $10 K_m$  e é parcialmente protegida tanto por floretina como por metil- $\alpha$ -manosídeo em concentrações iguais a  $10 K_i$  de cada inibidor (figura 24 B). No entanto, quando a enzima é incubada com floretina mais metil- $\alpha$ -manosídeo observa-se proteção total da enzima. A ordem de reação em relação ao modificador é de 0,83 indicando que a trealase intestinal de *T. molitor* contém um só resíduo de arginina importante para sua atividade catalítica (figura 24 C). O  $pK$  do grupo modificado por fenilglioal foi determinado na faixa de pH entre 7 e 8,3. Não pudemos estudar uma extensão maior de pHs porque o fenilglioal é específico para arginina somente acima de pH 7 (Takahashi, 1968) e a atividade enzimática é estável somente até pH 8,25. O  $pK$  calculado para este grupo através de modificação química é  $7,5 \pm 0,2$  (Figura 25). O valor de  $pK$  e a curva apresentada na figura 25 foram calculados com o Software Enzfitter.

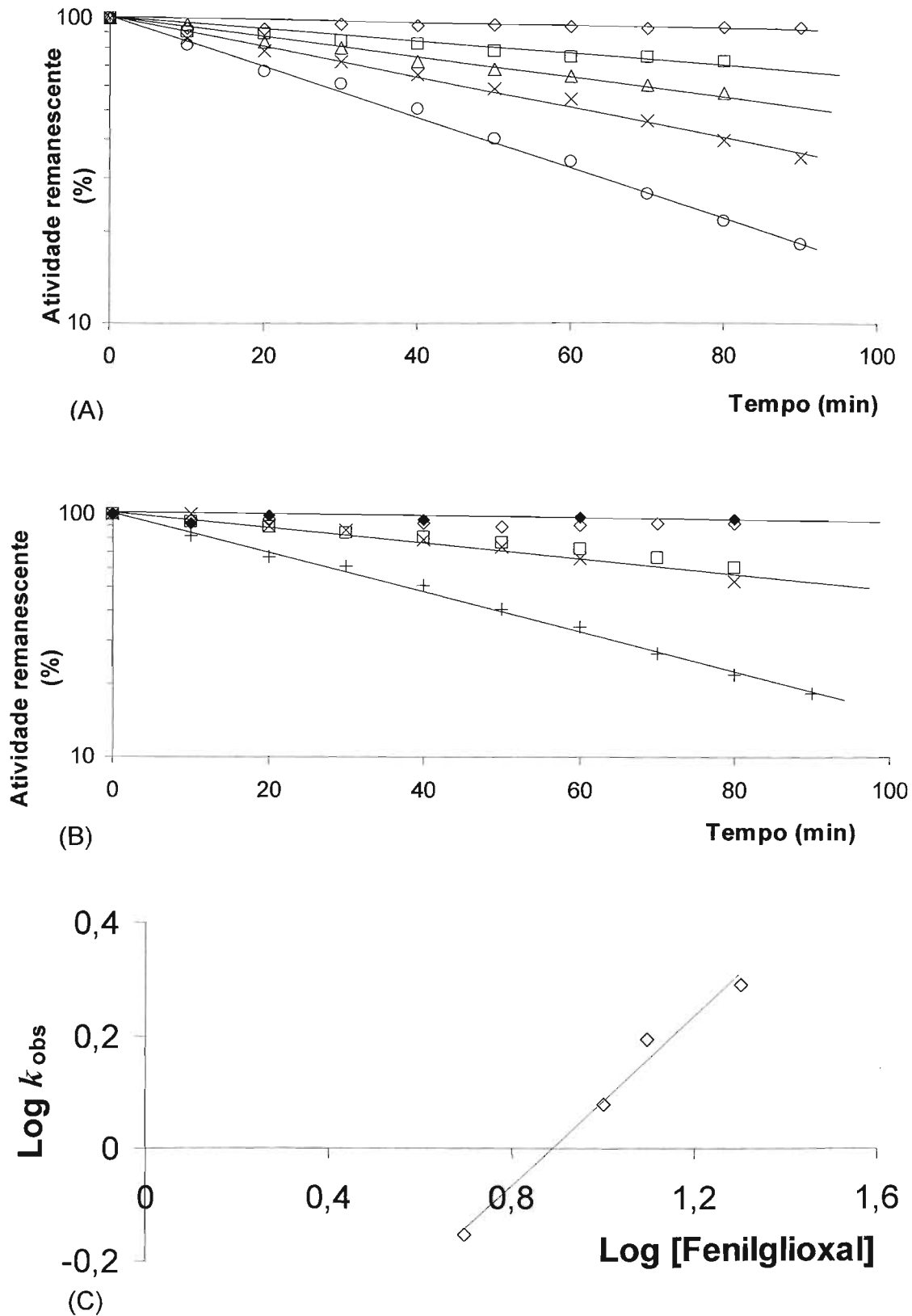


Figura 24. Modificação da trealase intestinal de *T. molitor* por Fenilgloxal. (A) Atividade remanescente após incubação com diferentes concentrações de Fenilgloxal (◇ [0], □ [5], Δ [10], x [12,5], ○ [20] mM) em diferentes tempos. (B) Modificação realizada na ausência + ou presença de Trealose ◇, floretina x, metil- $\alpha$ -manosídeo □ e floretina mais metil- $\alpha$ -manosídeo ◆. (C) Logaritmo de  $k_{obs}$  contra logaritmo das concentrações de Fenilgloxal utilizadas, a inclinação desta reta corresponde ao número de moléculas do modificador que se ligam à enzima  $n = 0,83$ .

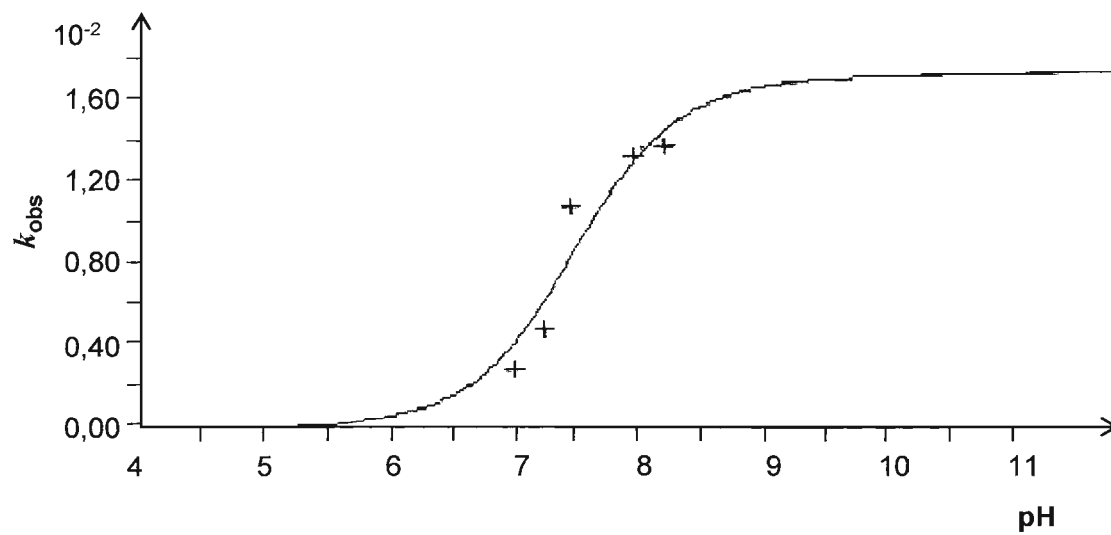
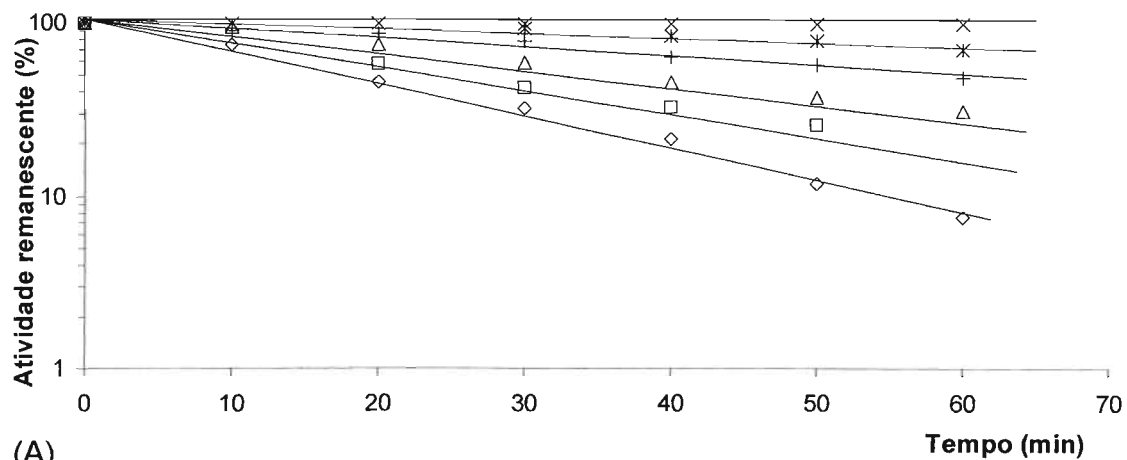


Figura 25. Efeito do pH na inativação da trealase intestinal de *T. molitor* por Fenilgloxal.

