**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

IVAN BRAGATTO

**Sequências, propriedades e função de β -1,3-
glucanases de insetos**

**Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
17/10/2011

IVAN BRAGATTO

**Sequências, propriedades e função de β -1,3-
glucanases de insetos**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Clélia Ferreira

São Paulo
2011

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Dr^a. Clélia Ferreira e Dr. Walter Ribeiro Terra, pela oportunidade de aprender em seu laboratório, com a orientação e grande experiência destes pesquisadores exemplos.

Ao Dr. Fernando A. Genta, meu primeiro contato com a ciência e responsável direto pela minha formação científica.

A todos os colegas do laboratório de bioquímica de insetos, pelo compartilhamento da vida de pesquisa e formação.

Ao Prof. Dr. Alberto F. Ribeiro e técnico Waldir Caldeira pela contribuição nos estudos de imunohistoquímica.

Às técnicas Luíza Nakabayashi, Maria Ivanilde Marcolino e Christiane Cardoso pelo suporte técnico.

Às agências de fomento CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro.

RESUMO

Bragatto, I. **Sequências, propriedades e função de β -1,3-glucanases de insetos.** 2011. 133p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

β -1,3-glucanases são enzimas encontradas em muitos organismos, como fungos, bactéria e plantas. Suas funções incluem remodelamento de parede celular, defesa e digestão. É um alvo interessante para o controle populacional de insetos-praga, porque é ausente em vertebrados. Em insetos, é encontrada no intestino de muitas ordens diferentes, e hidrolizam β -1,3 ou β -1,3(4)-glucanas ingeridas, mas pouco se sabe sobre as propriedades e a função dessas enzimas. Nós estudamos três espécies de insetos, de três ordens diferentes. *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), *Tenebrio molitor* (Coleoptera) e *Abracris flavolineata* (Orthoptera) são insetos herbívoros e pragas de plantações, mas suas β -1,3-glucanases diferem significativamente. A β -1,3-glucanase de *S. frugiperda* (SLAM) foi purificada do intestino médio da larva. Ela apresenta uma massa molecular de 37,5 kDa, um pH ótimo alcalino de 9,0, é ativa contra β -1,3-glucana (laminarina), mas é incapaz de hidrolizar β -1,3-1,6-glucana de levedura ou outros polisacarídeos. SLAM é não-processiva (0,4), e não é inibida por altas concentrações de substrato. Diferente de outras β -1,3-glucanases digestivas de insetos, SLAM é incapaz de lisar células de *Saccharomyces cerevisiae*. O cDNA correspondente à SLAM foi clonado e sequenciado, demonstrando que a proteína pertence à família 16 das Glicosídeo-Hidrolases. A modelagem tridimensional de SLAM, feito com base em homologia de sequência, sugere que o resíduo E228 possa afetar a ionização dos resíduos catalíticos, causando o deslocamento do pH ótimo da enzima. Anti-corpos específicos para SLAM foram produzidos, e estes reagem com uma única proteína oriunda do intestino médio da larva, responsável pela atividade β -1,3-glucanásica majoritária. A imunocitocalização de SLAM demonstra que a enzima é encontrada em vesículas secretórias e no glicocálix das células colunares, e portanto

não é originária de simbioses. Nós clonamos e sequenciamos o cDNA correspondente à β -1,3-glucanase majoritária presente no intestino médio da larva de *T. molitor* (TLAM). Ela pertence à família 16 das Glicosídeo-Hidrolases e está relacionada com proteínas ligantes de β -glucanas, da mesma forma que a enzima de *S. frugiperda*. A modelagem tridimensional por homologia de sequência permitiu identificar alguns resíduos de amino-ácidos (E174, E179, H204, Y304, R127 e R2181) no sítio ativo da enzima, que podem ser importantes para a atividade de TLAM. A β -1,3-glucanase digestiva do gafanhoto *Abracris flavolineata* (Orthoptera) é diferente das enzimas já estudadas em insetos. Ela apresenta uma estratégia catalítica processiva, liberando glicose como maior parte dos produtos, e é inibida por altas concentrações de substrato. Para estudar as bases estruturais desse mecanismo, nós procuramos obter a sequência de cDNA correspondente à enzima já caracterizada. O alinhamento múltiplo das β -1,3-glucanases de insetos e proteínas ligantes de beta-glucanas indicou que uma duplicação gênica da enzima do ancestral comum de moluscos e artrópodes. Uma cópia originou as beta-1,3-glucanase de insetos, perdendo uma região N-Terminal com cerca de 100 pares de bases, enquanto a outra cópia originou as proteínas ligantes de beta-glucana, perdendo os resíduos catalíticos.

Palavras-chave: Inseto, digestão, carboidrato, beta-glucanase, beta-glucana

ABSTRACT

Bragatto, I. **Sequences, properties and function of insect β -1,3-glucanases**. 2011. 133p. Tese - PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

β -1,3-glucanases are widespread enzymes, found in all major groups of invertebrates, fungi, bacteria and plants. Since this enzyme is absent in vertebrates, it constitutes an interesting target for control of insect pests population. Its functions range from cell wall remodeling, defense and digestion. In insects, it is found in the gut of many different orders, hydrolyzing β -1,3 or β -1,3(4)-glucanases, but little is known about the properties and function of these enzymes. We studied three insect species each pertaining to a different order. *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), *Tenebrio molitor* (Coleoptera) and *Abracris flavolineata* are herbivores and crops pests, but their β -1,3-glucanases differ significantly. *S. frugiperda* β -1,3-glucanase (SLAM) was purified from the larval midgut. It has a molecular mass of 37.5 kDa, an alkaline optimum pH of 9.0, is active against β -1,3-glucan (laminarin), but cannot hydrolyze yeast β -1,3-1,6-glucan or other polysaccharides. The enzyme is an endoglucanase with low processivity (0.4), and is not inhibited by high concentrations of substrate. In contrast to other digestive β -1,3-glucanases from insects, SLAM is unable to lyse *Saccharomyces cerevisiae* cells. The cDNA encoding SLAM was cloned and sequenced, showing that the protein belongs to glycosyl hydrolase family 16 as other insect glucanases and glucan-binding proteins. SLAM homology modeling suggests that E228 may affect the ionization of the catalytic residues, thus displacing the enzyme pH optimum. SLAM antiserum reacts with a single protein in the insect midgut. Immunocytochemical localization reveals the presence of the enzyme in secretory vesicles and glycocalyx from columnar cells. We cloned and sequenced the cDNA of *T. molitor* β -1,3-glucanase. It belongs to glycoside hydrolase family 16, and is related to other insect glucanases and glucan-binding proteins. Sequence analysis and homology modeling allowed the identification of some residues (E174, E179, H204,

Y304, R127 and R181) at the active site of the enzyme, which may be important for TLAM activity. The grasshopper *A. flavolineata* has a β -1,3-glucanase with a processive catalytic strategy. To study the structural basis of this property, we aimed to obtain its encoding sequence to better understand this catalytic mechanism. Multiple sequence alignment of insects β -1,3-glucanases and β -glucan-binding protein indicates that the β -1,3-glucanase gene duplicated in the ancestor of mollusks and arthropods. One copy originated the insect β -1,3-glucanases after losing a 100 bp N-terminal portion and the arthropode β -glucan-binding proteins by the loss of the catalytic residues.

Keywords: Insect, digestion, carbohydrate, beta-glucanase, beta-glucana

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALAM - β -1,3-glucanase de *Abracris flavolineata*
BSA - albumina sérica bovina
CAPS - ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfônico
cDNA - ácido desoxiribonucleico complementar
CMC - carboximetilcelulose
DLAM - β -1,3-glucanase de *Diatraea saccharalis*
DNA - ácido desoxiribonucleico
DNS - ácido dinitrosalicílico
E.C. - classe enzimática
EDTA - ácido etileno diamino tetra acético
 k_{cat} - constante de catálise
 K_M - constante de Michaelis
LIC1 - β -1,3(4)-glucanase de *Periplaneta americana*
MES - ácido 2-(N-morfolino)etano sulfônico
MM - massa molecular
m/v - massa por volume
PCR - reação da polimerase em cadeia
pI - ponto isoelétrico
PLAM - β -1,3-glucanase de *P. americana*
PTC - feniltiocarbamida
SLAM - β -1,3-glucanase de *Spodoptera frugiperda*
TAPS - ácido tris-(hidroximetil)etilaminopropano sulfônico
TGO - reagente de tris - glicose oxidase
TLAM - β -1,3-glucanase de *Tenebrio molitor*
Tris - trishidroximetilaminometano
TTC - cloreto de trifeniltetrazólio
U - unidade de velocidade enzimática
UFC - unidade formadora de colônia
 V_{max} - velocidade máxima
v/v - volume por volume
YPDA - meio contendo extrato de levedura, peptona, dextrose e ágar

Sumário

1. Introdução.....	14
1.1. Considerações iniciais.....	14
1.2. O tubo digestório de insetos.....	15
1.3. Estrutura e ocorrência de β -1,3-glucanas.....	17
1.4. Classificação e ocorrência de β -1,3-glucanases.....	18
1.5. β -1,3-glucanases digestivas de insetos.....	20
1.6. Proteínas Ligantes de β -glucanas (β GRPs).....	25
1.7. Objetivos deste trabalho.....	26
2. Material e Métodos.....	28
2.1. Material Biológico. Criações de insetos.....	28
2.2. Dissecção e preparação de frações solúveis.....	28
2.3. Purificação da laminarinase de <i>S. frugiperda</i>	30
2.3.1. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Hitrap Q (Pharmacia, Suécia)....	30
2.3.2. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Mono Q (Pharmacia, Suécia)....	30
2.4. Purificação da β -1,3-glucanase majoritária de <i>T. molitor</i>	31
2.4.1. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Hitrap Q (Pharmacia, Suécia)....	31
2.4.2. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Mono Q (Pharmacia, Suécia)....	31
2.4.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica em coluna Resource PHE (Pharmacia, Suécia).....	32
2.4.4. Cromatografia de Filtração em Gel em coluna Superdex 75 (Pharmacia, Suécia).....	32
2.5. Purificação da β -1,3-glucanase de <i>A. flavolineata</i>	33
2.5.1. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Hitrap Q (Pharmacia, Suécia)....	33
2.5.2. Cromatografia de Filtração em Gel em coluna HiTrap Desalting (Pharmacia, Suécia).....	33
2.5.3. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Mono Q (Pharmacia, Suécia)....	34
2.5.4. Cromatografia de Filtração em Gel em coluna Superose 12 (Pharmacia, Suécia).....	34
2.6. Criação de larvas de <i>T. molitor</i> em dietas diferentes.....	35
2.7. Análise do perfil de atividade sobre laminarina.....	35
2.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), em condições não-desnaturantes (PAGE) e ensaio de atividade de β -glucanase in-gel.....	35
2.9. Cromatografia em camada delgada de sílica dos produtos de ação enzimática.....	37
2.10. Ensaio enzimáticos.....	37
2.11. Determinação de proteína.....	38
2.13. Quantificação de β -1,3-glucana e carboidratos totais.....	38
2.14. Digestibilidade de β -1,3-glucana presente na dieta de <i>S. frugiperda</i>	38
2.16. Cálculo do potencial eletrostático da superfície de proteínas.....	39
2.17. Sequenciamento interno de fragmentos de ALAM e TLAM.....	39
2.18. Determinação de processividade.....	40
2.19. Imunocitocalização por microscopia confocal	41
2.20. Imunocitocalização por microscopia eletrônica de transmissão.....	42

2.21. Determinação de Km e inativação térmica das enzimas.....	43
2.22. Reação em cadeia com DNA polimerase (PCR) e iniciadores para sequenciamento do cDNA de β -glucanases e para expressão das proteínas recombinantes.....	43
2.23. Tentativas de clonagem da β -1,3-glucanase de <i>Abracris flavolineata</i>	46
2.24. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	49
2.25. Clonagem do DNA amplificado por PCR a plasmídeos vetores.....	49
2.26. Preparo e eletroporação de células de <i>E. coli</i> (DH10B)	51
2.28. Preparo de bactérias competentes para transformação por choque térmico....	52
2.29. Transformação de bactérias por choque térmico e seleção dos clones transformantes.....	53
2.30. Preparação de plasmídeos a partir de cultura de bactérias.....	53
2.31. PCR a partir de material obtido de colônias de bactérias.....	54
2.32. Purificação dos plasmídeos a partir das bactérias transformadas.....	54
2.33. Expressão da SLam em linhagens de <i>E. coli</i>	55
2.34. Teste de solubilidade e purificação da SLam expressa em <i>E. coli</i>	56
2.35. Preparo e eletroporação de células de <i>P. pastoris</i>	57
2.36. Expressão da laminarinase recombinante de <i>S. frugiperda</i> em <i>P. pastoris</i>	58
2.37. Purificação da laminarinase recombinante de <i>S. frugiperda</i> expressa em <i>P.</i> <i>pastoris</i>	58
2.38. Ensaios de lise de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
2.40. RT-PCR semi-quantitativa.....	59
2.42. Produção de anti-corpos policlonais a partir de imunização de coelhos com SLAM recombinante.....	61
2.43. Western-blots.....	62
2.44. Reação de sequenciamento de DNA.....	63
2.45. Análise das seqüências obtidas.....	63
3. Resultados.....	65
3.1. Clonagem e sequenciamento do cDNA de β -1,3-glucanase de insetos.....	65
<i>Spodoptera littoralis</i>	72
<i>Diatraea saccharalis</i>	72
3.2. Laminarinase de <i>Abracris flavolineata</i>	72
3.2.1. Tentativas de clonagem.....	72
3.2.2. Purificação da β -1,3-glucanase digestiva.....	75
3.2.3. Sequenciamento de fragmentos internos da proteína purificada.....	77
3.3. Laminarinase de <i>T. molitor</i>	79
3.3.1. Clonagem, sequenciamento e localização tecidual do cDNA da β -1,3- glucanase de <i>T. molitor</i> (TLAM)	79
3.3.2. Purificação da laminarinase digestiva majoritária de <i>T. molitor</i>	83
3.3.3. Sequenciamento interno da TLAM.....	85
3.4. Laminarinase de <i>S. frugiperda</i>	86
3.4.1. Distribuição de SLAM e da atividade laminarinásica digestiva.....	86
3.4.2. Purificação e caracterização da laminarinase de <i>S. frugiperda</i>	88
3.4.3. Atividade lítica da laminarinase de <i>S. frugiperda</i>	91
3.4.4. Modelagem molecular da laminarinase de <i>S. frugiperda</i>	91

3.4.6. Modulação de pKa dos resíduos catalíticos de SLAM.....	93
3.4.7. Produção da SLAM recombinante em <i>E. coli</i>	96
3.4.8. Produção de anti-corpos policlonais anti-laminarinase de <i>S. frugiperda</i>	98
3.4.9. Imunocitocalização da laminarinase de <i>S. frugiperda</i>	99
3.4.10. Produção da SLAM recombinante em <i>P. pastoris</i>	101
3.4.11. Caracterização da SLAM recombinante.....	101
3.5. Evolução das β -1,3-glucanases e sua relação com proteínas ligantes de β -glucana.....	102
3.6. Função das β -1,3-glucanases intestinais de insetos.....	106
4. Discussão.....	107
4.1. Classificação das β -1,3-glucanases de insetos.....	107
4.2. Laminarinase de <i>S. frugiperda</i> (SLAM).....	108
4.2.1. Propriedades de SLAM.....	108
4.2.2. Distribuição de SLAM na fase larval.....	109
4.2.3. Secreção da laminarinase de <i>S. frugiperda</i>	110
4.3. Laminarinase de <i>T. molitor</i> (TLAM).....	112
4.3.1. Identificação da enzima selvagem purificada e caracterizada.....	112
4.4. Evolução e função das β -glucanases de insetos.....	113
5. Conclusões.....	120
6. Referências.....	121
SÚMULA CURRICULAR.....	129

1. Introdução

1.1. Considerações iniciais

As estimativas sobre o total de eucariotos existentes conhecidos no planeta chegam a 2.000.000 de espécies, e considerando o número estimado de espécies ainda não nomeadas, insetos e miriápodes se tornariam um grupo extremamente preponderante (Fig 1).