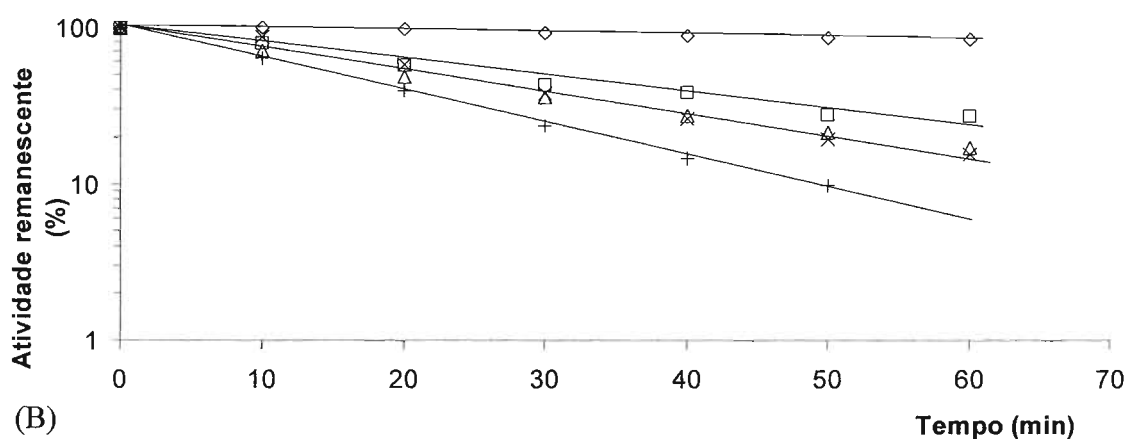
Quando a enzima é incubada com EDC em uma concentração de 15 mM há um decréscimo de aproximadamente 90 % em sua atividade com um  $k_{\text{obs}}$  igual a  $3,9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (figura 26 A). A inativação da enzima por EDC é completamente protegida por trealose em uma concentração igual a  $10 K_m$  e é parcialmente protegida na presença dos inibidores competitivos: metil- $\alpha$ -manosídeo, floretina e metil- $\alpha$ -manosídeo mais floretina ( figura 26 B). Foi determinada a ordem de reação em relação ao modificador EDC e verificou-se que o sítio ativo da trealase de *T. molitor* contém um só resíduo de carboxila importante para sua atividade, uma vez que a ordem de reação em relação ao modificador é próximo de 1 (0,8) (figura 26 C). O  $pK$  do carboxilato calculado pelo Software Enzfitter após modificação por EDC em vários pHs foi de  $3,5 \pm 0.3$  (figura 27)

Conforme comentado anteriormente, a trealase de *T. molitor* não possui resíduos de tirosina importantes para a atividade catalítica. Isso também é verdadeiro para resíduos de triptofano, uma vez que incubação da enzima com NBS não alterou sua atividade. A enzima também aparentemente não depende de cátions divalentes, pois sua incubação com EDTA não causou alteração na atividade. Ela não possui um resíduo de cisteína, pois não foi afetada por *p*-hidroximercuribenzoato.

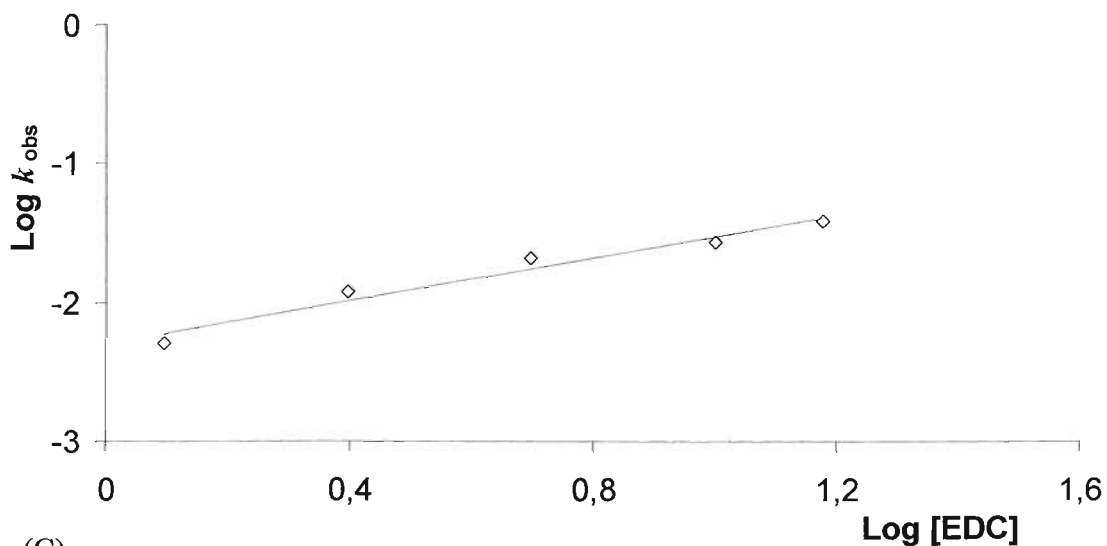




(A)



(B)



(C)

Figura 26. Modificação da trealase intestinal de *T. molitor* por EDC. (A) Atividade remanescente após diferentes concentrações de EDC ( $\diamond$  [15],  $\square$  [10],  $\Delta$  [5], +[2,5], \* [1,25] x[0] mM) em diferentes tempos. (B) Modificação realizada na ausência + ou presença de trealose  $\diamond$ , floretina x, metil- $\alpha$ -manosídeo  $\Delta$  e floretina mais metil- $\alpha$ -manosídeo  $\square$ . (C) Logaritmo de  $k_{obs}$  contra logaritmo das concentrações de EDC utilizadas, a inclinação desta reta corresponde ao número de moléculas do modificador que se ligam à enzima  $n = 0,8$ .

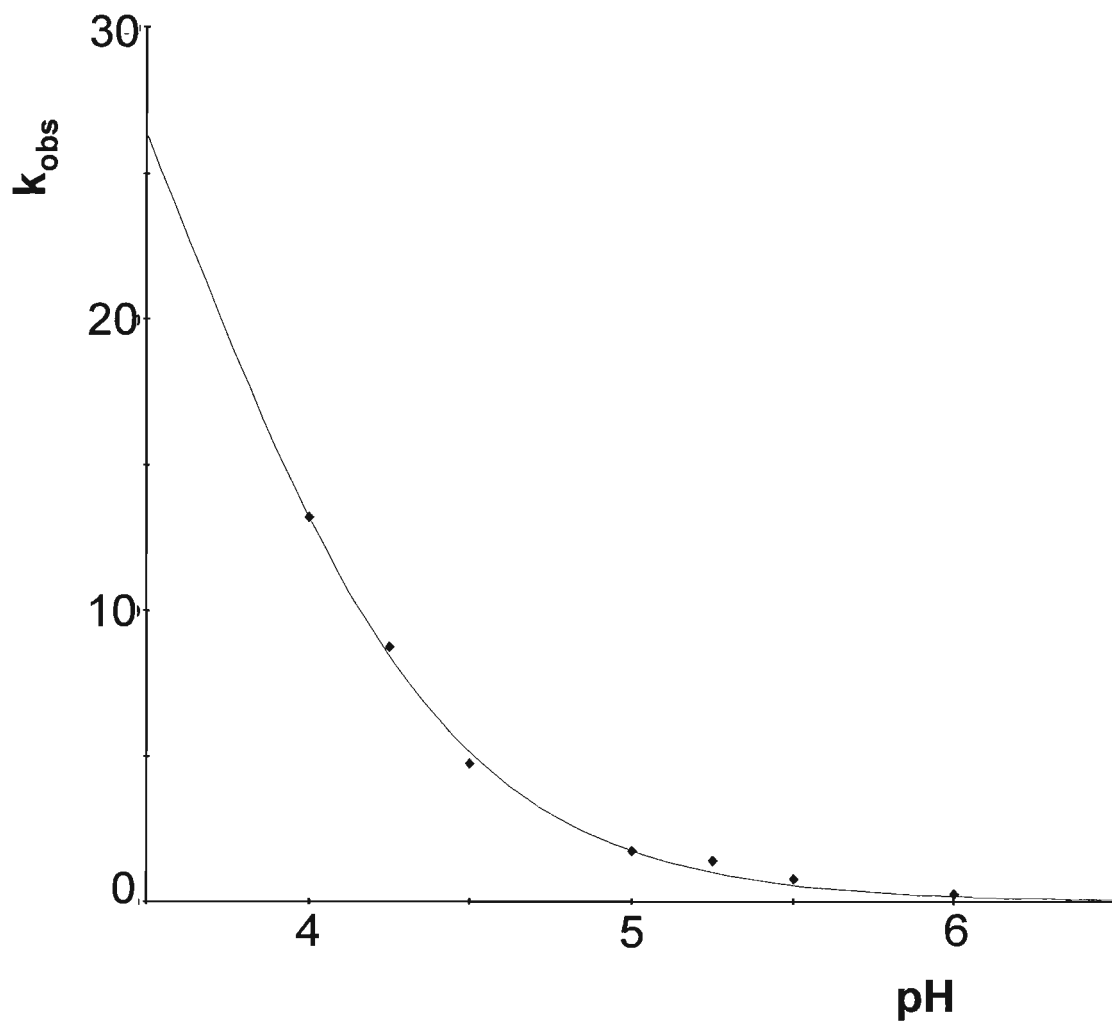


Figura 27. Efeito do pH na inativação da trealase intestinal de *T. molitor* por EDC.

#### **4.5 Clonagem e seqüenciamento do cDNA que codifica a trealase intestinal de *Tenebrio molitor***

O rendimento obtido para o RNA total extraído do epitélio do intestino médio de 40 larvas de *T. molitor* foi de 0,077 mg, com um coeficiente  $A_{260}/A_{280} = 1,95$ . Este valor de coeficiente garante a qualidade do RNA para RT-PCR (Sambrook et al.,1989). 10 % do RNA total foi submetido a reação com a transcriptase reversa usando um iniciador degenerado para obtenção do cDNA, o qual foi utilizado como molde nos diferentes PCR realizados. Todos os fragmentos de DNA derivados da amplificação por PCR com os diferentes iniciadores, foram extraídos diretamente do gel de agarose e ligados ao plasmídeo pGEM-T. Com os produtos destas ligações foram transformadas células competentes de *E. coli* XL-1 blue, as quais foram cultivadas em placas de ágar LB-Amp IPTG/Xgal. As colônias transformadas foram selecionadas, crescidas em meio LB líquido e submetidas a mini-prep para extração dos plasmídeos. Para verificar se esses plasmídeos continham o fragmento de PCR clonado foi feita uma digestão com a enzima EcoRI (figura 28). Os plasmídeos que continham o fragmento clonado foram então seqüenciados usando os iniciadores T7 e Sp6.