Fig 1. Estimativas do número de espécies nomeadas e totais por grupo de espécies de eucariotos. Adaptado de (Groombridge e Jenkins 2002).

Considerando os invertebrados, os insetos compõem o maior grupo (95%), e o grande interesse em estudar esses animais é devido aos seus papéis como vetores de muitas doenças humanas e animais, como malária, e os sérios prejuízos causados à agricultura e aos alimentos (Winfree *et al.*, 2009). As estimativas são de que 10% da biomassa vegetal é consumida por ano pelos insetos, e mesmo com o uso de inseticidas, as perdas agrícolas causadas por insetos nos Estados Unidos chegam a

13% (Schoonhoven 2005). Apesar de todo o dano causado pelos insetos, a vida no ambiente terrestre não seria possível se fossem extintas as abelhas, formigas e cupins. Esses três tipos de inseto são responsáveis por grande parte da polinização, decomposição de vegetais mortos e remineralização do solo (Grimaldi e Engel 2005).

À primeira vista a maioria dos insetos é indistinguível entre si, não explicando o incrível sucesso desses animais. Entretanto, suas peculiaridades ecológicas apresentam bases fisiológicas que permitem entender suas distribuições e seus papéis nos variados ambientes. O mosquito *Anopheles gambiae*, por exemplo, é um vetor da malária humana, mas *Anopheles quadriannulatus* é considerado vetor de malária somente entre animais. Pequenas diferenças fisiológicas podem ter enormes implicações, mesmo entre espécies de mesmo gênero. Isso demonstra a impossibilidade de generalizações entre insetos, e a necessidade de estudos considerando diversas ordens diferentes.

1.2. O tubo digestório de insetos

O tubo digestório dos insetos representa uma grande superfície de interação com o meio ambiente. O alimento ingerido entra rapidamente em contato com um sistema bastante complexo, cujo correto funcionamento é imprescindível para a vida do inseto. Muitas plantas herbivoradas ou predadas por insetos atuam desregulando esse sistema, por exemplo com inibidores de tripsina (feijão comum), ou moléculas parecidas com o substrato natural que, quando digeridos por uma enzima do inseto, geram um composto tóxico, como amigdalina (amêndoas amargas), liberando cianeto.

Para controlar os insetos que são pragas agrícolas, muitos inseticidas foram

desenvolvidos e aplicados durante décadas, mas ocasionam grandes custos à saúde humana e ao meio ambiente. Dessa forma, novas estratégias para controlar a população de insetos nocivos devem ser estudadas continuamente, tanto como alternativas a esses inseticidas tóxicos, como resposta à adaptação apresentada pelos insetos às formas de controle empregadas. Alternativas como o uso de toxina de *Bacillus thuringiensis*, que liga-se a aminopeptidases presentes na membrana dos enterócitos (Rajagopal *et al.*, 2002), produção de vegetais transgênicos que expressam inibidores de enzimas digestivas de insetos (Hilder e Boulter 1999) ou controle biológico, utilizando parasitas ou predadores, vêm sendo intensamente pesquisadas e utilizadas comercialmente com sucesso (Alstad e Andow 1995; Bauer 1995; Hilder e Boulter 1999; Jouanin *et al.*, 1998; McGaughey e Whalon 1992; Schuler *et al.*, 1998; Shade *et al.*, 1994).

Embora o tubo digestório dos insetos apresente considerável variação entre ordens, estruturalmente é possível generalizar as principais características. O tubo digestório pode ser dividido em três partes: intestino anterior, médio e posterior. A região anterior e posterior são revestidas por quitina, não secretando enzimas ou absorvendo nutrientes. O intestino posterior absorve água e íons, concentrando as fezes antes da excreção. O intestino médio, no entanto, corresponde à parte responsável pela maior parte da digestão, onde ocorrem a absorção de nutrientes e a secreção das enzimas digestivas. Ele pode ser apenas um cilindro, denominado ventrículo, ou apresentar cecos gástricos em número, tamanho e localização variável, conforme a espécie. O bolo alimentar é contido em uma membrana semipermeável denominada membrana peritrófica, composta principalmente por quitina e proteínas. Esta membrana delimita

dois compartimentos dentro do intestino médio: espaço endoperitrítico e ectoperitrítico.

O esquema é apresentado na Fig 2.

Fig 2. Diagrama generalizado do tubo digestivo dos insetos. Ver texto para detalhes.

1.3. Estrutura e ocorrência de β -1,3-glucanas

β -1,3-glucanas são produzidas em muitos organismos, cumprindo diversas funções como: defesa (calose em plantas), estrutura (plantas, parede de fungos) ou reserva (algas). O polímero de β -1,3-glucana pode ser ramificado por ligações do tipo β -1,4 (cereais) ou β -1,6 (fungos) (Fig 3 A e B, respectivamente). β -1,3-glucana em cadeias simples adquire uma estrutura linear, mas em fungos são encontradas três cadeias dispostas como uma tripla-hélice (Krainer, *et al.*, 1994) (Fig 3 B).

Fig 3. Estruturas de β -1,3-glucanas da parede do endosperma secundário de cereais (A) e de fungos (B). C. Arranjo tripla-hélice *in vivo* da β -1,3-glucana da parede de fungos, associada às fibras de quitinas (Leung *et al.*, 2006).

A porção N-Terminal de algumas proteínas reconhecedoras de β -glucanas (β GRPs) apresentam especificidade por ligação à β -1,3-glucana na forma helical, mas não na forma de cadeia simples (Takahasi *et al.*, 2009).

1.4. Classificação e ocorrência de β -1,3-glucanases

As β -1,3-glucanases podem ser classificadas de acordo com o substrato clivado preferencialmente (atividade enzimática) ou com as suas sequências primárias de amino-ácidos (homologia entre sequências). Em relação à atividade enzimática, a enzima pode clivar preferencialmente porções internas (endo- β -1,3-glucanases) ou externas (exo- β -1,3-glucanases) do polímero de β -1,3-glucana. O produto liberado dessa atividade enzimática revela propriedades do sítio catalítico, que é considerado

na classificação da enzima. Esse produto pode ser preferencialmente uma glicose ou oligossacarídeos, e também pode sofrer inversão da sua configuração anomérica β (inversoras) ou não (retentoras) em relação ao substrato. De acordo com esses critérios, as β -1,3-glucanases são encontradas dentro de 4 Classes Enzimáticas (tabela 1) (NC-IUB 1983; Schomburg e Salzmann 1991).

Atividades de β -1,3-glucanases são amplamente distribuídas, sendo encontradas em bactérias, fungos, plantas e mais recentemente, em animais (<http://www.brenda-enzymes.info/>) (tabela 1).

Tabela 1 - Classes enzimáticas com atividade sobre β -1,3-glucanas e grupo de organismos onde são encontradas.

E.C.	Nome	Descrição	Grupos de organismos
3.2.1.6	endo-1,3(4)- β -glucanase	Hidrólise interna de ligações (1-3) ou (1-4) em β -glucanas quando o resíduo de glicose cujo grupo redutor está envolvido na ligação a ser hidrolisada é ligado à unidade glicosídica anterior pelo carbono 3	Bactéria Fungos Insetos
3.2.1.39	glucan-endo-1,3- β -D-glucosidase	Hidrólise de ligações glicosídicas do tipo (1-3) em β -(1-3)-glucanas	Bactéria Fungos Plantas Insetos
3.2.1.58	glucan-1,3- β -glucosidase	Hidrólise sucessiva de unidades de β -D-glicose da ponta não redutora de β -(1-3)-glucanas, liberando o anômero α da glicose	Bactéria Fungos Plantas Insetos
3.2.1.73	licheninase	Hidrólise de ligações glicosídicas β -(1-4) em β -glucanas contendo ligações (1-3) e (1-4)	Bactéria Fungos Plantas

O segundo critério agrupa as enzimas com base nas suas sequências primárias de amino-ácidos, um critério comum atualmente para classificação de proteínas e genes. A homologia entre as sequências define as diferentes famílias das Glicosídeo-Hidrolases, onde as β -1,3-glucanases estão inseridas (Davies e Henrissat 1995;

Coutinho e Henrissat 1999). As características estruturais e mecánísticas são compartilhadas entre os membros de cada família. Elas apresentam a mesma estrutura tridimensional, o mesmo produto liberado (retentoras ou inversoras), e a mesma estratégia de catálise, com os resíduos catalíticos conservados. Atualmente, as β -1,3-glucanases são classificadas em 10 famílias (3, 5, 7, 8, 12, 16, 17, 55, 64 e 81), sendo que a família 7 contém apenas uma β -1,3(4)-endoglucanase com ampla especificidade, originária de um fungo acidófilo (Luo *et al.*, 2010). As famílias 8, 55, 64 e 81 são inversoras, enquanto as famílias 3, 5, 12, 16, 17 são retentoras. Este mecanismo de catálise é desconhecido na família 7.

1.5. β -1,3-glucanases digestivas de insetos

Em muitas ordens de insetos, β -1,3-glucanases digestivas apresentam atividade enzimática considerável (Collembola, Trichoptera, Dictyoptera, Orthoptera, Isoptera, Coleoptera e Diptera). Nesses insetos, essas enzimas podem atuar na digestão de hemiceluloses vegetais, no caso de herbívoros, ou de β -1,3-glucanas provenientes de fungos, no caso de detritívoros (Terra e Ferreira 1994).

Atualmente, apenas β -1,3-glucanases de *Periplaneta americana* (LIC1, 42kDa; PLAM, 45 kDa) (Genta *et al.*, 2003), *Abracris flavolineata* (ALAM, 45 kDa) (Genta *et al.*, 2007) e *Tenebrio molitor* (TLAM, 50 kDa) (Genta, 2004) foram purificadas até a homogeneidade e caracterizadas cineticamente em detalhe.

As laminarinases purificadas do tubo digestivo de *P. americana* apresentam especificidades diferentes entre si, e algumas delas são capazes de lisar células de

fungos, de acordo com o hábito onívoro-detritívoro do inseto (Genta *et al.*, 2003).

É muito comum observar nas despolimerases de carboidratos o ataque múltiplo das cadeias de substrato (também chamada de processividade) e inibição por concentrações elevadas de substrato. Processividade, ou grau de ataque múltiplo, é o número de ligações glicosídicas clivadas após a primeira, durante a formação de um complexo enzima-substrato. Para isso, após a hidrólise da primeira ligação e saída de parte do substrato, a porção que continua ligada à enzima é reposicionada, para um segundo ciclo catalítico. Nas carboidrases, a processividade entre enzimas pode ser comparada com base na proporção entre produtos solúveis e insolúveis em etanol. A enzima com alta processividade produz mais glicose e oligômeros (mais solúveis em etanol) do que produtos maiores (insolúveis em etanol). Dessa forma, quanto maior esta relação, mais processiva é a enzima.

Esse fenômeno foi inicialmente descrito em amilases (Robyt e French 1967) e posteriormente foi visto em celulasas, quitinases, pectinases (Kramhøft *et al.*, 2005), carragenases (Michel *et al.*, 2001b) e poligalacturonase (Benen *et al.*, 1999).

Em uma poligalacturonase, cujo substrato é carregado, mostrou-se que a troca de um só resíduo de aminoácido torna uma enzima processiva em não (Kramhøft *et al.*, 2005) processiva e o reverso também acontece (Benen *et al.*, 1999). É possível que mecanismos de processividade dependentes de somente um resíduo de amino-ácido ocorram quando o substrato é carregado.

Alguns autores concluem que proteínas que envolvem completamente seus substratos no sítio ativo, em estruturas semelhantes a um anel ou túnel, são mais processivas que aquelas em que esse envolvimento é só parcial (Breyer e Matthews

2001). Há celobiohidrolases (Varrot *et al.*, 2003), celulasas (Breyer e Matthews 2001), carragenases (Michel *et al.*, 2001b) que tem o sítio ativo em forma de túnel. Entretanto, há despolimerases que não possuem o sítio ativo em forma de túnel, cuja processividade é concedida pela presença de motivos ligantes do substrato, como a celulase E4 de *Thermonospora fusca* (Irwin *et al.*, 1998). Estes autores demonstraram que a enzima selvagem tem uma processividade de 7, e que sem os motivos ligantes de substrato a enzima torna-se não processiva.

A ocorrência de um segundo sítio de ligação de substrato em enzimas que possuem sítio ativo em forma de fenda e que não possuem domínios de ligação de carboidratos tem sido evidenciada em alguns casos. Alguns autores sugeriram seu envolvimento na processividade, embora nenhum experimento conclusivo tenha sido feito. As α -amilases apresentam esse tipo de estrutura e podem ser bastante processivas. A α -amilase pancreática de porco tem um grau de ataque múltiplo de 6 (Robyt e French 1967). Ela possui 3 sítios de ligação de substrato: um próximo ao centro da fenda onde estão os grupos catalíticos; um na extremidade dessa fenda e o terceiro na superfície da proteína (Larson *et al.*, 1994).

A presença de dois sítios de ligação para substrato, um na fenda onde estão os grupos catalíticos e outro na superfície da molécula, foi evidenciado também na β -agarase da bactéria *Zobellia galactanivoras* (Allouch *et al.*, 2004), que pertence a família 16 das glicosídeo hidrolases. As duas cadeias de carboidrato co-cristalizadas com a enzima ficam paralelas e suas porções não redutoras distam 16 Angstrons uma da outra.

A estrutura da k-carragenase de *Pseudoalteromonas carrageenovora* foi utilizada

para modelar a conformação da β -1,3-glucanase do molusco *Mizuhopecten yessoensis* a partir de sua sequência (ambas proteínas pertencente a família 16 das glicosídeo hidrolases) (Kozhemyako *et al.*, 2004). Supostos complexos da enzima de molusco com laminarihexaose mostraram ligação no sítio ativo e em um outro sítio na superfície da molécula.

Foram observadas mudanças conformacionais em muitas despolimerases de carboidratos. Na celobiohidrolase de Cel6A de *Humicola insolens* o sítio ativo está presente em um túnel que abre e fecha em resposta a ligação de substrato (Varrot *et al.*, 2003). Na iota-carragenase de *Alteromonas fortis* a presença de substrato faz com que um de seus domínios mudem de conformação, formando um túnel onde o substrato se liga (Michel *et al.*, 2001a).

Um fenômeno comum em carboidrases que digerem polímeros e oligômeros é a inibição por substrato. Essa pode ocorrer quando a enzima tem uma grande extensão responsável por ligar o substrato e cada molécula deste associa-se com uma porção do sítio ativo (Dixon e Webb 1979). Um evento que leva a uma aparente inibição por substrato é a transglicosilação (Terra e Ferreira 1994). Durante a catálise, nas carboidrases há inicialmente a saída de parte do substrato do sítio ativo e a parte restante é transferida para uma molécula de água. Na reação de transglicosilação ela é transferida para um outro carboidrato. Quando a concentração de substrato aumenta, esse pode tornar-se o acceptor do produto remanescente da enzima. Desse modo esse produto não é detectado e o que se verifica com o aumento da concentração de substrato é uma queda na velocidade de formação de produto.

A laminarinase de *Abracris flavolineata* (Orthoptera), que aparentemente

pertence a família 16 das glicosídeo hidrolases, apresenta evidências cinéticas da participação de um segundo sítio de ligação do substrato na processividade da enzima (Genta *et al.*, 2007). Essa laminarinase sofre inibição por altas concentrações de substrato e mostrou-se que ela é resultante da perda de processividade, o que nunca foi demonstrado antes para nenhuma carboidrase. De acordo com os autores, a ligação do substrato na enzima de *Abracris flavolineata* se dá com mais afinidade nesse sítio acessório. A evidência desse fenômeno é que a modificação química de alguns resíduos de aminoácidos importantes para a catálise é aumentada em baixas concentrações de substrato, e somente em altas concentrações desse a modificação é impedida, indicando ligação ao sítio ativo nessas concentrações mais altas. Outra indicação da maior afinidade do sítio acessório pela laminarina é o fato dessa, em baixas concentrações, aumentar a clivagem de metil-umbeliferil- β -glicosídeo (MU β Glu), que é muito baixa sem a presença de laminarina. Em concentrações maiores, o polímero inibe a hidrólise de MU β Glu. Como há aumento na reatividade de certos grupos e na clivagem de MU β Glu em baixas concentrações de laminarina, a enzima deve sofrer mudanças conformacionais quando o sítio acessório é ocupado pelo polímero. Concomitante ao aumento da concentração de substrato e inibição da enzima, ocorre também perda de processividade, até a enzima tornar-se não processiva. Como a afinidade do sítio acessório é maior que do sítio ativo, a perda de processividade provavelmente ocorre quando ambos estão ocupados. Um modelo que explica o papel do sítio acessório na processividade é que o substrato seja transferido sucessivamente entre esse e o sítio ativo. O fato da enzima possuir um segundo sítio de ligação ao substrato é bastante plausível, uma vez que ela deve pertencer a família

16 das glicosídeo hidrolases, onde esses sítios já foram demonstrados, e outras laminarinases de insetos se agrupam (Genta *et al.*, 2003 e este trabalho).

Nenhuma enzima de inseto tinha sido sequenciada antes de iniciarmos esse trabalho, mas havia algumas proteínas ligantes de β -glucana dessa classe de animais pertencentes à família 16. Entretanto, algumas proteínas consideradas como ligantes de glucanas (Bulmer e Crozier 2006) contêm os resíduos catalíticos e devem ser verdadeiras β -glucanases (ver abaixo sobre GNBPs).

As laminarinases digestivas de *Spodoptera frugiperda* e *Abracris flavolineata* constituem modelos importantes para estudos enzimológicos. A β -1,3-glucanase de *S. frugiperda* apresenta um pH ótimo de 9,0 (resultados preliminares deste trabalho), sendo que dentro da família 16 das glicosídeo-hidrolases a laminarinase com pH mais alcalino (pH 7,02) pertence ao *Bacillus licheniformis* (Planas 2000). Da mesma forma, não existe nenhuma estrutura de laminarinase de eucarioto, exceto uma proteína do fungo *Phanerochaete chrysosporium* (Vasur *et al.*, 2006), supostamente uma β -1,3(4)-glucanase, que compartilha apenas cerca de 20% de identidade com as laminarinases digestivas de insetos. Como descrito anteriormente, a laminarinase de *A. flavolineata*, por sua vez, apresenta dados cinéticos que sugerem um mecanismo de catálise baseado em um sítio acessório, não encontrado em outras laminarinases já caracterizadas.

1.6. Proteínas Ligantes de β -glucanas (β GRPs)

Os insetos possuem proteínas não enzimáticas que ligam β -glucanas, e são

envolvidas em mecanismos de defesa contra fungos e bactérias. As β -glucanases digestivas de insetos são relacionadas evolutivamente com as β GRPs. Estas proteínas são consideradas Proteínas Reconhecedoras de Padrão (Pattern-Recognition Proteins - PRPs) de moléculas tipicamente encontradas em patógenos. Essas assinaturas moleculares são chamadas de Padrão Molecular Associado a Patógenos (Pathogen Associated Molecular Pattern - PAMP), que promovem uma resposta do sistema imune inata (Janeway e Medzhitov 2002). Nos animais onde foram detectadas, são encontradas na hemolinfa ou em ovos, em resposta a desafios com microorganismos (Fabrick *et al.*, 2003; Gorman *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2004). Elas apresentam alta similaridade com o domínio catalítico da β -glucanase de *Bacillus circulans*, e de outros organismos; todas enzimas da família 16 (Keitel *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2000; Ma e Kanost 2000; Ochiai e Ashida 2000; Lee *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Warr *et al.*, 2008). Nessas proteínas ligantes de glucanas, os resíduos de glutamato responsáveis pela catálise são substituídos por outros resíduos. Isso é verdade para as proteínas de *Bombyx mori* (GenBank AB026441 e L38591), *Manduca sexta* (AF177982), *Plodia interpunctella* (AF532603) e *Tenebrio molitor* (AB108841). Provavelmente as proteínas ligantes se originaram a partir de enzimas, perdendo a capacidade catalítica, mas mantendo a propriedade de reconhecer o substrato.

1.7. Objetivos deste trabalho

As β -1,3-glucanases são encontradas com alta atividade em insetos. Essas enzimas não ocorrem em mamíferos, oferecendo alvos estratégicos para o controle de

insetos praga. Dados sobre essas enzimas são bastante escassos, seja no que se refere às suas propriedades cinéticas, estrutura, função ou sítio de secreção.

No intuito de aumentar o conhecimento sobre essas enzimas em insetos, nossos objetivos nesse trabalho são: a) obter a sequência primária das β -1,3-glucanases oriundas de diferentes ordens para determinar a qual família das glicosídeo-hidrolases elas pertencem; b) clonar o cDNA codificante da β -1,3-glucanase de *Abracris flavolineata*, para obter uma enzima recombinante que permita testar o modelo proposto por Genta *et al.*, 2007; c) obter a sequência e verificar os sítios de síntese e secreção da β -1,3-glucanase majoritária presente no intestino de *Tenebrio molitor*, que teve suas propriedades cinéticas determinadas anteriormente (Genta, 2004); e c) caracterizar a β -1,3-glucanase intestinal do Lepidoptera *Spodoptera frugiperda* e verificar quais as bases moleculares da modulação do pH ótimo elevado desta enzima.

2. Material e Métodos

2.1. Material Biológico. Criações de insetos

Larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) foram criadas de acordo com o método de (Parra, 1986). As larvas foram acondicionadas individualmente em tubos de vidro com uma dieta à base de feijão (*Phaseolus vulgaris*), gérmen de trigo, levedo e ágar e mantidas sob fotoregime natural a 25°C. Os adultos foram alimentados com uma solução de mel 10%. Para os experimentos foram utilizadas larvas do quinto ínstar de ambos os sexos com o intestino repleto de alimento.

Ninfas e adultos de *Abracris flavolineata* (Orthoptera) foram criados em gaiolas de 30x30x40 cm³ com estrutura de madeira e paredes de tela de arame, com orifícios quadrados de 1mm de largura. As gaiolas foram mantidas em uma sala com fotoregime (12:12), temperatura (26°C) e umidade (70%) controladas. Os animais foram alimentados com folhas frescas de malvavisco (*Malvaviscus* sp.) e papel úmido.

Adultos e larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera) foram criados em farelo de trigo dentro de caixas de madeira de 30x30x40 cm³, em uma sala com temperatura 26°C, umidade 70% e luminosidade constante. As larvas de último ínstar foram recolhidas para dissecação.

2.2. Dissecação e preparação de frações solúveis.

As larvas de *S. frugiperda* foram dissecadas em solução de cloreto de sódio 125mM a 4°C. Após a remoção do tubo digestivo, foram retiradas traquéias, túbulos de

Malpighi, corpos gordurosos e o intestino posterior. Separou-se o epitélio do ventrículo da membrana peritrófica com o conteúdo. Para experimentos de purificação da laminarinase digestiva, a membrana peritrófica com o conteúdo foi homogeneizada em água bidestilada gelada em um homogeneizador de Potter-Ehveljem (10 movimentos de subida e descida do pistilo). Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 10.000x g. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e utilizado para ensaios enzimáticos. A concentração final de utilização das preparações era de 1 animal por mL. Para experimentos de distribuição de atividade laminarinásica digestiva, o epitélio ou a membrana peritrófica mais conteúdo luminal foram fracionados igualmente em porção anterior, média e posterior, e preparados da mesma forma descrita anteriormente, exceto pela concentração final de utilização das preparações. Para o epitélio e a membrana peritrófica mais conteúdo a concentração final era de 5 e 1 animal por mL, respectivamente.

Fêmeas e machos adultos de *A. flavolineata*, ao sofrerem leve pressão abdominal, regurgitam um líquido esverdeado rico em enzimas digestivas. O regurgitado coletado foi diluído 2 vezes em solução de PTC 1 mM.

Larvas de *T. molitor* foram dissecadas em solução de cloreto de sódio 342 mM a 4 °C. Após a separação do tubo digestivo completo, foram retiradas glândulas salivares, túbulos de Malpighi e o intestino posterior. O material restante (intestino anterior mais ventrículo) foi homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador tipo Potter-Ehveljem acoplado a um homogeneizador mecânico (Tecnal, modelo TE-039) em água bidestilada gelada. Após dez movimentos de subida e descida do pistilo, o material foi recolhido e centrifugado a 4 °C por 10 minutos a 10.000x g. O sobrenadante (fração

solúvel) foi usado para ensaios enzimáticos. O precipitado foi descartado. O volume das preparações foi acertado para uma concentração de 48 animais por mL. Para purificação de β -1,3-glucanases realizou-se a homogeneização em tampão Imidazol 20mM; CaCl_2 10mM; PTC 10mM; pH 7.

Porções de farelo de trigo foram homogeneizadas em água bidestilada, utilizando um homogeneizador mecânico (Sorvall, modelo Omni-Mixer) através de três pulsos de 6.000 rpm com um minuto de duração, intercalados por 30 segundos de repouso. Após o ciclo inicial de homogeneização, o material foi submetido a sonicação por 3 ciclos de 30 segundos, com intervalos de mesma duração (Eurosonics, modelo SX-20), sendo então exposto a novo ciclo de homogeneização em Omni-Mixer. Após centrifugação (4 °C, 10.000x g, 10 minutos) coletou-se o sobrenadante, o qual foi filtrado em lã de vidro. O precipitado foi ressuspenso em água bidestilada.

2.3. Purificação da laminarinase de *S. frugiperda*

2.3.1. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Hitrap Q (Pharmacia, Suécia)

1 mL da fração solúvel de ventrículos de larvas de *S. frugiperda* homogeneizados em tampão TAPS 20 mM pH 8 e CaCl_2 10 mM foi aplicado manualmente com uma seringa em uma coluna Hitrap Q (1 mL). O material não-ligado foi coletado.

2.3.2. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Mono Q (Pharmacia, Suécia)

O material coletado na cromatografia do item anterior foi diluído 10 vezes em

tampão CAPS 20 mM pH 10,5 e CaCl_2 10 mM, e aplicados em uma coluna Mono Q (1 mL) acoplada ao sistema cromatográfico Äkta FPLC (Amersham Pharmacia, Suécia), equilibrada no mesmo tampão. Após a aplicação, a coluna foi lavada com 5 mL desse tampão. Proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino (20 mL) de 0 a 1 M de NaCl, sendo então passados pela coluna 5 mL de tampão contendo NaCl 1 M. Usou-se um fluxo de 1 mL/min e coletaram-se frações de 0,4 mL. As frações com maior atividade sobre laminarina foram reunidas.

2.4. Purificação da β -1,3-glucanase majoritária de *T. molitor*

2.4.1. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Hitrap Q (Pharmacia, Suécia)

2,5mL da fração solúvel de ventrículos de larvas de *T. molitor* homogeneizados em tampão Imidazol 20 mM; CaCl_2 10 mM; PTC 10 mM; pH 7 foram aplicados em uma coluna Hitrap Q (1 mL) acoplada ao sistema Äkta FPLC e equilibrada com tampão Imidazol 20 mM; CaCl_2 10 mM; pH 7. Após a aplicação da amostra, lavou-se a coluna com 5 mL desse tampão. Proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino (20 mL) de 0 a 1 M de NaCl e uma lavagem com 5 mL de tampão contendo NaCl 1 M. Usou-se um fluxo de 2 mL/min e coletaram-se frações de 1 mL. As frações com maior atividade sobre foram reunidas.

2.4.2. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Mono Q (Pharmacia, Suécia)

O material recolhido após a cromatografia do item anterior foi diluído 10 vezes

com tampão Imidazol 20mM; CaCl_2 10mM; pH 7. 150 mL do material diluído foram aplicados com o auxílio de um Superloop de 150 mL (Pharmacia, Suécia) em uma coluna Mono Q (1 mL) acoplada a um sistema cromatográfico de alta pressão e equilibrada nesse tampão. Após a aplicação (fluxo de 4 mL/min), a coluna foi lavada com 5mL do tampão inicial (fluxo de 1 mL/min). Proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino (20 mL) de 0 a 1 M de NaCl e de 5 mL de tampão contendo NaCl 1 M. Usou-se um fluxo de 1 mL/min e coletaram-se frações de 0,4 mL. As frações com maior atividade sobre laminarina foram reunidas.

2.4.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica em coluna Resource PHE (Pharmacia, Suécia)

O material recolhido após a cromatografia do item anterior foi combinado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de maneira a obter uma concentração do sal de 1 M e aplicado (2 mL) em uma coluna Resource PHE (1 mL) acoplada ao sistema cromatográfico Äkta FPLC e equilibrada com tampão MES 50 mM; CaCl_2 10 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M; pH 6. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 5 mL desse tampão. Proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino (60 mL) de 1 a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e uma lavagem com 5 mL de tampão sem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Usou-se um fluxo de 1 mL/min e coletaram-se frações de 0,4 mL. As frações com maior atividade sobre laminarina foram reunidas.