Inicialmente realizou-se PCR utilizando os iniciadores específicos desenhados a partir da seqüência da trealase presente na glândula sexual do macho de *T. molitor* (TREGSMFW e TREGSMRV). Após eletroforese em gel de agarose, verificamos a presença de uma banda de cerca de 1000 pb (figura 28 A). O material presente nesse gel foi eluído, tratado como descrito acima e seqüenciado. Por comparação com dados depositados em bancos verificamos

que a seqüência obtida correspondia a um fragmento interno do gene da trealase.

Para aumentarmos a porção do cDNA da trealase seqüenciada, utilizamos os iniciadores Q+T e TREGSMFW, poli T e TREGSMRV (desenhados como mencionado acima) nos PCR. Com os dois primeiros iniciadores foi possível obtermos um fragmento de 1500 pb (figura 28 B), que após seqüenciamento mostrou ser correspondente à porção codificante da parte carboxi-terminal da proteína. O segundo conjunto de iniciadores utilizados (poli T e NTERGSMRV) não nos permitiu obter a região correspondente ao N-terminal da proteína. A seguir dois procedimentos foram realizados com o intuito de obter a seqüência 3'. Um deles envolveu o desenho de iniciadores específicos, tendo como base a seqüência obtida anteriormente. Primeiro foi feito o PCR com os iniciadores poli T e NTER24RV1 e após de obter-se e seqüenciar-se um produto de 1500 pb, novo iniciador foi desenhado (NTER24RV2), com base na seqüência mais próxima a extremidade 3'. Após o PCR, obtivemos um fragmento de 750 pb (figura 28C). Embora os dois fragmentos correspondessem a cDNA relativos a trealases, não foi possível obter a seqüência correspondente ao N-terminal da proteína. Tentamos então fazer um "RACE" com iniciador específico para enriquecer a preparação com cDNA correspondente a trealase. Após análise dos resultados não foi possível encontrar o códon de iniciação nem o peptídeo sinal.

A seqüência de cDNA obtida foi traduzida para seqüência de proteína e submetida ao programa BLAST (NCBI) para ser comparada com outras seqüências de trealases depositadas nessa base de dados e o resultado obtido nos permitiu inferir que tínhamos conseguido a seqüência madura. Finalmente,

o cDNA completo foi obtido por PCR utilizando iniciadores específicos correspondentes as porções 3' e 5' do gene denominados TREX3C e TREX5N respectivamente, obtendo-se um fragmento de 1900 pb (figura 28 D). Este fragmento de cDNA correspondeu a seqüência que codifica a trealase madura (A estratégia de clonagem e sequenciamento estão apresentadas na figura 3 em materiais e métodos).

A seqüência de cDNA obtida contém 1991 pb que codificam um polipeptídeo de 536 aminoácidos (figura 29). Esta proteína apresenta massa molecular prevista de 61 kDa e não possui sítios de ligação de âncoras do tipo GPI para inserção da proteína na membrana, nem tem seqüências transmembranas, indicando que se trata de uma proteína solúvel. Esta análise foi realizada no “Expasy Molecular Biology Server”.

Com base na seqüência de aminoácidos esta enzima foi classificada na família 37 das glicosídeo hidrolases e faz parte do clã G, onde não se conhece os grupos envolvidos em catálise e nem a estrutura tridimensional (<http://amfb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY>). Para selecionar as proteínas na família 37 com base na similaridade de seqüências de aminoácidos, têm sido padronizadas duas regiões consenso altamente conservadas. A primeira região é localizada no centro das proteínas (P-G-G-R-F-x-E-x-Y-x-W-D-x-Y) e a segunda localiza-se na região C-terminal Q-W-D-x-P-x-[GAV]-W-[PAS]-P. (<http://au.expasy.org/cgiin/nicedoc.p1?PDOC00717>).

A seqüência obtida foi submetida ao programa BLAST (NCBI), para ser comparada com outras seqüências depositadas nessa base de dados e também foi comparada com duas seqüências de trealases presentes no tubo digestivo do Lepidoptero *Spodoptera frugiperda* obtidas em nosso laboratório.

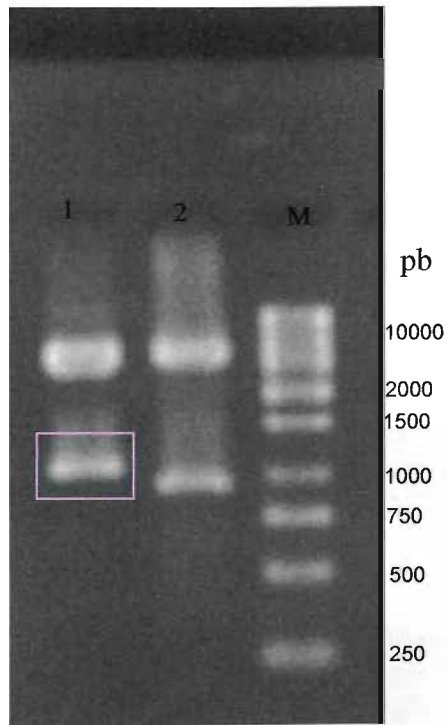
Obtivemos a maior identidade e similaridade com a seqüência de trealase da glândula sexual do macho de *T. molitor*. A seguir, verifica-se maior identidade com trealases dos Hymenoptera *Apis mellifera* e *Pimpla hypochondriaca*. As trealases digestivas dos lepidópteros *Bombyx mori* e *Spodoptera frugiperda* aparecem com similaridades um pouco menores que as enzimas de Hymenoptera. Entre essas seqüências apresentadas na tabela 7, somente as 3 de lepidópteros são sabidamente presentes no tubo digestivo. A de *Pimpla hypochondriaca* é da glândula de veneno e a de *Apis mellifera* foi obtida em seqüenciamento de genoma.

Essas mesmas seqüências foram utilizadas para um alinhamento realizado utilizando o programa Clustal disponível no “Expasy Molecular Biology Server”. Todas essas enzimas são aparentemente solúveis.

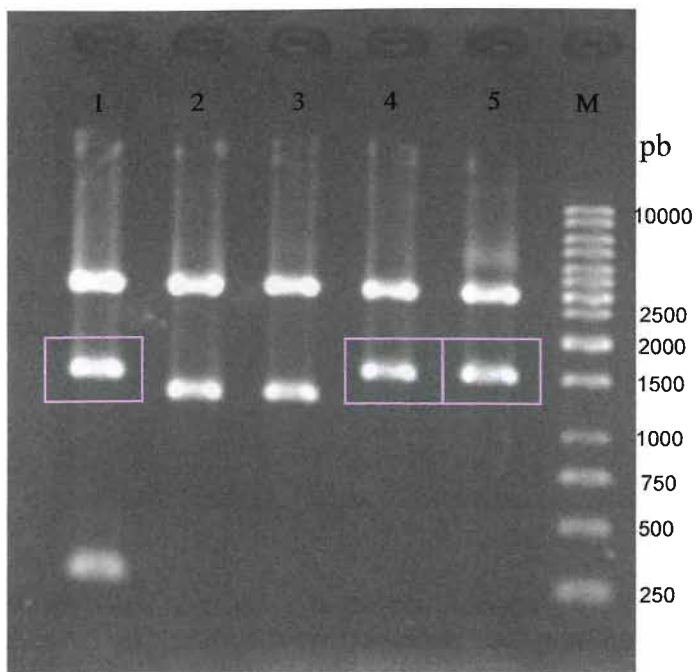
Conforme comentado anteriormente, parece haver no sítio ativo da trealase intestinal de *T. molitor* um grupo guanidino, uma carboxila e um grupo imidazol. Geralmente as regiões dos sítios catalíticos são altamente conservadas. As seqüências comparadas na figura 30 apresentaram várias regiões conservadas e em algumas destas regiões há um resíduo de arginina, de glutamato ou aspartato, mas não encontramos nenhum resíduo de histidina.

<b>Nome do inseto</b>	<b>Origem da trealase</b>	<b>Identidade (%)</b>	<b>Similaridade (%)</b>
<i>Tenebrio molitor</i>	Glândula sexual do macho	71	84
<i>Apis mellifera</i>	Projeto Genoma	51	68
<i>Pimpla hypochondriaca</i>	Glândula de veneno	48	69
<i>Bombyx mori</i>	Digestiva	47	66
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Digestiva 2	44	64
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Digestiva 1	43	57

Tabela 7. Identidade e similaridade dos resíduos de aminoácidos presentes na trealase de *Tenebrio molitor* com outras trealases de insetos. Número de acesso: *T. molitor*, NA: P32359; *A. mellifera*, NA: XM393963.2; *P. hypochondriaca*, NA: CAD31109.1; *B. mori*, NA: P32358; *S. frugiperda*, dados obtidos no laboratório.