2.4.4. Cromatografia de Filtração em Gel em coluna Superdex 75 (Pharmacia, Suécia)

Alíquotas de 500 µL do material recolhido após a cromatografia anterior foram aplicadas em uma coluna Superdex 75 HR10/30 acoplada a um sistema cromatográfico (Äkta FPLC) e equilibrada com tampão citrato-fosfato 100 mM; CaCl₂ 10 mM; pH 6. Proteínas foram eluídas da coluna com 30 mL desse tampão. Usou-se um fluxo de 1 mL/min e coletaram-se frações de 0,4 mL. As frações com maior atividade sobre laminarina foram reunidas para estudo (material TLAM).

2.5. Purificação da β-1,3-glucanase de *A. flavolineata*

2.5.1. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Hitrap Q (Pharmacia, Suécia)

80 µL do regurgitado de *A. flavolineata* foram diluídos 40 vezes em tampão Imidazol 20 mM pH 7,0 e CaCl₂ 10 mM, e aplicados em uma coluna Hitrap Q (1 mL) equilibrada nesse tampão e acoplada a um sistema de cromatografia líquida (Äkta FPLC, Amersham Pharmacia). Após a aplicação, a coluna foi lavada com 10 mL do mesmo tampão. Proteínas ligadas à coluna foram eluídas com um gradiente salino (20 mL) de 0 a 1 M de NaCl, e com 5 mL de tampão com 1 M de NaCl. Usou-se um fluxo de 2 mL/min e coletaram-se frações de 1 mL. As frações com maior atividade sobre laminarina foram reunidas.

2.5.2. Cromatografia de Filtração em Gel em coluna HiTrap Desalting (Pharmacia, Suécia)

O material reunido após a cromatografia do item anterior foram aplicados com

uma seringa em uma coluna HiTrap Desalting equilibrada em tampão CAPS 20 mM pH 10,5 e CaCl_2 10 mM. Após a aplicação, a coluna foi lavada com 10 mL do mesmo tampão. Foram coletados os primeiros 2 mL, estando a coluna pronta para nova corrida após o término da lavagem.

2.5.3. Cromatografia de Troca Aniônica em coluna Mono Q (Pharmacia, Suécia)

2mL do material coletado na cromatografia do item anterior foram aplicados em uma coluna Mono Q (1 mL) acoplada ao sistema cromatográfico Äkta FPLC (Amersham Pharmacia, Suécia), equilibrada em tampão CAPS 20 mM pH 10,5 e CaCl_2 10 mM. Após a aplicação, a coluna foi lavada com 5 mL desse tampão. Proteínas ligadas à coluna foram eluídas através de um gradiente salino (20 mL) de 0 a 1 M de NaCl, sendo então passados pela coluna 5mL de tampão contendo NaCl 1 M. Usou-se um fluxo de 1 mL/min e coletaram-se frações de 0,4 mL. As frações com maior atividade sobre laminarina foram reunidas.

2.5.4. Cromatografia de Filtração em Gel em coluna Superose 12 (Pharmacia, Suécia)

500 μL do material reunido após a cromatografia anterior foram aplicados em uma coluna Superose 12 HR10/30 acoplada ao sistema cromatográfico Äkta FPLC e equilibrada com tampão citrato-fosfato 100 mM pH 6 CaCl_2 10 mM. As proteínas foram eluídas com 30 mL desse tampão. Usou-se um fluxo de 0,5 mL/min e coletaram-se frações de 0,4 mL. As frações com maior atividade sobre laminarina foram reunidas

para caracterização (material ALAM).

2.6. Criação de larvas de *T. molitor* em dietas diferentes

12 larvas do último ínstar foram mantidas por 48 horas em tubos Falcon de 15 mL com 2 g de farelo esterilizado ou 2 g de farelo esterilizado com *Escherichia coli*, *Micrococcus lisodeikticus* ou *Pichia pastoris* em uma concentração final de 10% (m/m). Os Falcons foram acondicionados em estufa a 30°C, sob condições de fotoperíodo controlado (12:12) e umidade natural.

2.7. Análise do perfil de atividade sobre laminarina

As frações solúveis dos ventrículos de larvas de *T. molitor* do item anterior foram submetidas ao ensaio de atividade enzimática *in-gel*, por eletroforese não-desnaturante (PAGE). O gel foi analisado com o programa ImageJ (Sheffield 2007) gerando perfis de atividade com base nas bandas reveladas com TTC (item 2.8).

2.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), em condições não-desnaturantes (PAGE) e ensaio de atividade de β -glucanase *in-gel*

Amostras a serem aplicadas em SDS-PAGE foram dialisadas contra água milliQ (Millipore), liofilizadas e suspensas em tampão Tris-HCl 60 mM pH 6,8; SDS 2,5% (p/v); 2-mercaptoetanol 0,36mM; EDTA 0,5mM; glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,005% (p/v). Após serem aquecidas por 4 minutos a 95°C as amostras foram

aplicadas em um gel de poliacrilamida 12% (p/v) contendo SDS 0,1% (p/v) Laemmli, 1970. As placas de eletroforese foram submetidas a uma corrente de $0,2 \text{ mA/cm}^2$ e coradas com prata (Blum *et al.*, 1987), ou Coomassie Blue R (0,1%, p/v, em metanol:ácido acético:água 50:10:40, v/v/v) por 30 minutos, sendo então lavado por 2 horas com a mistura de solventes acima. Valores de massa molecular foram calculados a partir da comparação com proteínas de massa molecular conhecida: Fosforilase B (97,4 kDa), Albumina Sérica Bovina (66,2 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (31 kDa), Inibidor de Tripsina de Soja (SBTI, 21,5 kDa), Lisozima (14,4 kDa). Para cálculos de massa molecular usou-se a relação linear entre o logaritmo da massa molecular e a migração relativa à linha de frente (R_f) no gel Stryer, 1996.

Amostras a serem aplicadas em eletroforese não-desnaturante foram dialisadas contra água MilliQ, liofilizadas, suspensas em tampão Tris-HCl 60 mM pH 6,8; glicerol 10% (v/v), e azul de bromofenol 0,005% (p/v) e aplicadas em um gel de poliacrilamida 0,5% contendo o substrato (laminarina) 0,5% (p/v). As placas de eletroforese foram submetidas a uma corrente de $0,2 \text{ mA/cm}^2$ a 4°C , sendo então lavadas 3 vezes com tampão MES 20 mM pH 6.0 contendo CaCl_2 10mM por 5 minutos com agitação. Após a lavagem, incubou-se o gel em câmara úmida a 30°C . O gel ao término da incubação é mergulhado em uma solução de TTC 0,15% (p/v) em NaOH 1 M e aquecido no forno de microondas em ciclos de 10 segundos até o aparecimento de bandas vermelhas Manchenko, 1994.

2.9. Cromatografia em camada delgada de sílica dos produtos de ação enzimática

10 µL de ensaios de SLam sobre laminarina foram aplicados em uma placa de cromatografia delgada de sílica G de 0,25mm de espessura (Stahl 1969). A fase móvel usada para separação foi butanol:etanol:água 50/30/20 (v/v/v), sendo a cromatografia realizada em atmosfera saturada com a fase e ao longo de 15cm da placa cromatográfica. Os carboidratos presentes foram evidenciados pela técnica do fenol-ácido sulfúrico (Stahl 1969).

2.10. Ensaios enzimáticos

Afora mencionado, quantificou-se a hidrólise dos substratos laminarina, liquenana, carboximetilcelulose (CMC), xilana, dextrana, pectina e β -glucana de *S. cerevisiae* na concentração de 0,25% (p/v); amido solúvel em 0,5% (p/v). A β -glucana de *S. cerevisiae* foi preparada como já descrito (Manners *et al.*, 1973).

Para todos os substratos acima acompanhou-se a formação de grupos redutores com o reagente ácido dinitrosalicílico, com dosagem de absorbância no comprimento de 550 nm (DNS) (Noelting e Bernfeld 1948).

Ensaios referentes a *A. flavolineata* e *T. molitor*, afora mencionado, foram realizados em tampão fosfato 50 mM pH 6. Ensaios referentes a *S. frugiperda* foram realizados, afora mencionado, em tampão Gly-NaOH 50 mM pH 9.

Nos ensaios sobre sacarídeos, uma unidade de atividade enzimática (U) é a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 µmol de ligações glicosídicas por minuto

(NC-IUB 1983).

2.11. Determinação de proteína

Determinou-se a concentração de proteína nas amostras com os reagentes Coomassie Blue G Bradford, 1976 ou ácido bicinchonínico/cobre (Smith *et al.*, 1985). Em todos os casos, utilizou-se ovoalbumina para confecção da curva padrão.

2.13. Quantificação de β -1,3-glucana e carboidratos totais

A quantidade total de carboidrato foi determinada com fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), e a quantidade de β -1,3-glucana (calose) por Aniline Blue (Evans *et al.*, 1984). A fluorescência é medida a 484 nm, com excitação a 394 nm. Os valores são comparados com amostras de pachyman ou laminarina com quantidades conhecidas.

2.14. Digestibilidade de β -1,3-glucana presente na dieta de *S. frugiperda*

12 amostras da dieta artificial e fezes de *S. frugiperda* alimentadas com a dieta correspondente foram liofilizadas e submetidas à quantificação de β -1,3-glucana por Aniline Blue. A digestibilidade foi calculada pela fórmula $(I-F)/I$, sendo que I é a quantidade de β -1,3-glucana contida na dieta (m/m) e portanto ingerida pela larva, e F a quantidade de β -1,3-glucana excretada nas fezes (m/m).

2.16. Cálculo do potencial eletroestático da superfície de proteínas

O mapa de potencial eletroestático da superfície de SLAM e TLAM foi gerado através do programa Delphi (Rocchia *et al.*, 2002), que resolve a equação de Poisson-Boltzmann a partir das coordenadas atômicas no formato Protein Data Bank (pdb). O programa considerou as proteínas em um solvente de pH 7,0. Os parâmetros foram: constante dielétrica externa da proteína 80, interna 4,0; Resolução de coordenadas (lattice) em número de grades por ângstrons de 2,0; porcentagem do lattice que a maior das dimensões lineares x, y ou z preencheria de 40%; raio padrão da sonda de molécula de água 1,4 e concentração de sal (0). Os arquivos gerados continham o valor das energias e o mapa do potencial. A distribuição do potencial eletroestático foi mapeado na superfície molecular utilizando o programa PyMol (DeLano Inc.)

2.17. Sequenciamento interno de fragmentos de ALAM e TLAM

As proteínas a serem sequenciadas foram submetidas à SDS-PAGE, reveladas com Coomassie e excisadas do gel. O material foi enviado ao serviço de Espectrometria de Massa da Universidade de Columbia (Protein Core Facility) para que a proteína fosse sequenciada. Bandas de gel SDS-PAGE contendo a proteína purificada foram transferidas para microtubos de polipropileno e adicionado 100 uL de DDT 0,01 M/Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, e incubado por 1-2 hs a 55 °C. Após resfriamento a temperatura ambiente, o líquido foi substituído por 100 uL de iodoacetamida 0,015 M/Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, e o microtubo incubado a temperatura ambiente, na ausência de luz, por 30 min. As bandas foram então lavadas com 200 uL de tampão Tris-HCl 0,05 M pH

8,5/acetonitrila 25% (v/v), e duas vezes no mesmo tampão, mas com acetonitrila 50% (v/v) por 20 min, com agitação. Após remoção das soluções de lavagens, as bandas foram liofilizadas em um concentrador à vácuo. A proteína contida nas bandas de gel foi tripsinizada por 16 hs a 32 °C. Os peptídeos trípticos foram extraídos duas vezes com 50 uL acetonitrila 50% (v/v)/ácido trifluoroacético 2% (v/v). Os sobrenadantes foram combinados e evaporados para 10 uL, com adição de 10 uL de ácido fórmico 0,1% (v/v), estando prontos para análise em LC-MS/MS. Est análise foi feita no espectômetro de massas "Micromass Q-Tof hybrid quadrupole/time-of-flight", com uma fonte de nanoeletrospray. A voltagem capilar foi definida em 1,8 kV com voltagem cônica de 32 V; a energia de colisão foi definida de acordo com a massa e carga do íon, de 14 eV a 50 eV. A cromatografia foi realizada em um HPLC LC Packings equipado com uma coluna C18 (PepMap), com um gradiente linear de acetonitrila com fluxo de 200 uL/min. Os dados gerados foram processados com o software MassLynx ProteinLynx, e arquivos pkl foram analisados pelo algoritmo Mascot (<http://www.matrixscience.com>).

2.18. Determinação de processividade

Ensaio enzimático sobre laminarina foram combinados com etanol absoluto (concentração final 90% v/v), e incubados a -20 °C por 1 hora, sendo então centrifugados a 4°C por 10 minutos a 15.000x g. Separou-se o sobrenadante do precipitado e posteriormente evaporou-se o solvente dos dois materiais sob vácuo à temperatura ambiente. Após a liofilização, a quantidade de grupos redutores presente em cada fração foi quantificada com a técnica do ácido dinitrosalicílico (Noelting e

Bernfeld 1948). A quantidade de glicose no sobrenadante foi quantificada por Tris-Glicose Oxidase (TGO; (Dahlqvist, 1968)).

O grau de ataque múltiplo (ou processividade) de uma glucanase é definido como o número de ligações glicosídicas hidrolisadas sequencialmente após o primeiro evento catalítico, ao longo de um ciclo de ligação ao substrato. Para uma endoglucanase, experimentalmente, é a razão entre a quantidade molar de produtos solúveis em etanol (oligosacarídeos com grau de polimerização pequeno) e a quantidade molar de produtos insolúveis (grau de polimerização grande) gerados a partir do polissacarídeo hidrolisado (Robyt e French 1967).

2.19. Imunocitocalização por microscopia confocal

A imunocitocalização por microscopia confocal foi feita usando o anticorpo produzido contra laminarinase recombinante (descrito mais abaixo). O intestino médio de *S. frugiperda* foi dissecado como descrito anteriormente, e o epitélio inteiro transferido imediatamente para a solução fixadora (Stefanin *et al.*, 1967) onde permaneceria por 16 h a 4°C. As amostras foram desidratadas gradualmente em etanol, embebidas em parafina e cortadas em secções de 12 µm. As secções de tecido foram recolhidas em placas de vidro e a parafina removida com xilenol. Depois da hidratação as secções foram lavadas com tampão PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1,05M NaCl, 2 mM KH₂PO₄) contendo 0,2% (v/v) de triton X-100 por 1 h a temperatura ambiente, em seguida foram lavados com tampão PBS e incubados com o anticorpo anti laminarinase em uma diluição 1:200 em PBS contendo 0,1% (p/v) albumina sérica

bovina e 0,01% NaN_3 por 16 horas a 4°C. Como controles seções foram incubados com soros pré-imune ou PBS nas mesmas condições descritas acima. As amostras foram então lavadas em temperatura ambiente e incubadas com anticorpo secundário, anti-IgG de coelho produzido em mula, ligado a fenilisotiocianato (FITC) – (Sigma, St Louis, USA, diluído 1:100). Após lavagens em PBS a temperatura ambiente, os cortes foram montados em Vectashield (Vector Labs., Inc., USA) e examinados em microscópio confocal Zeiss LMS 410. Outros controles foram feitos incubando os cortes com PBS mais BSA e NaN_3 ; PBS mais Alexa fluor 488; PBS mais BSA, NaN_3 e FITC.

2.20. Imunocitocalização por microscopia eletrônica de transmissão

A imunocitocalização por microscopia eletrônica foi feita utilizando o anticorpo produzido contra a laminarinase recombinante (descrito mais abaixo). O epitélio do intestino médio de *S. frugiperda* foi dissecado e dividido em três partes de tamanho aproximadamente iguais. A porção média foi descartada e as regiões dos extremos anterior e posterior do epitélio transferidas separadamente para a solução de fixação (glutaraldeído 5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4). Os tecidos fixados foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de etanol a temperatura ambiente e, finalmente, embebidos em resina acrílica L.R. White (Agar Aids, USA) por 24 horas a 50°C. Secções finas de tecido foram obtidas em ultramicrotomo e transferidas para telas de níquel.

A cada um dos cortes foi aplicada uma gota TBS (Tris 0,1 M, NaCl 0,3 M, NaN_3 0,1 % p/v) contendo albumina sérica bovina 1% (TBS-BSA). Após 30 minutos foi

adicionado o anticorpo anti laminarinase em uma diluição de 1:200 em TBS-BSA e incubado por 90 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o corte foi lavado com TBS-BSA e incubado com anticorpo anti-IgG de coelho, produzido em cabra, conjugado a partículas de 10 nm de ouro coloidal. Esse último foi diluído na proporção de 1:15 em tampão TBS-BSA. Os cortes foram finalmente lavados com ddH₂O e corados com acetato de urânio e citrato de chumbo. Controles tiveram o anticorpo primário omitido. Todos os cortes foram visualizados em um microscópio eletrônico de transmissão Phillips 301.

2.21. Determinação de K_m e inativação térmica das enzimas

O efeito da concentração de substrato na atividade da β -1,3-glucanase foi determinada utilizando 10 concentrações diferentes de laminarina. Valores de K_m e velocidade máxima foram determinadas pela regressão linear fornecida pelo programa Enzfitter (Elsevier Biosoft).

A inativação térmica a 52 °C de enzima parcialmente purificada foi estudada incubando amostras em tampão Gly-NaOH 20 mM, pH 9, CaCl₂ 10 mM, seguida da determinação da atividade residual sobre laminarina em diferentes tempos de inativação.

2.22. Reação em cadeia com DNA polimerase (PCR) e iniciadores para sequenciamento do cDNA de β -glucanases e para expressão das proteínas recombinantes

As PCRs foram realizadas em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,4 contendo KCl 50

mM, gelatina 0,01% (p/v), Triton X-100 0,1% (p/v), MgCl₂ 1,5 mM e dNTPs 0,2 mM. Cada reação consiste em 1 ciclo inicial de 10 minutos a 94 °C para que ocorra a desnaturação das proteínas da cápsula do fago e a exposição do DNA viral. Em seguida, são realizados 35 ciclos, constituídos de três fases. Na primeira há uma incubação por 45 segundos a 94 °C para desnaturação da dupla-fita do DNA; na segunda incuba-se o material por 30 segundos à temperatura de pareamento de cada iniciador, e na terceira por 1,5 minuto a 72 °C para alongamento da nova fita de DNA. Os iniciadores utilizados estavam em uma concentração final de 1 µM, juntamente com 5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). O DNA molde é especificado em cada caso.

Para obter sequências de cDNA de β-1,3-glucanase de insetos, uma biblioteca de cDNA do tubo digestivo de *S. frugiperda*, *D. saccharalis*, *P. americana* ou *T. molitor* foram utilizadas como DNA molde. As bibliotecas foram confeccionadas pela Stratagene segundo método já descrito (Ferreira *et al.*, 2001).

Com base nas sequências de nucleotídeos codificantes de β-1,3-glucanases do ouriço do mar *Strongylocentrotus purpuratus* (código de acesso no Genbank: NM214516), e dos moluscos *Chlamys rosealbus* (DQ093348) e *Pseudocardium sachalinensis* (AY308829), projetamos um iniciador degenerado (GH16) correspondente a uma região conservada de laminarinases da família 16 das glicosídeo-hidrolases. Sua sequência é 5' GWG AYT GGM TTT GGC CAG C 3'. As letras W e Y representam resíduos de nucleotídeos que podem constituir pontes de hidrogênio com outros resíduos de forma menos específica, e as extremidades 5' e 3' indicam o sentido das ligações entre os nucleotídeos. Sequências parciais de β-1,3-glucanases obtidas de cada biblioteca foram amplificadas com sucesso, e completadas utilizando-se

iniciadores específicos para cada caso:

S. frugiperda

Rv: 5' TCC TGT GTA CCG ATA TGG AC 3'

D. saccharalis

Rv: 5' TGT GAC GGT TGC CAC GTG 3'

P. americana

Rv: 5' ATA CAC CCA GTT CTT TGG 3'

T. molitor

Fw: 5' GTG AGA TTG ACA TAA TGG 3'

Rv: 5' CCA TTA TGT CAA TCT CAC 3'

Rv: o DNA polimerizado a partir do iniciador ocorre no sentido 3' > 5'.

Fw: idêntico ao Rv, porém no sentido 5' > 3'.

Estes iniciadores foram utilizados em uma PCR com iniciadores T3 ou T7, cujas sequências pareiam nos braços do fago em que a biblioteca de cDNA foi construída.

Para expressão da proteína recombinante correspondente à laminarinase clonada de *S. frugiperda* (SLam) e *T. molitor* (TLAM), as sequências completas foram utilizadas para desenhar os iniciadores específicos descritos a seguir.

pET28A:

Sf.Fw: 5' GGA ATT CCA TAT GTG CAC CCC CAG TTT GAC CAC CGT C 3'

Sf.Rv: 5' TAT CAA ATG CGG CCG CCAAAG CCC AGA TGC GGA CGT AGT C 3'

pAE:

Sf.Fw: 5' CGA GGG ATC CGA TGC ACC CCC AGT TTG ACC ACC 3'

Sf.Rv: 5' CCA TGG TAC TTA CAA AGC CCA GAT GCG GAC AGT 3'

pPIC9K:

Sf.Fw: 5' GTA GAA TGC ACC CCC AGT TTG ACC ACC GTC 3'

Sf.Rv: 5' CCT AGG TTA CAA AGC CCA GAT GCG GAC AGT 3'

Tm.Fw: 5' CTC GAG TGT GCG ACT CCC AGT CCC ACG AGG GCC AGC 3'

Tm.Rv: 5' GCG GCC GCC AGG GCC CAA ATT TTT ACA TAA TCA ATT 3'

Sf: *S. frugiperda*; Tm: *T. molitor*; Fw e Rv: iniciadores para polimerização no sentido 3' e 5', respectivamente. Os códons codificantes de cada proteína estão sublinhados.

2.23. Tentativas de clonagem da β -1,3-glucanase de *Abracris flavolineata*

Diversas estratégias foram empregadas para obter uma sequência correspondente à laminarinase de *A. flavolineata* (ALAM).

Sem dispor de uma biblioteca de cDNA, iniciamos os experimentos a partir dos tecidos do animal. O RNA total do intestino médio ou das glândulas salivares foram extraídos, e utilizados para produção do cDNA correspondente. Os animais foram anestesiados em gelo e dissecados com materiais esterilizados. O tecido de interesse foi limpo de contaminantes, e imediatamente congelado em gelo seco/etanol. Para a purificação do RNA total foi utilizado o kit “RNAeasy Mini Kit” (Qiagen), seguindo as

instruções do fabricante.

O cDNA foi sintetizado com o Kit “SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen). 5 µg do RNA total ou purificado (Oligotex, Qiagen) foram utilizados, e este foi combinado a 10 mM de dNTP mix e 0,5 µg de oligo-dT(Q) ou iniciador degenerado (ver abaixo). A seguir a amostra foi incubada a 75°C por 10 minutos, com posterior adição de 10X RTbuffer, 25 mM MgCl₂, 0,1 M DTT e 1 unidade de RNaseOUT (inibidor recombinante de RNase). A seguir a amostra foi incubada a 42 °C por 2 min, foram adicionadas 50 unidades de Super Script II RT (transcriptase reversa) e a amostra foi incubada novamente a 42 °C por 90 minutos, para que a enzima transcrevesse o DNA a partir do RNA mensageiro. Para finalizar a reação a amostra foi incubada a 70 °C por 15 minutos, e adicionando-se a seguir 1 unidade de RNaseH para despolimerizar o RNA mensageiro, com incubação de 20 minutos a 37°C.

Para amplificar possíveis sequências de DNA correspondente à ALAM, foram utilizados iniciadores degenerados baseados no sequenciamento direto da proteína digestiva purificada do animal. Esses iniciadores foram utilizados tanto para amplificar fragmentos de DNA a partir do cDNA produzido com oligot-dT(Q) quanto para experimentos de 3' RACE. As sequências dos iniciadores são: 5' NTA YGG NGG NTG GCC 3' (Af1), 5' NGG NGA RAT HGA YAT 3' (Af2), 5' AAY CAR TGY ACN AAY CC 3' (Af3) e 5' NTT YTG GGG NTA YGG 3' (Af4). As letras H, N, R, W e Y representam resíduos de nucleotídeos que podem constituir pontes de hidrogênio com outros resíduos de forma menos específica. Os fragmentos de DNA amplificados foram ligados a vetor plasmidial pGEM-T EasyVector (Promega) e posteriormente utilizados para transformar células *E. coli* XL1-Blue. Os transformantes tiveram o vetor purificado, e os

insertos sequenciados. Essas etapas são descritas abaixo com mais detalhes.

Uma segunda estratégia consistiu na construção de uma biblioteca de cDNA de *Abracris flavolineata*. Inicialmente, os cDNAs foram amplificados através de uma PCR com hexâmeros aleatórios e as ssDNA obtidas por PCR com Transcriptase Reversa (Invitrogen). Os materiais utilizados correspondem aos cecos e intestino médio ou às glândulas salivares. Os fragmentos amplificados foram ligados em vetor pGEM-T EasyVector (Promega), e utilizados para eletroporação de *E. coli* (DH10B).

Alternativamente, uma outra tentativa foi realizada com o kit "Creator SMART cDNA Library Construction Kit", Clontech, segundo as instruções do fabricante, mas utilizando somente o RNA dos cecos e intestino médio.

ALAM foi purificada e submetida ao sequenciamento interno de peptídeos trípticos (ver item 2.17), para servir de base à síntese de iniciadores degenerados. A sequência dos iniciadores são:

SGEID.Af: 5' NTAYGGNGGNTGGCC 3'

SgeidAf1RV: 5' TCMACKATGTCRATCTC 3'

SgeidAf2RV: 5' CACDCCDCCWGCDGGCCA 3'

SgeidAf1FW: 5' NTAYGGYGGWTGGCC 3'

SgeidAf2FW: 5' TGGCCHGCWTCHGGHGAGAT 3'

SgeidAf3FW: 5' WTCHGGHGAGATYGACAT 3'

NQC.Af: 5' AATCARTGYACHAAYCC 3'

GfwAf1RV: 5' CCDCCRTANCCCCTTRAA 3'

Nucleotídeos designados pelas letras N, M, K, R, W, Y, H são considerados degenerados, pois são capazes de parear com outros de forma menos específica.

2.24. Eletrofore de DNA em gel de agarose

Para analisar os fragmentos de DNA derivados da amplificação com PCR foram feitas eletroforeses em gel de agarose. Os géis foram preparados na concentração final de 1% (p/v) de agarose em tampão TAE (Tris-Acetato 8 mM, EDTA 0,4 mM, pH 8,5) e as amostras de DNA eram resolvidas em uma diferença de potencial de 80-100 V.

Ao material a ser separado por eletroforese foi adicionado um tampão de amostra (0,1 volumes da amostra) contendo azul de bromofenol. Este último era usado para monitorar a migração da amostra e determinar o encerramento da eletroforese. Após a eletroforese, o DNA era evidenciado utilizando-se brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado em transiluminador de luz UV (312 nm). Os fragmentos de DNA foram recuperados diretamente dos géis de agarose usando um protocolo de extração do Kit Gel extraction kit (250) (Qiagen), 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.

2.25. Clonagem do DNA amplificado por PCR a plasmídeos vetores

Para a clonagem de fragmentos de DNA obtidos de amplificações por PCR, utilizamos o Kit de Ligação “pGEM-T Easy vector System I” (Promega). Foi usada uma mistura de reação que consistia de 1 U de T4 DNA ligase, tampão apropriado, plasmídeo (pGEM-T) e o produto de PCR (purificado do gel de agarose) ou total (biblioteca de cDNA de *A. flavolineata*); o plasmídeo e o produto de PCR foram misturados numa concentração de 1:3, e incubadas por 16h a 4°C. Os produtos de

ligação foram utilizados para transformar bactérias competentes *E. coli* XL1-Blue ou DH10B (pGEM-T-Abr).

Para inserir fragmentos de DNA ao vetor pET-28a, tanto o inserto quanto o vetor foram digeridos com *NotI* e *NedI*, purificados do gel de agarose e a seguir foram misturados numa proporção de seis volumes de inserto para um volume de vetor sendo adicionado uma unidade de T4 DNA ligase (Gibco) e tampão apropriado. Esta mistura foi incubada a 16°C por 16 horas, e o plasmídeo vetor resultante portanto o inserto (pET-28A-lam) usado para transformar bactérias competentes *E. coli* BL21(DE3).

Para construir os plasmídeos de expressão pET-28A, pAE ou pPIC9K com os insertos correspondente à SLam ou TLAM, os insertos e vetores correspondentes foram digeridos com enzimas de restrição de acordo com a tabela 2.

Tabela 2. Vetores de expressão, enzimas de restrição e linhagens de bactérias e levedura correspondentes utilizadas para expressão de SLam e TLAM recombinantes.

	SLam			TLAM
Vetores de expressão	pET-28A	pAE	pPIC9K	pPIC9K
Enzimas de restrição	<i>NotI</i> e <i>NedI</i>	<i>BamHI</i> e <i>NcoI</i>	<i>Avr II</i> e <i>EcoR I</i>	<i>XhoI</i> e <i>NotI</i>
Células e linhagens	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3), Origami (DE3), GroEL/ES, pLysS, Star-pLysS ou Rosetta-gami-pLysS	<i>P. pastoris</i> (GS115)	<i>P. pastoris</i> (GS115)

Os produtos digeridos foram purificados do gel de agarose e combinadosH numa proporção de três volumes de inserto para um volume de vetor, com uma unidade de T4 DNA ligase (Gibco) e tampão apropriado. A reação de ligação foi incubada a 16°C por 16 horas, e os plasmídeos vetores portando cada inserto utilizado

para transformar bactérias competentes *E. coli* XL1-Blue para propagação plasmidial. Os clones de bactérias contendo as construções verificadas por sequenciamento foram selecionadas, e seus vetores purificados utilizados para transformar as células competentes correspondentes para expressão de SLam ou TLAM (tabela acima).