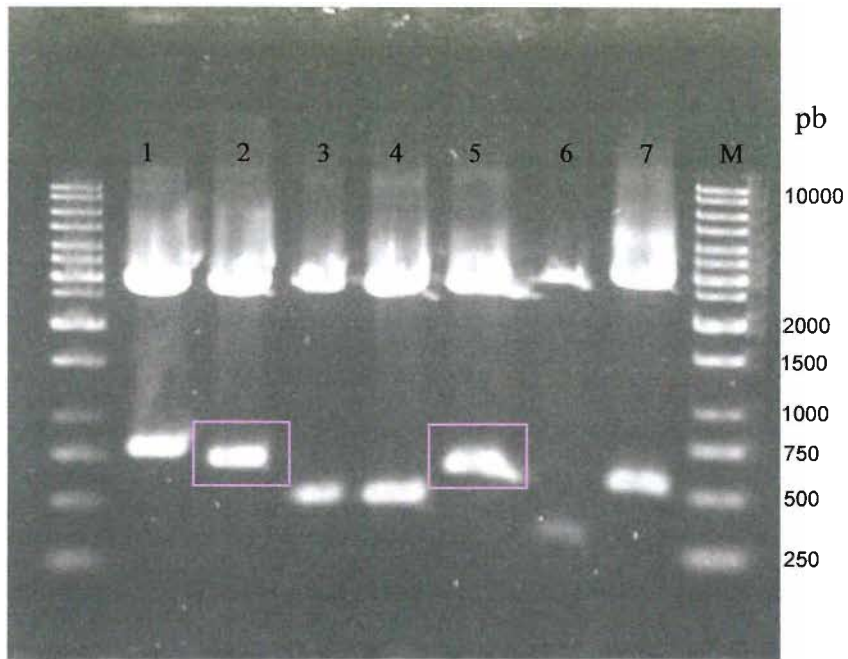


(A)

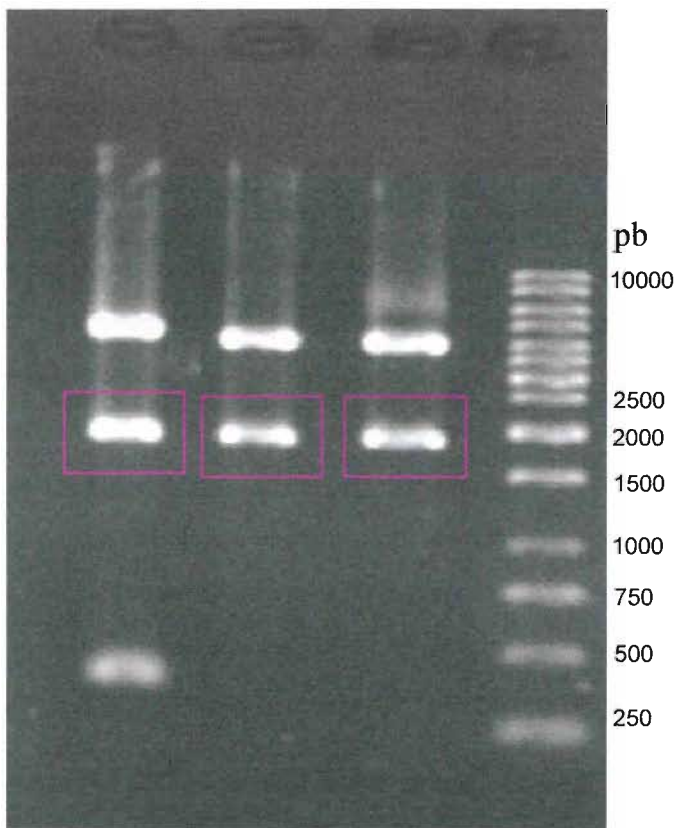


(B)





(C)



(D)

Figura 28. Eletroforese em agarose 1 % de plasmídeos p-GEM-T contendo diferentes insertos após digestão *EcoRI*. (A) plasmídeos contendo os produtos de PCR realizados com os iniciadores TREGSMFW e TREGSMRV. (B) plasmídeos contendo os produtos de PCR realizados com os iniciadores Q+T e TREGSMFW (C) plasmídeos contendo os produtos de PCR realizados com os iniciadores NTER24RV2 e oligo T (D). plasmídeos contendo os produtos de PCR realizados com os iniciadores TREX3C e TREX5N. Em todas as eletroforeses cada raia representa plasmídeo extraído de colônia. Os fragmentos marcados com o quadro indicam aqueles com a seqüência de trealase. (M) marcador de peso molecular

1 ccatcatgtgacagtctgatgtactgtcaaggcaacttg  
1 P S C D S L M Y C Q G N L  
40 cttcacactatccaaatggcacgaattttcaacgactccaagacattcgtggacatgaga  
14 L H T I Q M A R I F N D S K T F V D M R  
100 atgctgaacgacgaacaaaccacctggcgaatttcgacaaacttatgaacgacaccgat  
34 M L N D E Q T T L A N F D K L M N D T D  
161 caaaaccgagccaagacgatataaaaaattcttcgatgacaacttcaaagaggggagac  
54 Q N P S Q D D I K K F F D D N F K E G D  
221 gagttcgaaaactgggtcccgcgattttaccgacaccccgaagctcttgcgagaatt  
74 E F E N W V P S D F T D T P K L L S R I  
281 accgacaaaagcgtacgagagtttgcctcaagatttggccaacatctggccaagcttggc  
94 T D K S V R E F A Q D L V N I W P K L A  
341 aggaagatcaagcaagaagtactggattccccgagttgtacactttgttgcctgtcgaa  
114 R K I K Q E V L D S P E L Y T L L P V E  
401 aacgggttcacatcccgggagggcgcttcagggagttctactactgggactcctactgg  
134 N G F I I P G G R F R E F Y Y W D S Y W  
461 ataatacagggacttctgctgagtgacatgcacgagactgtgagggatgctcgacaac  
154 I I K G L L L S D M H E T V R G M L D N  
521 ttcttgcgatagttgacaaatcgggttcttgcacaaacgggtgcgcgcatctactactcg  
174 F L S I V D K Y G F L P N G A R I Y Y L  
581 aacaggtcgcaacccccgctgctaaacgcgatggtctcgctttacattagcgcaaccaac  
194 N R S Q P P L L N A M V S L Y I S A T N  
641 gatactgcgtggttggaaaagaacatccaaattctcgacagagaattgcgcttttggctc  
214 D T A W L E K N I Q I L D R E L R F W L  
701 gacaacaaactgtagatgtggtgaaagacgacacaacttacagactcgcccattacgac  
234 D N K L V D V V K D D T T Y R L A H Y D  
761 tcagaaagtgcagtcctcgtcccgcgtactacgaagacgtcacaaccgctagtacc  
254 S E S A S P R P E S Y Y E D V T T A S T  
821 gccaaagatgaacagcaactgtacatggagctgaagagcggcgccgagagcgggtgggac  
274 A K D E Q Q L Y M E L K S G A E S G W D  
881 ttctcctcgcggtggatcatcgacaaaacggcaacagcgacgccaacctgacctccctc  
294 F S S R W I I D Q N G N S D A N L T S L  
941 cacaccggaaggataattccgggtggatcttaactcctacctgtgccaagccttccaaaag  
314 H T R R I I P V D L N S Y L C Q A F Q K  
1001 ttgtccaacttctacgtcatcctcggcgactacgacaacgccacgttctgggacaaccaa  
334 L S N F Y V I L G D Y D N A T F W D N Q  
1061 ttcaacgtttggcaaaaaaccatcgagagagtactctacaaccacgaggacgcccatttgg  
354 F N V W Q K T I E R V L Y N H E D A I W  
1121 tacgactgggataacgaattgggccaacaccgcaagatggttcttcccttogaatttcgcc  
374 Y D W D N E L G Q H R K M F F P S N F A  
1181 ccccttgggcccggagcctacgacacaatgtacgccgaagacatcggtggaagagcggct  
394 P L W A E A Y D T M Y A E D I G G R A A  
1241 aagtacttcaagagtcaaaagataatggactacgaaggaggtattcctgcttctggtgagt  
414 K Y F K S Q K I M D Y E G G I P A S L S  
1301 cgcacgggggaacagtggtgactatccgaacgcttggccccactacaatctattgtggtg  
434 R T G E O W D Y P N A W P P L Q S I V V  
1361 atgggtctagccaagagtggaattgtgaagctatagaaatcgcgcaggaatttgcaca  
454 M G L A K S G N C E A I E I A Q E F A Q  
1421 agatgggtcaaaagccaaccagatcggtttcaacaacacgggtgagatggttgagaagtac  
474 R W V K A N Q I G F N N T G E M F E K Y  
1481 gacqcaagaagttcccggacagatggaggtggtggagagtacgtcatacaaacgagttt  
494 D A E V P G Q Y G G G G E Y V I Q S G F  
1541 ggggtggaccaatggtgtagtcttagagttcatagaccgatttttcacaacatccaaaaaa  
514 G W T N G V V L E F I D R F F T T S K K  
1601 acctctaggtaatgacgtcaatatgtgtccgcttttgaattgtgatactgtgaagtaa  
534 T S R ----  
1661 attatgtatgtacataccattactactgacttaattaagtttaaatgaattattcttaag  
1721 tgtcatattattgttttgcagtgctcatccatagagcacctacacgagatcatcttaga  
1781 acagtatttctagaaccaggttgaataagttaagattatccctaggcagcaatgtttac  
1841 gtatttattgaccagtttgcatttaaaaaataaaatttcaacgttttacctccgaa  
1991 aaaaaaaaaaaaaaagccttaagctcaagtca 1932

Figura 29. Seqüência de nucleotídeos e seqüência de aminoácidos derivados do cDNA que codifica a trealase intestinal de *Tenebrio molitor*. As seqüências de nucleotídeos coloridas indicam as regiões utilizadas para o desenho dos iniciadores utilizados nos diversos PCR: a cor Vermelha corresponde a os iniciadores TREGSMFW e TREGSMRV; a cor rocha corresponde ao iniciador NTER24RV1; a cor rosa corresponde ao iniciador NTER24RV2 e a cor azul corresponde a os iniciadores TREX3C e TREX5N