2.36. Preparo e eletroporação de células de *E. coli* (DH10B)

E. coli DH10B (Invitrogen) foram estriadas em placas de meio LB, contendo tetraciclina 15 µg/mL e incubadas a 37 °C por 15 horas. Posteriormente, uma colônia isolada foi inoculada em 3 mL de meio LB líquido com antibiótico na mesma proporção anterior, e crescidas a 37 °C por 15 horas a 200 rpm. Cerca de 2,5 mL de pré-inóculo foram transferidos para 250 mL de meio LB líquido fresco e crescidos por 2-3 horas nas mesmas condições anteriores, até DO_{600nm} atingir 0,5. As células bacterianas foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis, incubadas em gelo/água por 15 minutos e posteriormente coletadas por centrifugação 4.000 rpm, 15 minutos a 4 °C (*Rotor SS-34 SORVALL*). O sedimento foi ressuspensão em 250 mL de água destilada estéril gelada, e centrifugado nas condições anteriores. A etapa de lavagem foi repetida por mais duas vezes, as células ressuspensas em 25 mL de glicerol 10% gelado e submetidas a centrifugação novamente. Por fim, as bactérias foram ressuspensas em 500 µL de glicerol 10%, aliquotadas em volumes de 40 µL em microtubos estéreis. As alíquotas foram imediatamente congeladas em banho de gelo seco/etanol e estocadas a -70 °C.

Na transformação por eletroporação, aproximadamente 0,1 µg do DNA plasmidial (pGEM-T-Abr) foram adicionados a 50 µL de células competentes e a

mistura foi transferida para uma cubeta (*gene pulser cuvette* 0,1 cm, *BIO-RAD*) previamente resfriada em gelo. Em seguida, as células foram submetidas a eletroporação sob as seguintes condições: 2.0 kV, 25 μ F e 186 Ω em eletroporador *BTX eletroporation system – electro cell manipulator 600*. Imediatamente foi adicionado 1mL de meio LB, sendo a suspensão bacteriana transferida para tubo de cultura e incubada a 37 °C por 40 minutos a 200 rpm. Após essa recuperação, 10, 30, 100 e 860 μ L (centrifugados a 5000x g por 1 min e ressuspensos em 200 μ L de meio LB cada) de cultura foram plaqueados em meio LB-ágar contendo carbenicilina 100 μ g/mL.

2.28. Preparo de bactérias competentes para transformação por choque térmico

Uma colônia isolada da *E. coli* da linhagem XL1-Blue foi crescida em meio LB-líquido durante 16 horas, a 37 °C e sob agitação de 250 rpm. Em seguida 400 mL de LB líquido eram inoculados com 4 mL desta cultura inicial e mantidos nas mesmas condições anteriores de crescimento até que se atingisse uma $DO_{600nm} = 0,5$. As células eram então transferidas para tubos de centrífuga previamente resfriados e mantidas no gelo por 10 minutos. Em seguida eram sedimentadas por centrifugação (1.600x g; 5 min; 4 °C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo as células era ressuspensionado em 40 mL de solução previamente autoclavada de $CaCl_2$ 0,1 M. As células permaneciam no gelo por pelo menos uma hora. Esse material era novamente precipitado por centrifugação (1.000x g; 5 min; 4 °C), as células eram ressuspensas em 1 mL de solução de $CaCl_2$, era adicionado glicerol numa concentração final de 15%, as células eram alíquotadas e mantidas a -80 °C. Estas alíquotas continham as células

prontas para a transformação.

2.29. Transformação de bactérias por choque térmico e seleção dos clones transformantes

As bactérias da linhagem XL1-Blue de *E. coli*, previamente preparada como descrito no item anterior, foram transformadas com uma construção que consistia de um produto de PCR ligado ao vetor pGEM-T.

O volume total do meio de reação de ligação dos fragmentos ao plasmídeo vetor é adicionado a 100 µg/mL de células competentes e mantido em gelo por 30 min. Em seguida as células são submetidas a um choque térmico a 42 °C por 90 segundos e retornam ao gelo por mais 2 minutos. 0,5 mL de LB-liquído são adicionados e as células mantidas a 37 °C por 1 hora para a recuperação e expressão do gene de resistência a ampicilina (presente no plasmídeo “pGEM-T Easy vector” usado na transformação). Em seguida, as células são plaqueadas em LB-ágar contendo ampicilina (50 µg/mL) e IPTG/Xgal (eram adicionados 40 µl de IPTG 100 mM e de Xgal 50 mg/mL às placas LB-ágar de 100 mm, espalhados com uma alça de Drigalski sobre a superfície da placa) e mantidas a 37 °C durante 16 horas. As bactérias transformadas com o plasmídeo contendo o inserto cresciam nestas placas originando colônias brancas.

2.30. Preparação de plasmídeos a partir de cultura de bactérias

Os plasmídios foram preparados a partir de 3 mL de cultura de bactérias, crescidas em meio líquido, usando o protocolo “Wizard Miniprep” (Promega). As bactérias eram precipitadas por centrifugação e ressuspendidas em tampão Tris-HCl 50

mM pH 7,5 contendo EDTA 10 mM e RNase A 100 µg/mL. Em seguida, realizava-se uma lise alcalina usando uma solução de NaOH 0,2 M e SDS 1% (p/v) e a solução neutralizada pela adição de uma solução de acetato de potássio 1,32 M, pH 4,8. Esta mistura era centrifugada (10.000x g; 5 min; temperatura ambiente) e o sobrenadante aplicado em uma mini-coluna contendo uma resina de troca iônica. A coluna era lavada com tampão acetato 80 mM, EDTA 40 µM e etanol 55% (v/v) para a retirada do material contaminante. Finalmente, o plasmídeo era eluído da coluna com água MilliQ. O rendimento e a pureza da amostra de plasmídeo eram avaliados através de determinação da absorbância a 260 nm e 280 nm.

2.31. PCR a partir de material obtido de colônias de bactérias

Para que possamos fazer uma triagem mais refinada das colônias com bactérias que apresentam o inserto, é realizado um PCR utilizando DNA das colônias de bactérias como molde. Esse procedimento consiste em um PCR como já descrito anteriormente, mas os iniciadores se anelam às regiões do vetor flanqueando o inserto. As amostras de DNA molde são obtidas das colônias do meio sólido. Após o PCR, o tamanho do fragmento de DNA amplificado revela quais colônias possuem um inserto do tamanho esperado.

2.32. Purificação dos plasmídeos a partir das bactérias transformadas

Os plasmídeos foram preparados a partir de 3 mL de cultura de bactérias selecionadas *E. coli* XL1-Blue, que apresentaram o inserto desejado. As bactérias são

crescidas em meio líquido, usando o protocolo “Wizard Miniprep” (Promega). Posteriormente, são centrifugadas e ressuspendidas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo EDTA 10 mM e RNase a 100 μ M/mL. Em seguida realiza-se uma lise alcalina usando uma solução de NaOH 0,2 M e SDS 1% (p/v), que é neutralizada pela adição de uma solução de acetato de potássio 1,32 M pH 4,8. Esta mistura é então centrifugada (10.000x g, 15 min, temperatura ambiente) e o sobrenadante é aplicado em uma mini-coluna contendo uma resina de troca iônica. A coluna é lavada com tampão acetato 80 mM, EDTA 40 mM e etanol 55% (v/v) para a retirada do material contaminante. Finalmente o plasmídeo é eluído da coluna com água MilliQ autoclavada pH 7,0. O rendimento e a pureza da amostra de plasmídeo eram avaliados através da determinação da absorbância a 260 nm e 280 nm.

2.33. Expressão da SLam em linhagens de *E. coli*

Para expressão da laminarinase recombinante foram utilizadas células de *E. coli*, de diversas linhagens: BL21(DE3), Origami (DE3), GroEL/ES, pLysS, Star-pLysS ou Rosetta-gami-pLysS, transformadas com os vetores correspondentes, como descrito anteriormente. Após a transformação, 10 clones foram pré-inoculados em 3 mL de meio LB contendo o antibiótico correspondente ao vetor na concentração de 40-60 μ g/mL, e crescidos a 25, 30 ou 37 °C por 15 horas a 200 rpm. Em seguida, as culturas foram diluídas para DO_{600nm} igual a 0,1 em meio LB contendo antibiótico na mesma concentração anterior, sendo incubadas nas temperaturas correspondentes. Quando a cultura atingiu uma DO_{600nm} de 0,4, uma alíquota de 1 mL foi retirada (cultura não-

induzida), submetida a centrifugação de 16.000x g por 5 minutos a temperatura ambiente, sendo o sobrenadante retirado e o precipitado ressuspenso em 100 µL de tampão de amostra para eletroforese (Tris 50 mM pH 6,8; DTT 25 mM; glicerol 10%; SDS 1% e azul de bromofenol 0,025%). As amostras foram estocadas a -20 °C até utilização. O IPTG (Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) foi então adicionado a essa cultura para concentração final de 1 mM e alíquotas da suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas após 3 horas de incubação e processadas da mesma forma.

O perfil de indução da proteína recombinante foi analisado por separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 12% contendo SDS (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Os géis foram corados com Coomassie Blue R (0,1%, p/v, em metanol:ácido acético:água 50:10:40, v/v/v) por 30 minutos, sendo então lavado por 2 horas com a mistura de solventes acima.

2.34. Teste de solubilidade e purificação da SLam expressa em *E. coli*

Para os testes de solubilidade as culturas bacterianas foram induzidas como descrito acima, e o precipitado bacteriano foi ressuspenso em 1 mL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 7,0; NaCl 100 mM; imidazol 10 mM; PMSF 1 mM e glicerol 10%), e submetido a sonicação com 3 pulsos de 15 segundos cada, *out put* 3 (BRANSON *Sonifier 450*) com intervalos em gelo de 1 minuto entre cada pulso. O lisado foi centrifugado a 10.000x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e o sedimento ressuspenso em 1mL do tampão anterior sendo ambos analisados em SDS-PAGE (Laemmli 1970).

A proteína recombinante, presente somente na forma insolúvel, foi submetida à purificação de afinidade com coluna de níquel (HisTrap Crude FF) conforme instruções do fabricante (GE Healthcare).

2.35. Preparo e eletroporação de células de *P. pastoris*

P. pastoris GS115 (Invitrogen) foram estriadas em placas de meio YPD sólido, e incubadas a 37 °C por 15 horas. Posteriormente, uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio YPD líquido e crescidas a 37 °C por 15 horas a 200 rpm. Cerca de 0,5 mL de pré-inóculo foram transferidos para 500 mL de meio YPD líquido e crescidos por 16 horas nas mesmas condições anteriores, até DO_{600nm} atingir 1.5. As células foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis e coletadas por centrifugação 3.000 rpm, 5 minutos a 4 °C (*Rotor SS-34 SORVALL*). O sedimento foi ressuspensão em 250 mL de água destilada estéril gelada, e centrifugado nas condições anteriores. A etapa de lavagem foi repetida por mais duas vezes, as células ressuspensas em 25 mL de sorbitol 1 M gelado e submetidas a centrifugação novamente. Por fim, as bactérias foram ressuspensas em 1,5 mL de sorbitol 1 M, aliquotadas em volumes de 80 µL em microtubos estéreis. As alíquotas foram imediatamente utilizadas para eletroporação.

A transformação de *P. pastoris* foi realizada segundo instruções do fabricante (Invitrogen). Resumidamente, após a transformação de células de *E. coli* XL1-Blue, clones contendo a construção pPIC9K-lam foram selecionados para propagação de plasmídeo (Plasmid Midi Kit, Qiagen). A construção foi linearizada com a endonuclease *Sac I*, purificada, e 10 ug utilizados na eletroporação de *P. pastoris* (GS115)

eletrocompetente.

Para confirmar a inserção do vetor de expressão no DNA genômico, células de *P. pastoris* foram digeridas com a laminarinase digestiva de *T. molitor* purificada, e o DNA extraído com Trizol (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. O iniciador específico AOX 5' (álcool-oxidase) foi utilizado para sequenciar o vetor inserido.

2.36. Expressão da laminarinase recombinante de *S. frugiperda* em *P. pastoris*

A expressão da laminarinase recombinante em *Pichia pastoris* (GS115) foi realizada conforme instruções do fabricante (Invitrogen). De forma resumida, após a transformação de células de *P. pastoris* com a construção pPIC9K-SLam linearizada, clones contendo a inserção do cassete de expressão foram selecionados com Geneticina (Sigma, USA) de forma crescente, chegando a 2 ug/mL. Os clones resistentes foram inoculados em meio YPD líquido, o qual foi trocado pelo meio de cultura para expressão BMM. Metanol foi adicionado como indutor da expressão, durante 5-6 dias. O sobrenadante foi coletado e utilizado como fonte de enzima.

2.37. Purificação da laminarinase recombinante de *S. frugiperda* expressa em *P. pastoris*

Após indução de cultura de GS115/SLAM em meio BMM, o sobrenadante foi submetido à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Methyl Sepharose EconoPac (BioRad, EUA). O sobrenadante obtido no item anterior foi combinado com NaCl de forma a obter uma concentração final do sal de 5 µM. Em um aparelho de

cromatografia líquida (Äkta FPLC, Amersham Pharmacia, Suécia), esse material foi aplicado em uma coluna Methyl Sepharose EconoPac (5 mL) equilibrada com tampão MES 20 mM pH 6. Após a aplicação da amostra, lavou-se a coluna com 10 mL desse tampão, seguidos de um gradiente linear decrescente de 100 mL de tampão sem NaCl. As frações, de 1 mL, com maior atividade sobre laminarina foram reunidas.

2.38. Ensaio de lise de células de *Saccharomyces cerevisiae*

A enzima purificada a partir da expressão da SLAM recombinante em *P. pastoris* ou a fração solúvel do ventrículo de *S. frugiperda* ou a enzima purificada originária do tubo digestivo de *S. frugiperda* foram incubadas na presença de células de *S. cerevisiae* (linhagem S14, cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Pedro Araújo, IQ-USP) nas concentrações de 5-11 Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) por microlitro em meio hipotônico (tampão GLY 10 mM pH 9 com CaCl_2 5 mM). Células nas mesmas condições somente com tampão foram usadas como controle. Após diferentes tempos de incubação, alíquotas de 50 μL foram retiradas e plaqueadas em meio sólido YPDA (Johnston *et al.*, 1994). Aos 24 horas de crescimento a 30°C, o número de UFCs restantes foram anotadas.

2.40. RT-PCR semi-quantitativa

Os animais foram anestesiados em gelo e dissecados com materiais esterilizados. Para estudo da distribuição de SLam, o intestino médio foi dividido em três partes iguais. O tecido de interesse teve o conteúdo luminal retirado, e foi

imediatamente congelado em banho de gelo seco/etanol. Para a purificação do RNA total foi utilizado o kit “RNAeasy Mini Kit” (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

Para sintetizar a primeira fita de cDNA a partir do RNAm extraído do animal de interesse, foi usado o Kit “SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen), segundo instruções do fabricante.

O cDNA gerado foi utilizado como molde numa reação de PCR, em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,4 contendo KCl 50 mM, gelatina 0,01% (p/v), Triton X-100 0,1% (p/v), MgCl₂ 1,5 mM e dNTPs 0,2 mM. Os iniciadores correspondentes estavam em uma concentração final de 1 uM, juntamente com 5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Cada reação consiste de 35 ciclos, constituídos de três fases. Na primeira há uma incubação por 45 segundos a 94 °C para desnaturação da dupla-fita do DNA; na segunda incuba-se o material por 30 segundos na temperatura específica para cada iniciador, e na terceira por 1,5 minuto a 72 °C para alongamento da nova fita de DNA.

A quantidade de ciclos de PCR é definida empiricamente pela detecção da quantidade crescente de DNA em géis de agarose ainda na fase logarítmica. O controle positivo e de quantidade de RNAm foi feito com a β -actina de cada animal. O DNA amplificado no estudo da distribuição de SLam e o controle β -actina foram separados por eletroforese em gel de agarose, e analisado quanto à densiometria das bandas com o programa ImageJ (Sheffield 2007). Os valores referentes à SLAM foram normalizados pelos de β -actina em cada amostra, e somados para representar o total de SLAM expressa na larva inteira. O valor de SLAM normalizado em cada amostra foi dividido por esse total, representando a quantidade de SLAM produzida em cada amostra de

forma comparável com as outras.

2.42. Produção de anti-corpos policlonais a partir de imunização de coelhos com SLAM recombinante

Na imunização de um coelho macho foi utilizado uma amostra de 100 µg de laminarinase recombinante purificada e quantificada como descrito anteriormente. Antes da imunização, um volume total de 5mL de sangue foi retirado do coelho para a obtenção do soro pré-imune. Para a primeira imunização, 720 µg de proteína recombinante foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 12%. Após a corrida, o gel foi corado com um procedimento de coloração com prata específico para amostras a serem aplicadas em espectrometria de massa (Yan *et al.*, 2000), que permite a descoloração. As bandas correspondentes à proteína de interesse foram excisadas dos géis, e descoradas com uma solução de ferricianeto e tiosulfato de sódio (Westermeier 2004) e homogeneizadas com o auxílio de homogeneizador tipo Potter-Ehveljem em tampão de amostra para SDS-PAGE. Após incubar o homogeneizado das bandas por uma noite à temperatura ambiente, esse material foi fervido e reaplicado no gel, nas mesmas condições. Após a coloração com prata, as bandas correspondentes à laminarinase foram novamente recortadas e descoradas, sendo então homogeneizadas com homogeneizador Potter-Ehveljem em água MilliQ. Amostras desse homogeneizado (contendo 100 µg de proteína) foram utilizadas para fazer injeções em coelhos. Inicialmente, uma amostra é emulsificada com um volume equivalente de adjuvante completo de Freund (produto Sigma nº F5881), sendo então injetada intramuscularmente em diferentes pontos das costas do coelho. Após um mês, nova injeção é realizada, sendo a amostra emulsificada com adjuvante de Freund incompleto

(produto Sigma nº F5506). O anti-corpo foi semi-purificado de acordo com o procedimento já estabelecido (Jordao *et al.*, 1996). O sangue coletado (pré-imune e imune) foi incubado por 1 hora a 37 °C, seguindo-se incubação a 4 °C por uma noite. Esse material foi submetido a centrifugação a 3000 x g por 10 minutos a 4 °C. Ao sobrenadante (soro) foi adicionada uma solução de sulfato de amônio saturada pH 6,8 numa proporção 1:1. Essa etapa foi seguida de incubação por uma noite à temperatura ambiente, e centrifugado 5000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado obtido foi ressuspenso em solução 50% saturada de sulfato de amônio pH 6,8 e submetido a centrifugação nas mesmas condições anteriores. O precipitado final foi ressuspenso em 2mL de NaCl 0,1M e dialisado por 20 horas contra 1000 volumes de 0,1 M de NaCl a 4 °C com uma troca da solução de NaCl. Por fim, o material obtido foi aliquotado e mantido a -80 °C.

2.43. Western-blots

Após eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (poro 0.45 mm; BioRad, USA, (Towbin *et al.*, 1979). A eficiência da transferência foi confirmada pela visualização dos padrões de peso molecular pre-corados (BioRad, USA) na membrana. Após um passo de bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo primário numa proporção 1:100 em TBS (tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, com 0.15 M NaCl), contendo 0,05% de Tween 20 (TBS-T) por 2 h em temperatura ambiente (25 °C). Após lavagens com o mesmo tampão, as membranas foram incubadas com 0,08% 4-cloro-1-naftol em TBS

contendo 0,1% de peróxido de hidrogênio, até que bandas cinzas surgissem. O reagente foi preparado pela adição de um volume de 0,5% cloro-naftol em metanol para 5 volumes de TBS com peróxido de hidrogênio. Soro pre-imune foi usado para demonstrar que o anti-soro era específico.

2.44. Reação de sequenciamento de DNA

Para o sequenciamento de DNA foi utilizado o método de interrupção da reação de polimerização do DNA com o uso de didesoxirribonucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977). As amostras a serem sequenciadas foram entregues ao serviço de sequenciamento do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. A reação de sequenciamento foi realizada usando 500 ng de DNA molde, 1 μ L de iniciador na concentração de 3,3 pmol/ μ L, 2 μ L de “Terminator Ready Reaction Mix” (Perkin Elmer), 6 μ L de tampão Tris-HCl 200 mM pH 9,0; 5 mM MgCl₂ para um volume final de 20 μ L. As reações foram realizadas num termociclador em um método de 40 ciclos que consiste de incubações sequenciais de 10 segundos a 96 °C, 5 segundos a 50 °C, 4 minutos a 50°C. Nessa técnica de sequenciamento automático cada um dos quatro didesoxirribonucleotídeos usados apresentam-se ligados a grupos fluorescentes distintos, o que facilita a detecção dos produtos da reação de sequenciamento no gel de poliacrilamida.

2.45. Análise das seqüências obtidas

Os eletroferogramas dos clones sequenciados foram automaticamente processados quanto ao sinal das bases, fragmentos de baixa qualidade e do vetor e reunidos usando os algoritmos PhredPhrap e Consed 2.6 (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>) (Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998). A qualidade de todas as seqüências reunidas encontra-se acima de 30. Os contigs obtidos foram analisados usando os programas BLAST (Altschul *et al.*, 1990); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), Signal IP (Bendtsen *et al.*, 2004); <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), NETOGlyc 3.1 (Julenius *et al.*, 2005); <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), NETNGlyc 1.0 (R. Gupta, E. Jung e S. Brunak, manuscrito em preparação, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) e Prot Param (Gasteiger *et al.*, 2003); <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) disponíveis na internet. Alinhamentos com seqüências homólogas e geração de seqüências consenso foram realizados usando o algoritmo CLUSTAL (Higgins, 1994); <http://www.csc.fi/molbio/progs/clustalw/>) e o software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

3. Resultados

3.1. Clonagem e sequenciamento do cDNA de β -1,3-glucanase de insetos

Para obter sequências de cDNA codificantes de β -1,3-glucanases de insetos, três sequências de β -1,3-glucanases animais (oriundas de molusco e um equinodermo) da família 16 foram alinhadas, revelando uma região conservada referente à região do sítio catalítico (Fig 4). Com base nessa região, um iniciador de oligonucleotídeos degenerado para PCR foi projetado (GH16).

<i>C. rosealbus</i>	CTGTATTACACGGGACCATGGACCTTTACCAACTGTGGCATAAGTGCACCCAGCATGACAAC	307
<i>P. sachalinensis</i>	TTGAATTCGCAACCATGGACTTAACAGCTCTGTATGGTTACTGTACTAACGCTGATAGA	706
<i>S. purpuratus</i>	CTGGAACGTTAGACCTTTGGGGTTATCCCCAGC - TAACCTGTGTACCGGTAATGCATGG	832
	* * * * * * * * * * * *	
<i>C. rosealbus</i>	AACGGTTGTCAAAAACACTCCTATGGCGGCAA - CAGTGAGATCCTGCCCCCGGTCATGTC	366
<i>P. sachalinensis</i>	TATGGTTGTATCAGA - - - - - GAGGGTAG - GAATGGCATTCTCCACCTGTGTATGTC	756
<i>S. purpuratus</i>	TATGGATGTTTCGCGAACGGGACCAATGATAATCTATTGAATCCGATA - - CAGTC - TGCT	889
	* * * * * * * * * * * * * * * *	
<i>C. rosealbus</i>	TGGCAAGATCACCACCAACCTTGC - - GATGACATACGGACGTGTCAATGTACGCGCAAAG	424
<i>P. sachalinensis</i>	AGGCAAGATCAAATCAAAGAAAAC - - CATTAGATTTGGTAAAGTTGAAGCCAGATGCAGA	814
<i>S. purpuratus</i>	CGTCTACGTACTGTGCAATCTTTCTCATTCAAGTATGGACGACTGGAGGTTGAGGCTAAG	949
	* * * * * * * * * * * * * * * *	
<i>C. rosealbus</i>	ATTCCGAAGGGAGACTGGCTTTGGCCAGCCATGTGGATGTTGCCCGAGATTGGAGTTAT	484
<i>P. sachalinensis</i>	ATACCACGCGGTGACTGGATTTGGCCAGCTATTTGGATGTTGCCAAGAGATAGTGATAC	874
<i>S. purpuratus</i>	CTACCCACTGGTGATTGGCTTTGGCCAGCTATCTGGCTTTTGCCKAAGCATACCGGATAT	1009
	* * * ** * * * * * * * * * * * * *	
<i>C. rosealbus</i>	GGTGGCTGGCCACGATCGGGAGAGATTGATATCATGGAATCCCGAGGTAATACAAAGGCT	544
<i>P. sachalinensis</i>	GGTGGATGGCCACGTTCTGGTGAAATTGACATGATGGAAGACAGAGGCAATACTGTTGCT	934
<i>S. purpuratus</i>	GAGGARTGGCTGCCTCYGGAGAATAAGATCTGGTTGAAGAGCAGAGGTAACGCTGATATC	1069
	** * ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * *	
<i>C. rosealbus</i>	GTA - - TTGTGG - GGCCAAAATTGCGGAGTCAACTATGTTGCTTCAACACTTCACTGGGGT	601
<i>P. sachalinensis</i>	AGAGATGGTTCGGGACACAACCATGGCGTAAATGAAGTAGGTC - - AC - CTGCACTGGGA -	990
<i>S. purpuratus</i>	AAAGAYCGGATGGTTTTRTCAGCTGGRGTAGATCAGATGGGCTCTACTATGCATTGGGGA	1129
	* ** * * * * * * * * * * * * * *	
<i>C. rosealbus</i>	CCAGACTCCAACCACAACAAATTCAGAAAACACAGGATCAAGAGGAAAGTCCGGAGGT	661
<i>P. sachalinensis</i>	CCAGATGCCGGTCATAATAGATTCAGTAAGACGCACTGGT - - - - - GACTTAGACGGT	1042
<i>S. purpuratus</i>	CCATTCTGGCCTCTGAACGGATATCCAAGACACAGCAACAAAGTTCTACGTGGATGAT	1189
	** * * * * * * * * * * * * * * *	

Fig 4 – Alinhamento parcial em Clustal das sequências codificantes de β -(1,3)-glucanases da família 16, pertencentes a *C. rosealbus*; *P. sachalinensis*; *S. purpuratus*. Em fundo cinza, a região conservada utilizada para projetar o iniciador degenerado GH16.

O iniciador GH16 foi utilizado em reações de PCR usando como molde de DNA a biblioteca de cDNA construída a partir do epitélio intestinal de larvas de *S. frugiperda*, *D. saccharalis* e *P. americana*, resultando em diversos produtos de PCR (Fig 5).

Fig 5. Separação após eletroforese em gel de agarose de fragmentos de DNA amplificados a partir de biblioteca de cDNA de epitélio intestinal de *S. frugiperda* (raia 1), *D. saccharalis* (2), *P. americana* (3) e *T. molitor* (4), utilizando os iniciadores GH16 e T7. **P:** padrão de pares de bases.

Esses fragmentos foram eluídos do gel de agarose e ligados em plasmídeo pGEM-T. As construções foram usadas para transformar células *E. coli* XL1-Blue e algumas das colônias de células transformadas e selecionadas com carbenicilina (colônias brancas em meio sólido contendo carbenicilina, IPTG e X-Gal) foram usadas para reações de polimerase em cadeia e posteriores reações de sequenciamento dos fragmentos originalmente amplificados. As seqüências obtidas foram reunidas com os softwares phredPhrap e Consed Linux 2.6, sendo obtido um contíguo com similaridade significativa com proteínas da família 16 das glicosídeo hidrolases. O resultado permitiu completar as seqüências codificantes de β -1,3-glucanases digestivas de *S. frugiperda* (SLAM), *D. saccharalis* (DLAM), *T. molitor* (TLAM) e *P. americana* (PLAM). As

sequências de cDNA foram depositadas no GenBank (números de acesso: EF641300, EF641301, FJ864682 e EF641302, respectivamente). A sequência correspondente à β -1,3-glucanase de *S. frugiperda* codifica um peptídeo sinal de 20 aminoácidos, seguido de uma proteína que, na forma madura, apresenta uma massa molecular teórica de 40715 daltons e um ponto isoelétrico de 5,92. Além disso, são observados na sequência um possível sítio de O-glicosilação (resíduo T23) e outro de N-glicosilação (N73). As sequências de cDNA obtidas e as prováveis proteínas correspondentes estão apresentadas nas Fig 6 a 8.

```

1 atgtgggtcggtggttagccggagatttggcgatcgcgctcgctagggcgggcttgcaccccc 60
1  M W S V L A G V L A I A S L G A A C T P 20
61 agtttgaccaccgtcagtggtacccacgcaccgggtcaccgtctgctctggtgctctgac 120
21  S L I T V S G T H A P V T V C S G A L I 40
121 ttcgctgatggcttcgacacttttgacctcgagaaatggcagcacgagaataacttttagct 180
41  F A D G F D T F D L E K W Q H E N T L A 60
181 ggtggcggttaactgggagttccaatactacggcaacaatcgcaccaactctttcgtgcgc 240
61  G G G N W E F Q Y Y G N N R T N S F V R 80
241 agtgaagtttgttcatccgtccctctctaacatcagacgagttcggagaagcttttcctc 300
81  S G S L F I R P S L T S D E F G E A F L 100
301 tcatctggacactggaacgtcgaggggtggtgctcctgctgatagatgcacaaatccacaa 360
101 S S G H W N V E G G A P A D R C T N P Q 120
361 tgggtgggggttgcgagagaacaggcacgcccagcaacattttgaacccaatcaagagtgt 420
121 W W G C E R T G T P T N I L N P I K S A 140
421 cgtgtccgtaccgtcaattccttcagcttccggttacggacgcctcgaagtccgcgctaaa 480
141 R V R T V N S F S F R Y G R L E V R A K 160
481 atgccgcggagattggatttggccagctatctggttgatgcctgcgtacaacacttac 540
161 M P A G D W I W P A I W L M P A Y N T Y 180
541 ggtacttggcccgcatcaggagagattgacttagttgagtcccagggaaccgtaacatg 600
181 G T W P A S G E I D L V E S R G N R N M 200
601 ttccacaatggtgtccatatcggtacacaggaagcaggctcgaccttgactacggacct 660
201 F H N G V H I G T Q E A G S T L H Y G P 220
661 taccagcgatgaacggttgggagcgcgcccattgggtcagaaggaaccctgctggctac 720
221 Y P A M N G W E R A H W V R R N P A G Y 240
721 aacagcaacttccaccgttaccaacttgaatggacaccaacttacttgcgattcagtatc 780
241 N S N F H R Y Q L E W T P T Y L R F S I 260
781 gacgacatggagcttggacgtgtaaccctggcaatggcggcttctgggaatacgggtgt 840
261 D D M E L G R V T P G N G G F W E Y G G 280
841 ttcaacagcaaccctaacattgagaaccatggagattcggaagcagaatggcgcctttc 900
281 F N S N P N I E N P W R F G S R M A P F 300
901 gatgagaagttctaccttatcatgaatgtggctgtcggtggtaccaacggattcttccct 960
301 D E K F Y L I M N V A V G G T N G F F P 320
961 gatggcgtcagcaaccatcacccaaaccctgggtggaacggatcaccaaccgccccaaaga 1020
321 D G V S N P S P K P W W N G S P T A P R 340
1021 gacttctggaacgcgagatcagcttgggtgaacacctggaacctgaatgtcaacgatgga 1080
341 D F W N A R S A W L N T W N L N V N D G 360
1081 caggacgcatccatgcaagtcgactacgtccgcatctgggctttgtaa 1129
361 Q D A S M Q V D Y V R I W A L - 415