301

350

400

1 PRPESYYEDVTTASVFSDEKDAELYMDLKSAAESGWFSSRWIVDEYGGTRGNLSALHTRRIIPVDLNAFLCQAFQKLSSEFYQTLGDYPNATFWSKLVK  
 2 PRPESYREDYLMQRIPKSRDFFYNNIKAGAESGWFDFSNRNFIRNNSSSTLSLYNISITQYIIPVDLNAFLCQAFQKLSSEFYQTLGDYPNATFWSKLVK  
 3 PRPESYREDYELAKNINDEAEKRRFYEDLKAASGWFDFSSRWYISEN-GTRGSLSNIAFRNIIPVELNAFLCQAFQKLSSEFYQTLGDYPNATFWSKLVK  
 4 PRPESYREDYELAQLDKNTDPNDIYADLKSAAESGWFDFSTRWIFISEGDNNGNTLNTRKNIIPVDLNAFLCQAFQKLSSEFYQTLGDYPNATFWSKLVK  
 5 PRPESYREDYENAVDFDEERR-TDFYVDIKSAAESGWFDFSTRWIFISEGDNNGNTLNTRKNIIPVDLNAFLCQAFQKLSSEFYQTLGDYPNATFWSKLVK  
 6 PRPESYKEDVDVARHFDTNDKKEELYAEELKAASGWFDFSSRRFILNG-TNKGNTLNKTRSIIPVDLNAFLCQAFQKLSSEFYQTLGDYPNATFWSKLVK  
 7 PRPESYREDVTTASTAKDEQ--QLYMELKSGAESGWFDFSSRWIIDQNGNSDANLTSLHTRRIIPVDLNAFLCQAFQKLSSEFYQTLGDYPNATFWSKLVK  
 \*\*\*\*\*  
 PRPESYREDYEA27FDDERDK622Y2DLKSAAESGWFSSRWIS2NG2NRGNLTNLHTR3IIPVDLNAFLCQAFQKLSSEFYQTLGDYPNATFWSKLVK

401

450

500

1 IWQHSIEMVHYNRDDGIWYDWDNELSQHRRMFFPSFAPLWSETFDSRNAEILGEMAAEYFITQNMMDYHGGIPTSLSHTGEQWDFPNAWPELQSIIVMG  
 2 QLQTAIDNILMNEADGIWLDYDLKNQRPQRMFYPSNLAPLYTKSYNRQREYIYGAATLRYLKSQNIIDNEFFGGTPTSLNHTGEQWDFPNAWPELQSIIVMG  
 3 SYQQAIDDLWSESEGVWLDLRLNSQHRNYFFPTNVAPLYTQSFDSKQAIYQRAAAALYLRNGILDYMGGTPASLFTGEQWDFPNAWPELQSIIVQA  
 4 QWRSSIEQALWDEEDGVWHDYDI LNNKPRRYFYTSNLAPLWNAVEKPFLLAKHGARVLEYLHESQALEYPGGVPVSLVNSGEQWDFPNAWPEEVSIVVTA  
 5 QWRDAIQAILWNEEDGMWYDIDIRDKLHRKYFYSSNVSPLWQHADVDPNIKANGDRILNSLKQSGGLDFPGGVPVSLVNSGEQWDFPNAWPEEVSIVVNA  
 6 RFMDAIEQVLWHEVDGVWLDYSLESGRRRDYFYPSNVPLWAVCYDQARKDYVVRVNVYLNKVKVDIFDGGIPTTFEHSGEQWDFPNAWPELQSIIVMG  
 7 VWQKTIERVLYNHEDAIIWYDWDNELGQHRKMFPSNFAPLWAEAYDTMYAEDIGGRAAKYFKSQKIMDYEGGI PASLSRTGEQWDFPNAWPELQSIIVMG  
 \*\*\*\*\*  
 QWQDAIEQVLWNEEDG2W2DYDLEN2QHR2YFYPSNVAPLW2EAYDS77AE2YGARA22YLKKSQ3ILDYPPGGIPTSLSHTGEQWDFPNAWPELQSIIVMG

501

550

600

1 LDKSGSYRAKQARLARRWVKANLIGFRQTGMFEKYNVEVPQNGGGGEYVVOQGGFWINGVVFLEFINQFFTT  
 2 LHWTVREAMDFAHELAFRWLAANYAGYKETGMFEKYDSIVPGQGGGGEYVVOQGGFWINGVVFLEFLNTFSSIKVREVGIEDDLTEVEQ  
 3 LRNSNEESAELAKELAIRWLRANHGYSQSGQMFKEYDALNPKFGGGGEYVVOQGGFWINGVVFLEFLNSYPNATP-----DDNVHMNN  
 4 IQNIGSESSKLAKELAQVWRACKSGFTEKKQMFKEYDALNAGYGGGGEYTVQDGGFGWSNGVVFLEFLDRYGAULTSVDSVDASANNQSNSESETDSK  
 5 IENIGTPEASVLAFAETAQTFVRSCHWGFQYKQMFKEYDAENPKFGGGGGEYTVQDGGFGWSNGAGLEFFMKKYEGGLTADDSNDLGTITTVSPSDNGDPSN  
 6 LANTGQPEAVRLASEIATKWVRSNFVWQKTAMIEKYDATIFGGLGGGGEYVVOQGGFWINGVIMAMLNRWGDTITSADEFGTGVAADSGAVYGAHVGA  
 7 LAKSGNCEAIEIAQEFARQWRVVKANQIGFNNTGMFEKYDAEVPQYGGGGEYVVOQGGFWINGVVFLEFIDRFFTTSK-----KTSR  
 \*\*\*\*\*  
 LANS2GEASKLAKELAQWRVVRANHIGFK2TGMFEKYDAE2PG22GGGGEYVVOQ2GGFGWINGVVFLEFLNR2GTTILTS4DS4DDGVT6TSS33333333S3

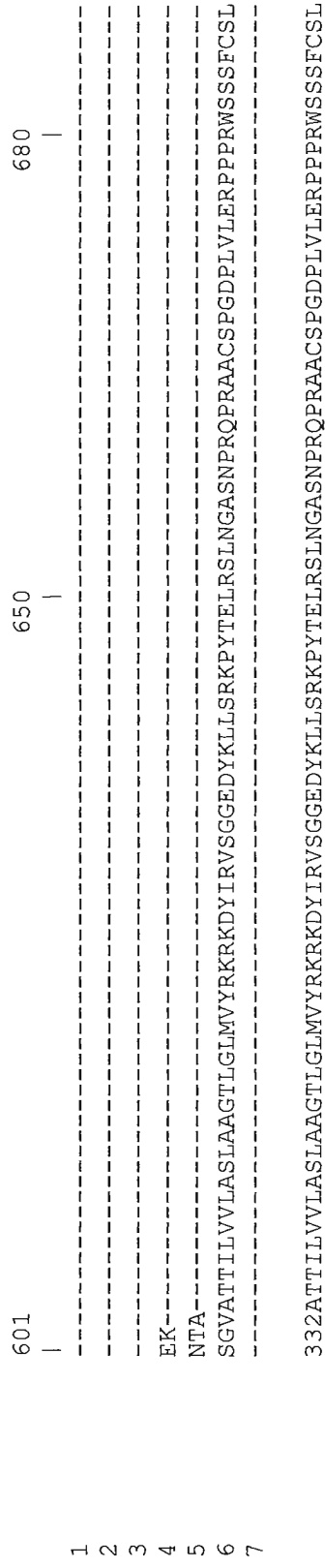





Figura 30. Comparação da estrutura primária da trealase intestinal de *T. molitor* com: (1) NA: P32359 trealase da glândula sexual de macho de *T. molitor*, (2) NA: XM393963.2 *Apis mellifera*, (3) NA: CAD 31109.1 *Pimpla hypochondriaca*, (4) NA: P32358 *Bombyx mori*, (5) e (6) trealase 1 e 2, respectivamente de *Spodoptera frugiperda*, dados do nosso laboratório, (7) trealase intestinal *T. molitor* (esse trabalho).

-  Regiões consenso altamente conservadas, usadas na classificação da família 37.
  -  Resíduos de glutamato (E) ou aspartato (D) localizados em regiões conservadas.
  -  Resíduos de arginina localizados em regiões conservadas.
- Resíduos em vermelho e marcados com \* indicam resíduos idênticos entre as seqüências.  
 Resíduos em verde e marcados com : indicam resíduos altamente conservados entre as seqüências.  
 Resíduos sem cor com . indicam resíduos pouco conservados entre as seqüências.

#### 4.6 Clonagem e expressão do cDNA que codifica a trealase intestinal de *Tenebrio molitor*

Tentamos efetuar a expressão da trealase madura em bactérias BL21DE3 utilizando o plasmídeo PT7. Para isto, foram desenhados os iniciadores TRESP3C e TRESP5N e o PCR foi realizado utilizando como molde o plasmídeo pGEM-T contendo o inserto de interesse. O plasmídeo PT7 e o fragmento purificado foram digeridos com as enzimas *NdeI* e *XbaI* e os produtos de digestão foram purificados e ligados utilizando a enzima T4 DNA ligase. Com o plasmídeo PT7 que continha como inserto o fragmento de DNA que codifica a trealase madura (pT7 TRE), foram transformadas as bactérias BL21DE3. Uma das colônias transformadas foi crescida em meio líquido LB-carbenicilina e monitorou-se o crescimento celular através da absorbância a 600nm e quando se conseguiu o valor de 0,8 iniciou-se a indução com IPTG. Alíquotas foram retiradas em diferentes tempos durante 6 horas, para acompanhar a expressão da enzima (figura 31). O resultado mostrou que a trealase não foi expressa, pois não houve diferença entre as proteínas produzidas pelas bactérias induzidas e não induzidas. Para assegurar que realmente a proteína não foi expressa, medimos a atividade de trealase no lisado das bactérias, e essa era igual a do material proveniente de bactérias não induzidas.

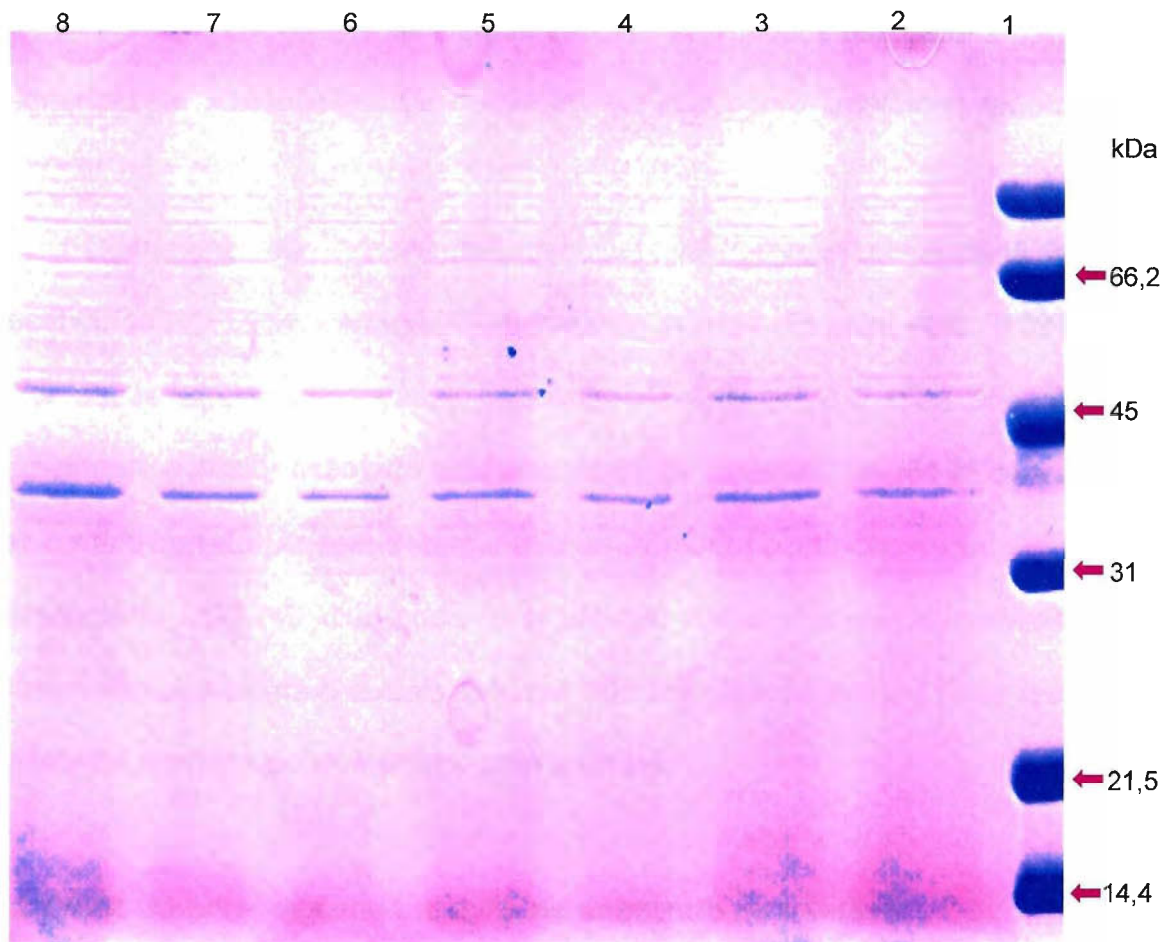


Figura 31. SDS-PAGE 12 % do lisado de bactérias transformadas com o plasmídeo contendo o fragmento de cDNA que codifica a trealase intestinal madura de *T. molitor*. Raia 1, marcador de peso molecular. Raia 2, material de bactérias não inducidas. Raia 3 a 8, tempos crescentes após a indução com IPTG.

## 5 Discussão

### 5.1 Características físicas da trealase

A massa molecular da trealase de *T. molitor* determinada por SDS-PAGE foi de 49 kDa, enquanto a obtida por filtração em coluna de Superdex 75 foi de 97 kDa e por o plote de Ferguson 58 kDa. A massa estimada a partir da seqüência de aminoácidos foi de 61 kDa e seu ponto isoelétrico teórico de 4.67.

Diferenças nas massas determinadas por métodos diversos já foram observadas em várias enzimas digestivas de insetos (Ferreira *et.al.*, 1994). O valor obtido utilizando-se várias concentrações de gel (58 kDa) é bastante semelhante ao valor estimado pela seqüência de aminoácidos (61 kDa) e deve ser o mais correto. Aquele determinado em uma concentração só de gel e na presença de SDS (49 kDa) pode estar afetado por uma migração anômala da enzima nesse sistema e aquele determinado por filtração em gel pode resultar do fato da trealase poder interagir com a resina.

### 5.2 Efeito do pH e da concentração de substrato na trealase

O valor de pH ótimo (5,3) e da constante de Michaelis para trealose (0,43 mM) são semelhantes aos observados em outras trealases digestivas de insetos, que possuem pH ótimo entre 4,8 e 6 e  $K_m$  entre 0,4 e 1,1 mM (Terra e Ferreira, 1994).

Poucas trealases tiveram o  $pK$  dos grupos envolvidos em catálise determinados. A larva do Diptera *R. americana* tem em seu sítio ativo grupos prototrópicos com pHs iguais a 5,0 e 8,3 (Terra *et. al.*, 1978). Números muito semelhantes foram determinados na trealase de *A. mellifera*: 5,3 e 8,5 (Lee *et.*



al., 2001) e de *S. frugiperda*: 4,5 e 8,5 (Silva et. al., 2004). A trealase de *T. molitor* é a que apresentou menor pH ótimo, com valores de p*K*s dos grupos envolvidos em catálise igual a 3,8 e 7,4.

### 5.3 Efeito de diferentes substâncias na atividade da trealase

Tris é um inibidor conhecido para glicosídates em geral, entre elas a trealase. No que se refere a trealases intestinais de insetos, já verificou-se inibição por essa substância em *Apis mellifera* (Hymenoptera), *Rhynchosciara americana* (Diptera) e *Bombyx mori* (Lepidoptera). Nos lepidópteros *Lymantria díspar* e *Spodoptera frugiperda*, Tris em concentrações de até 100 mM não inibem a enzima quando o ensaio é feito no pH ótimo (Terra e Ferreira 2005). Em *S. frugiperda* Tris é um bom inibidor competitivo ( $K_i = 0,55$  mM) em pH 9,0, sugerindo que no local de ligação do Tris deve haver uma carga positiva (Silva et. al., 2004).

Glucono- $\delta$ -lactona possui uma conformação em meia cadeira que assemelha-se ao oxicarbonium formado durante a reação de glicosídates. Por ser um análogo do estado de transição, espera-se que a enzima ligue melhor esse composto que o próprio substrato. Esse é o resultado normalmente encontrado quando se estuda  $\alpha$ - ou  $\beta$ -glicosídates. Estranhamente, trealases não são muito inibidas por glucono- $\delta$ -lactona, e o  $K_i$  para esse composto é da mesma ordem de magnitude do  $K_m$ . Isso foi observado na trealase de *R. americana* ( $K_i = 0,8$  mM e  $K_m = 0,67$  mM) e de *T. molitor* ( $K_i = 1,4$  mM e  $K_m = 0,4$  mM).

A trealase intestinal de *T. molitor* não é inibida por metil- $\alpha$ -glicosídeo em concentrações de até 200 mM. Metil- $\alpha$ -manosídeo inibe a enzima embora não

seja um bom inibidor ( $K_i = 43$  mM). Essa enzima é bem menos inibida por esses dois compostos que a presente no tubo digestivo de *S. frugiperda*, que apresenta  $K_{is}$  de 6,2 e 89 mM para metil- $\alpha$ -manosídeo e metil- $\alpha$ -glicosídeo, respectivamente. Nos dois casos metil- $\alpha$ -manosídeo liga-se melhor a enzima que metil- $\alpha$ -glicosídeo. Talvez a relação entre a afinidade da enzima pelos dois compostos seja semelhante, e por isso não é possível detectar a inibição da enzima de *T. molitor* por metil- $\alpha$ -glicosídeo. Estes resultados indicam que a região aonde liga-se a hidroxila dois do monossacarídeo é importante para a interação com a enzima, já que a única diferença entra a manose e a glicose é o grupo hidroxila localizado no carbono dois das moléculas; encontrando-se na configuração equatorial na glicose e na configuração axial na manose. Na trealase de rim de porco Asano e colaboradores (1996) mostraram que metil- $\alpha$ -manosídeo inibe a enzima ( $K_i = 77$  mM) melhor que metil- $\beta$ -glicosídeo ( $K_i = 210$  mM), enquanto metil- $\alpha$ -glicosídeo também não causa inibição.

Conforme comentado anteriormente, foi mostrado que glicosídeos naturais e seus aglicones podem inibir trealases de mamíferos (Nakano e Sacktor, 1984) e de insetos (Silva *et. al.*, 2004, 2005). Nesse estudo nós utilizamos glicosídeos e aglicones que já tinham inibido outras trealases.

O pior inibidor para a trealase de *T. molitor* foi salicina ( $K_i = 186$  mM). Esse glicosídeo também inibe competitivamente a trealase de *S. frugiperda* porém com uma eficiência muito maior ( $K_i = 19$  mM).

Os glicosídeos amigdalina (glucose- $\beta$ -1-6,glicose- $\beta$ -mandelonitrila) e prunasina (glicose- $\beta$ -mandelonitrila) inibem de modo muito semelhante a trealase de *T. molitor* e *S. frugiperda* ( $K_i$  para amigdalina respectivamente 0,21 e 0,22 e para prunasina 0,43 e 0,92 mM). Nos dois casos a glicose adicional

presente na amígdalina permite uma maior interação com o sítio ativo da enzima. Nessas duas enzimas o dissacarídeo gentibiose (glicose $\beta$ -1-6-glicose) não atua como inibidor. Talvez a ligação da mandelonitrila numa região próxima ao sítio ativo cause uma mudança conformacional na enzima que permita expor o sítio ativo e ligar na enzima as duas glicoses unidas por ligação  $\beta$ 1-6. A mandelonitrila isolada é um inibidor não competitivo do tipo misto. Isso significa que sua ligação dificulta um pouco a ligação do substrato na enzima ( $\alpha = 1,5$ ). Isso pode ocorrer por ela estar ligando numa região próxima ao sítio ativo ou por causar uma modificação conformacional na região do sítio ativo.

O aglicone floretina é um inibidor excelente da enzima de *T. molitor* ( $K_i = 8 \mu\text{M}$ ). Ele liga-se cerca de 1000 vezes mais que o glicosídeo do qual ele é resultante, a florizina, para a qual a enzima apresenta um  $K_i = 0,5 \text{ mM}$ . Esse resultado é inesperado e pode indicar que a floretina isolada liga-se em um local ou em uma porção diferente no sítio ativo daquela ocupada pela floretina quando componente do glicosídeo florizina. Provavelmente este sítio é formado por uma porção hidrofóbica, pela qual a floretina apresenta grande afinidade.

Os resultados de inibição múltipla mostraram que metil- $\alpha$ -manosídeo e glucono- $\delta$ -lactona ligam-se a mesma região do sítio ativo, enquanto floretina liga-se em outro local. Desses experimentos pode-se também concluir que a presença de mandelonitrila afeta mais a ligação de floretina ( $\beta = 2,27$ ) que a ligação de metil- $\alpha$ -manosídeo ( $\beta = 1,21$ ).

#### 4 Aminoácidos importantes para a catálise na da trealase intestinal de *Tenebrio molitor*

A trealase de *T. molitor* aparentemente apresenta em seu sítio ativo um resíduo de histidina, um de arginina e um grupo carboxila que pode estar em um resíduo de glutâmico ou aspartico. Esses resíduos devem estar no sítio ativo porque sua modificação por agentes químicos é, nos três casos, completamente protegida pela presença de substrato.

A enzima perde completamente sua atividade quando a arginina ou o grupo carboxila é modificado, mostrando que eles são essenciais para a catálise. Os  $pK_s$  calculados para o grupo guanidino e o carboxilo tomando como base os experimentos de modificação foram de, respectivamente,  $7,5 \pm 0,2$  e  $3,5 \pm 0,3$ . Esses valores estão muito próximos daqueles determinados a partir dos valores de  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  em diferentes pHs ( $7,4 \pm 0,2$  e  $3,8 \pm 0,2$ , respectivamente). Essa coincidência entre os  $pK_s$  determinados pelas duas maneiras indicam fortemente que esses são os grupos responsáveis pela catálise.

A alteração do resíduo de histidina usando dietilpirocarbonato resulta numa queda, mas não na abolição da atividade enzimática (figura 22). A alteração observada na enzima modificada por DEPC foi no valor de  $pK_{e1}$ , que subiu cerca de uma unidade ( $pK_{e1}$  antes da modificação é de  $3,8 \pm 0,2$  e passa para  $4,8 \pm 0,2$ ). Isso significa que o resíduo de histidina tem como papel diminuir o  $pK$  do carboxilato nucleófilo. É estranho que, na trealase de *Spodoptera frugiperda*, um resíduo de histina tem como papel alterar o  $pK_e$  do resíduo de arginina (Silva *et al.*, 2005).

### 5.5 Arquitetura do sítio ativo da trealase de *Tenebrio molitor*

Juntando-se os resultados obtidos, podemos fazer o seguinte modelo para o sítio ativo da trealase (figura 32): O sítio da enzima teria dois sub-sítios para a ligação de glicose. Esses sub-sítios são assimétricos, uma vez que a enzima liga uma só molécula de inibidores de tamanho pequeno, semelhante ao tamanho de glicose.

Pelos resultados de inibição múltipla pode-se verificar que metil- $\alpha$ -manosídeo e glucono- $\delta$ -lactona ligam-se ao mesmo sub-sítio (denominado aqui de I), enquanto floretina liga-se ao outro (denominado II).

O resíduo de histidina encontra-se no sub-sítio I, uma vez que sua modificação é protegida por metil- $\alpha$ -manosídeo, glucono- $\delta$ -lactona e mandelonitrila mas não é protegida por floretina. Uma vez que a modificação do resíduo de arginina é parcialmente protegida na presença de metil- $\alpha$ -manosídeo ou floretina e é completamente protegida pela mistura dos dois inibidores, esse resíduo possivelmente encontra-se em uma região intermediária entre os dois sub-sítios. O grupo carboxila é protegido completamente por trealose mas sua inativação é só parcialmente diminuída na presença de metil- $\alpha$ -manosídeo, floretina ou uma mistura dos dois inibidores. Isso talvez seja possível se o referido resíduo estiver uma região intermediária entre os dois sub-sítios, a semelhança do resíduo de arginina, mas numa região mais superficial. Alternativamente, os dois resíduos podem estar próximos da região entre os dois sub-sítios de ligação de glicose e o de arginina ser completamente protegido porque o fenilglioxal usado como modificador possui uma molécula mais volumosa que carbodimida e não conseguiria atingir o resíduo a ser modificado no sítio ativo da enzima.

A mandelonitrila, sendo um inibidor não competitivo misto não se liga no sítio ativo, mas sua presença causa certa interferência na ligação do substrato ( $\alpha = 1,5$ ) o que pode indicar ligação em uma região próxima ao sítio ativo. Quando se verifica a interferência causada pela mandelonitrila na ligação de metil- $\alpha$ -manosídeo ou de floretina, observa-se que a ligação do metil- $\alpha$ -manosídeo quase não é afetada ( $\beta = 1,21$ ), enquanto a da floretina é mais dificultada ( $\beta = 2,27$ ). A partir desses resultados poderíamos supor que a mandelonitrila liga-se em uma região mais próxima aquela que liga floretina do que a que liga metil- $\alpha$ -manosídeo. Entretanto, essa suposição não é reforçada pelo fato de que mandelonitrila protege completamente a inativação do resíduo de histidina, que se encontra no mesmo sub-sítio aonde liga-se metil- $\alpha$ -manisídeo, novos experimentos são necessários se quisermos delimitar a região de ligação de mandelonitrila.

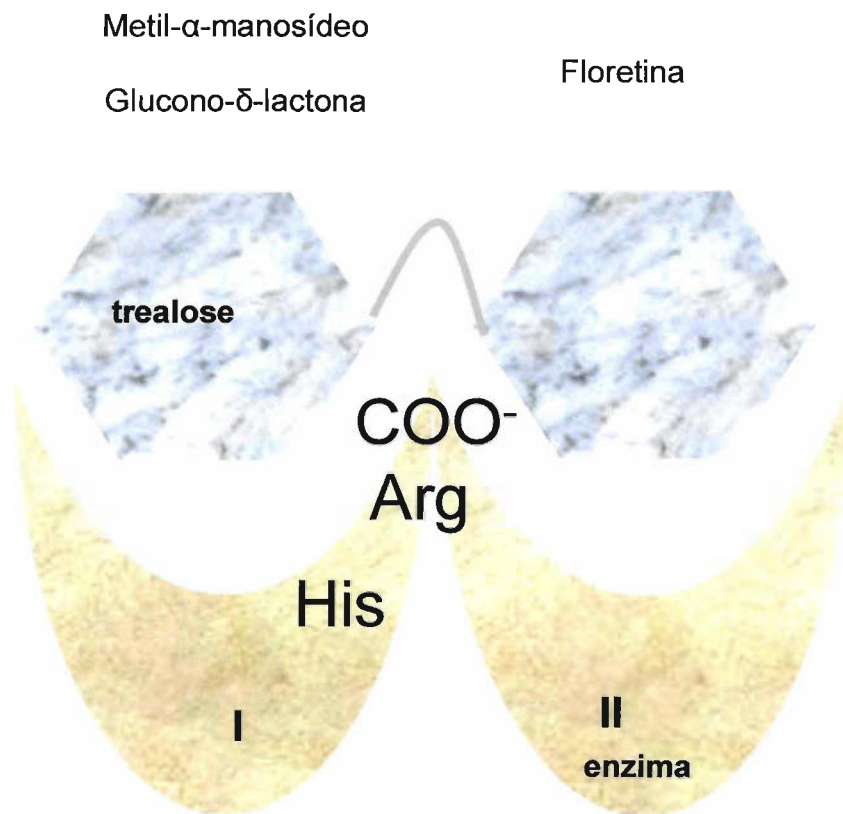


Figura 32 Representação esquemática do sítio ativo da trealase intestinal de *T. molitor*, indicando os dois sub-sítios de ligação de glicose, e nesses, aonde ligar-se-iam os inibidores e onde estariam os grupos importantes para catálise.

## **6 considerações finais**

Nesse trabalho foi possível realizar a caracterização cinética de trealase presente no intestino médio de *T. molitor*, elaborando um modelo para seu sítio-ativo. Além disso, o cDNA correspondente a essa enzima foi clonado. Tentativas iniciais de expressar a enzima não foram bem sucedidas, mas certamente a enzima poderá ser expressa. Com a trealase recombinante, modificações sítio dirigidas poderão ser feitas para a comprovação das hipóteses aqui levantadas.



## 7 Referências bibliográficas

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1990). Basic local alignment serrate tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Amersham Biosciences (2004). Gel Filtration: Principles and Methods. *In* <http://amersham-biosciences.com>
- Andrews, A. T. (1995). Electrophoresis- theory, techniques and biochemical and clinical applications. 2Ed., Clarendon Press, Oxford.
- Asano, N., Kato, A. and Matsui, K. (1996). Two subsites on the active center of pig kidney trehalase. *Eur. J. Biochem.* **240**, 692-698.
- Bauer, L. S. (1995). A Threat to the Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Florida Entomol.* **78**, 414-443.
- Becker, A., Schloder P., Steele J. E., Wegener G. (1996). The regulation of trehalase metabolism in insects. *Experientia*, **52**, 433-430.
- Behn, C. A. (1997). The role of trehalose in the physiology of nematodes. *Int. J. Parasitol.* **27**, 215-229.
- Brusca, R.C. and Brusca, G.J. (1990). Invertebrates. 1ºEd. Sunderland: Sinauer Associates Inc. Publishers.
- Bounias, M., Bahjou, A., Gourdoux, L. and Moreau, R. (1983) Molecular activation of a trehalase purified from the fat body of a Coleopteran insect (*Tenebrio molitor*), by an endogenous insulin-like peptide. *Biochem. Molec. Biol. INT.*, **31**, 249-266.
- Blum, H., Beier, H., Gross H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.

- Carraway, K. L. and Kohland, Jr. D. E. (1972). Carbodiimide modification of proteins. *Methods Enzymol.* **25**, 616-623.
- Chem, C. C., Guo, W. J. Y., Isselbacher, K. J. (1987). Rat intestinal trehalase. *Biochem. J.* **274**, 415-424.
- Cristofolletti, P. T. and Terra, W.R. (2000). The role of amino acid residues in the active site of a midgut microvillar aminopeptidase from the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochim. Biophys. Acta.* **15**, 185-195.
- Dahlqvist, A. (1968). Assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* **22**, 99-107.
- Desroches, P., Mandon, N., Beaeher, J. C., Huignard, J., (1997). Mediation of host-plant use by a glucoside in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera; bruchidae). *J. Insect. Physiol.* **43**, 439-446.
- Dmitryjuk, M. and Zoltowska, K. (2003). Purification and characterization of acid trehalase from muscle of *Ascaris suum* (nematode). *Comp. Biochem. Physiol.* **136B**, 61-69.
- Elbein, A. D. (1974). The metabolism of  $\alpha$ .  $\alpha$ -trehalase. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **30**, 227-256.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I. and Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, **13**, 17R-27R.
- Ferreira, C., Capella, A. N., Sitnik, R. and Terra, W. R. (1994). Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* **107A**, 631-640.

- Ferreira, C., Parra, J. R. P. and Terra, W. R. (1997). The effect of dietary plant glycosides in larval midgut  $\beta$ -glycosidases from *Spodoptera frugiperda* and *Diatraea saccharalis* *Insect. Biochem. Molec. Biol.* **27**, 55-59.
- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R. and Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases Structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.* **269**, 397-412.
- Frohman, M. A. (1995). Rapid Amplification of cDNA ends. In PCR Primer: A Laboratory Manual. (Eds CW. Dieffenbach and GS Dveksler) CSHL Press. USA.
- Gopalan, V., Pastuszyn, A., Galey, W. R. Jr. and Glew, R.H. (1992). Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by guinea pig liver cytosolic  $\beta$ -glucoside. *Biol. Chem.* **267**, 14027-14032.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**, 309-316.
- Henrissat, B., Bairoch, A. (1993). New families in classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**, 781-788.
- Henrissat, B., Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**, 695-696.
- Ishihara, R., Taketani, S., Sasai-Takedatsu, M., Kino, M., Tokunaga, R., Kobayashi, Y. (1997). Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding human trehalase *Gene*, **202**, 69-74.
- Jouanin, L., Bonade-Bottino, M., Girard, C., Morrot, G. and Giband, M. (1998). Transgenic plants for insect resistance. *Plant. Sci.* **131**, 1-11.

- Kadowaki, K. M., Polizeli, M. L. T. M., Terenzi, H. F., Jorge, J. A. (1996). Characterization of trehalase activities from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1291**, 199-205.
- Kinnunen, P. M., DeMichele, A., and Lange, L. G. (1988). Chemical modification of acyl-CoA: cholesterol *o*-acyltransferase. 1. Identification of acyl-CoA: cholesterol *o*-acyltransferase subtypes by differential diethyl pyrocarbonate sensitivity. *Biochemistry*, **27**, 7344.
- Labat-Robert, J., Baumann, F. C., Bar-Guilloux, E. and Robic, D. (1978). Comparative specificities of trehalases from various species. *Com. Biochem. Physiol.* **61B**, 111-114.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, J. H., Tsuji, T., Nakamura, M., Nishimoto, M., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A. Matsui, H. and Chiba, S. (2001). Purification and identification of the essential ionizable groups of honeybee, *Apis mellifera* L., trehalase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2657-2665.
- Lúcio-Eterovic, A.K.B., Jorge, J. A., Rolizeli, M. L. T. M., Terenzi, H. F. (2005). Biochemical characterization of the trehalase of thermophilic fungi: An enzyme with mixed properties of neutral and acid trehalase. *Biochem. Biophys. Acta.* **1723**, 201-207.
- Ly, H. D. and Withers, S. G. (1999). Mutagenesis of Glycosidases. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 487-522.
- Miles, E.W. (1977). Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods Enzymol.* **47**,431–442.

- Morton, R. E. and Evans, T. A. (1992). Modification of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. *Anal. Biochem.* **204**, 332-334.
- Murray, J. A., Coupland, K., Smith J. A., Ansel, I. D. and Long, R. G. (2000). Intestinal trehalase activity in a UK population establishing a normal range and the effect of the disease. *Brit. J. Nutr.* **83**, 241-245.
- Nakano, M. and Sacktor, B. (1984). Renal trehalase: two subsites at the substrate-binding site. *Biochem. Biophys. Acta.* **791**, 45-49.
- Richards, B. A., Krakowka, S., Dexter, L. B., Schmid, H., Wolterbeek, A. P. M., Waalkens-Berendsen, D. H., Shigoyuki, A. and Kurimoto, M. (2002). Trehalase: a review of properties, history of use and tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology*, **40**, 871-898.
- Riordan, J.F. and Valee, B.L., (1972). Nitration with tetranitromethane. *Methods Enzymol.* **25**, 515-521.
- Rosemont, J. L. (1978). Reaction of histidine residues in proteins with diethylpyrocarbonate: differential molar absorptivities and reactivities. *Anal. Biochem.* **88**, 314-320.
- Ruppert, E.E. and Barnes, R.D. (1994). *Invertebrate Zoology*. 6<sup>th</sup> Ed. Fort Worth: Saunders College Publishing.
- Pan, S. Q., Ye, X. S. and Kuc, J., (1989). Direct detection of  $\beta$ -1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. *Anal. Biochem.* **182**, 136-140.
- Poulos, T. L. and Price, P. A. (1971). The identification of a tryptophan residue essential to the catalytic activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease. *J. Biol. Chem.* **246**, 4041-4046.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci (U S A)*; **74**, 5463-5467.
- Segel, I. H. (1975). *Enzyme kinetics*. Wiley, New York.
- Silva, M. C., Terra, W. R. and Ferreira, C. (2004). The role of carboxyl, guanidine and imidazole groups in catalysis by a midgut trehalase purified from an insect larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 1089-1099.
- Silva, M. C., Terra, W. R. and Ferreira, C. (2005). Absorption of toxic  $\beta$ -glucosides produced by plants and their effect on tissue trehalases from insects. Submetido a publicação.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985). Measurements of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**,76-85.
- Spencer, K. C. (1998). Chemical mediation of coevolution in the *Passiflora-Heliconius* interactions. In *chemical mediation of evolution*. Ed by Spencer K.C. Academic press, San Diego.
- Strange, R., Morante, S., Stefanini, S., Cgiancone, E., and Desideri, A. (1993). Nucleation of the iron core occurs at the three-fold channels of horse spleen apoferritin: an EXAFS study on the native and chemically-modified protein. *Biochem.Biophys.* **1164**, 331-334.
- Sumida, M. and Yamashita, O. (1983). Purification and some properties of soluble trehalase from midgut of párrate adult of the silkworm, *Bómbix mori*. *Insect. Biochem.* **13**, 257-265.

- Takahashi, K., (1968). The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.* **243**, 6171–6179.
- Terra, W. R., Ferreira, C. and Bianchi, A. G. (1978). Physical properties and tris inhibition of an insect trehalase and a thermodynamic approach to the nature of its active site. *Biochem. Biophys. Acta.* **524**, 131-141.
- Terra, W. R., Terra, I. C. M., Ferreira, C. and Bianchi, A. G. (1979). Carbodiimide-reactive carboxyl groups at the active site of an insect midgut trehalase. *Biochem. Biophys. Acta.* **571**, 79-85.
- Terra, W. R. (1990). Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology*, **35**: 181-200.
- Terra, W. R. and Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* **109B**, 1-62.
- Terra, W. R. and Ferreira, C. (2003). Digestive System. In: Resh, H. V. and Cardé, R. T. (Eds), *Encyclopedia of Insects*. Elsevier Science. (USA).
- Terra, W. R. and Ferreira, C. (2005). Biochemistry of digestion. In: Gilbert, L.I., Iatov, K., Gill, S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 4. Elsevier, Oxford.
- Thompson, S. N. and Suarez, R. K. (2003). Metabolism. In: Resh H. V. and Cardé R. T. (Eds), *Encyclopedia of Insects*. Elsevier Science. (USA).
- Trudel, J., Grenier, J. And Asselin, A. (1998). Detection of enzymes active on various  $\beta$ -1,3-glucans after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **19**, 1788-1792.
- Valaitis, A. P. and Bowers, D. F. (1993). Purification and properties of the soluble midgut trehalase from the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **23**, 599-606.