```

Fig 6. Sequência de nucleotídeos e amino-ácidos deduzidos da laminarinase de *S. frugiperda*. O peptídeo-sinal predito está sublinhado. Possíveis sítios de glicosilação estão sombreados em preto. Os resíduos catalíticos E188 e E193 estão contornados em preto. O stop-codon está em negrito.

```

1 gcacgaggggtcaatactggtgggagtggtgaccctagcggtcattgggtgctgcatgcact 60
1  A R G S I L L G V V T L A S L G A A C 20
61 cccagtgtagaccacagtgagcggtacccacgcgcctgctacagtctgctcgggagcactc 120
21  P S V  V S G  H A P A T V C S G A L 40
121 atcttcgctgacgacttcaacgagtttagacttggagagatggcaacatgagaacacgctt 180
41  I F A D D F N E L D L E R W Q H E N T L 60
181 gccggtggtggaaattgggaattccagtactacaacaacaaccgtaccaactcgttcaca 240
61  A G G G N W E F Q Y Y N N  R T N S F T 80
241 gacaacggtattctatacatcaggccctctctcacatcagatcaattcgggagaacctttc 300
81  D N G I L Y I R P S L T S D Q F G E P F 100
301 cttagtagtggtcacttgaacatcgagggcgaggtccagcggtatagatgtactaaccaca 360
101  L S S G H L N I E G G A P A D R C T N P 120
361 caatgggttgggtgagcgacaggtatcagcgaacaatgttctcaaccaatcaagagc 420
121  Q W F G C E R T G S A N N V L N P I K S 140
421 gcacgcctccgcaccgtaaaactctttcagcttccgatatggacgagttgaagtggagagct 480
141  A R L R T V N S F S F R Y G R V E V R A 160
481 agaatgccagcaggagattggctttggccagcaatttgggtgatgccagcgtataatact 540
161  R M P A G D W L W P A I W L M P A Y N T 180
541 tatggcacttggccttcatctggggagattgatttgggtggaatcacgtggcaaccgtcac 600
181  Y G T W P S S G  E  I D L V  E  S R G N R H 200
601 atgttcagtaatggcggttcacatcggcactcacgaggtgggtctactctccactacggg 660
201  M F S N G V H I G T H E A G S T L H Y G 220
661 ccttatcctgcccttaatggatgggaccgagctcattgggtcagaagaaaccccgctggt 720
221  P Y P A L N G W D R A H W L R R N P A G 240
721 tacgatagagcattccatctatatcaacttgaatggacaccaaatttcataagattcagt 780
241  Y D R A F H L Y Q L E W T P N F I R F S 260
781 attgacaacgtggaattagggcagagttacacctccaacggtggattctgggaattcgggt 840
261  I D N V E L G R V T P P N G G F W E F G 280
841 ggattttaaccaacataacgtggaaaacccatggcggtttcggttagcagaatggcacctttt 900
281  G F N Q H N V E N P W R F G S R M A P F 300
901 gaccagaagttctacttcattatgaacgtgggtgtagggaggcactaacggcttcttccct 960
301  D Q K F Y F I M N V A V G G T N G F F P 320
961 gatgggtgtttccaatccaactcctaaaccatgggtggaatgggtcaccaacggcttcaact 1020
321  D G V S N P  P K P W W N G S P  A S T 340
1021 gatttctggcgcgcgtaacaattggcttccaacttggaaacctcaacataaacgacgga 1080
341  D F W R A R N N W L P T W N L N I N D G 360
1081 agagacgcatctctacaagtcgactatgtgcgcggtttgggctttgtaa 1128
361  R D A S L Q V D Y V R V W A L - 375

```

Fig 7. Sequência de nucleotídeos e amino-ácidos deduzidos da laminarinase de *D. saccharalis*. O peptídeo-sinal predito está sublinhado. Possíveis sítios de glicosilação estão sombreados em preto. Os resíduos de glutamato catalíticos estão contornados em preto. O stop-codon está em negrito.

```

1  acgaggggaccactggcggtttgtggccacgggcctgttagtgcttctcctggggcaacca 60
1  T R G P L A F V A T G L L V L L L G Q P 20
61  ggttctccagaaactctggtctggcaggatgagtttgatactttgaacctgaacgagtgg 120
21  G S P E T L V W Q D E F D T L N L N E W 40
121 agccatcttgtcacggcggtgggAtggcggcaacagBgagttccagtactaccgaaacgac 180
41  S H L V T A W G P G G I N S E F 2Q Y Y R N D 60
181 agaagaaacagttacgttcgcgatggaatgttgtacttaagaccgacgtggacttcagct 240
61  R R N S Y V R D G I L Y L R P T W T S A 80
241 gaatatggagatgacttcttgtacagtgggagtctttcatatcccgactgcaacatggaa 300
81  E Y G D D F L Y S G S L S Y P D C N M E 100
301 ccctgttcgtccactgctgggtcaggacattgttcaacccctgcaatctgccagaatttca 360
101 P C S S T A G Q D I V Q P L Q S A R I S 120
361 agctccttctcgtttaaatatggacgagtagaagtgagagctaagttgccagaggagac 420
121 S S F S F K Y G R V E V R A K L P R G D 140
421 tggatttggcctgctatctggatgttgccaaagaactgggtgtatggtgattggccacga 480
141 W I W P A I W M L P K N W V Y G D W P R 160
481 tctggcgagatcgacatcatggagagcaagggcaatgacaattattacgactctaacgga 540
161 S G E I D I M E S K G N D N Y Y D S N G 180
541 gtgagccagggcgatgacaggatgggctcgacactacactgggggtccagatgctaatacac 600
181 V S Q G D D R M G S T L H W G P D A N H 200
601 aacaattactggagaaccactgggaaaagagcatacaagataccggaacagattttgct 660
201 N N Y W R T H W E K S I Q D T G T D F A 220
661 gatgacttccacttgtatggaatgcaatggactgataatcatattacgttccactgttgac 720
221 D D F H L Y G M Q W T D N H I T F T V D 240
721 aatgcagagatcggaacagtttgggctccacaagatggtttctggtacttcggaatttc 780
241 N A E I G T V W A P Q D G F W Y F G N F 260
781 gaaaatgatccgggcggtaccaacatatggcagaacggaaactggatggcaccatttcgac 840
261 E N D P G G T N I W Q N G N W M A P F D 280
841 caagagttcaacttcatcttgaatgtggccgttggagggtacgttcttccctgataatttg 900
281 Q E F N F I L N V A V G G T F F P D N L 300
901 ggcaaccgaccatggagttgggatggacatccgatgagagatttctgggaacgacgtagt 960
301 G N R P W S W D G H P M R D F W E R R S 320
961 gagtggctgcctacatggcacgaagaggatgccgccatgaagatcgactacatttcgagta 1020
321 E W L P T W H E E D A A M K I D Y I R V 340
1021 tatcaatga 1029
341 Y Q - 342

```

Fig 8. Sequência de nucleotídeos e amino-ácidos deduzidos da laminarinase de *P. americana*. O peptídeo-sinal predito está sublinhado. Possíveis sítios de glicosilação estão sombreados em preto. Os resíduos de glutamato catalíticos estão contornados em preto. O stop-codon está em negrito.

O alinhamento das sequências de aminoácidos das laminarinases de insetos obtidas juntamente com outras proteínas animais da família 16 das glicosídeo hidrolases revela diversos resíduos completamente conservados nessa família de enzimas (Fig 9). Este alinhamento classifica as β -1,3-glucanases digestivas de insetos como pertencentes à família 16 das glicosídeo hidrolases. Estão presentes também o doador e o aceptor de prótons típicos dessa família (Hahn *et al.*, 1995) (Fig 6 a 9).

A sequência da β -1,3-glucanase de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* tem maior identidade e similaridade com β -1,3-glucanases de Lepidoptera (tabela 3). Seguem 24 proteínas de Isoptera que foram consideradas somente como proteínas ligantes de β -glucana (Bulmer e Crozier 2006), mas possuem os resíduos catalíticos, devendo ser laminarinases verdadeiras. Aparecem ainda sequências dos Diptera *Anopheles* e *Aedes*, além de sequências encontradas em crustáceos e moluscos (incluindo as utilizadas para projetar o iniciador degenerado GH16).

Tabela 3. Porcentagem de similaridade e identidade da laminarinase de *S. frugiperda* com sequências de proteínas deduzidas a partir de sequências de nucleotídeos e depositadas no GenBank.

Espécie de inseto	Filo ou Ordem	número de acesso	identidade (%)	similaridade (%)
<i>Spodoptera littoralis</i>	Lepidoptera	ACI32818.1	91	91
<i>Diatraea saccharalis</i>	Lepidoptera	ABR28479.1	81	91
<i>Mastotermes darwiniensis</i>	Isoptera	AAZ08505.1	55	73
<i>Tribolium castaneum</i>	Coleoptera	XP_970010.1	55	72
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Echinodermata	XP_783226.2	53	69
<i>Biomphalaria glabrata</i>	Mollusca	ABC63380.1	52	70
<i>Periplaneta americana</i>	Dyctioptera	ABR28480.1	45	63

A laminarinase de *D. saccharalis* é muito parecida com a de *S. frugiperda*, compartilhando 91% de similaridade e 81% de identidade. A proteína de *P. americana* possui maior identidade e similaridade com as laminarinases de crustáceos, moluscos e equinodermatas em comparação com a de *S. frugiperda*, provavelmente devido ao fato de ser uma β -1,3(4)-glucanase (Genta *et al.*, 2003).

3.2. Laminarinase de *Abracris flavolineata*

3.2.1. Tentativas de clonagem

ALAM já foi purificada e caracterizada, e foi proposto que esta enzima atuasse

sobre laminarina por um mecanismo cinético baseado em um segundo sítio de ligação ao substrato (sítio acessório), resultando em processividade na ação da enzima sobre o substrato (Genta *et al.*, 2007). Para suportar esse modelo, pretendíamos expressar a enzima em sistema heterólogo, e posteriormente realizar mutações sítio-dirigidas.

Extraímos o RNA total das células epiteliais do intestino médio ou de glândulas salivares de três indivíduos de *A. flavolineata* (Fig 10 A e B, respectivamente) com o kit RNAeasy. Esses materiais foram submetidos a rodadas de PCR utilizando os iniciadores degenerados (ver legenda para detalhes). Os fragmentos de DNA obtidos (Fig 10 C, D, e E), foram eluídos do gel de agarose e ligados em plasmídeo pGEM-T. As construções foram usadas para transformar células XL1-Blue e algumas das colônias de células transformadas e selecionadas com carbenicilina (colônias brancas em meio sólido contendo carbenicilina, IPTG e X-Gal) foram usadas para reações de polimerase em cadeia e posteriores reações de sequenciamento dos fragmentos originalmente amplificados. As seqüências obtidas foram reunidas com os softwares PhredPhrap e Consed Linux 2.6, sendo obtidos contíguos com similaridade significativa com diversas proteínas distintas, incluindo fatores de elongação e β -glicosidases (dados não apresentados).

Fig 10. Separação após eletroforese em gel de agarose de: **A.** RNA total extraído de células epiteliais ventriculares e cecos intestinais de um indivíduo de *A. flavolineata*. **Raia 1:** bandas correspondentes aos RNA ribossômicos; **B.** RNA total extraído de glândulas salivares; **C, D e E.** Fragmentos de DNA amplificados a partir do RNA total do intestino, utilizando diversos iniciadores: GH16 (raias 3 a 6); Af1, Af2, Af3 e Af4 (raias 7 a 12); todos os iniciadores mencionados, porém a partir do RNA total de glândulas salivares, em condições variadas (raias 13 a 29). **P:** padrão de pares de bases.

Em uma segunda abordagem, uma amostra de RNA total (Fig 11 A), obtida como descrita acima, foi submetida à purificação dos RNA mensageiros, utilizando o kit Oligotex. Esse material resultante foi submetido à síntese de cDNA fita-simples utilizando o kit “SuperScrip First strand synthesis system for RT”, que foi posteriormente submetido a uma amplificação do ssDNA por PCR. Os iniciadores utilizados foram oligo-dT e hexâmeros aleatórios, de forma a amplificar inespecificamente as ssDNA. O dsDNA resultante (Fig 11 B) foi ligado ao plasmídeo vetor pGEM-T, sendo posteriormente utilizado para a transformação de células DH10B eletro-competentes. A

quantidade de transformante não foi satisfatória, resultando em baixa eficiência de inserção de vetores em bactérias.

Fig 11. **A:** Separação após eletroforese em gel de agarose de: **A.** RNA total extraído de células epiteliais ventriculares e cecos intestinais de três indivíduos de *A. flavolineata*. **Raia 1:** bandas correspondentes aos RNA ribossômicos. **B.** Amplificação por PCR dos RNA mensageiros, purificados a partir da amostra de RNA total. **Raia 2:** fragmentos de cDNA amplificados após PCR utilizando iniciadores oligo-dT e hexâmeros aleatórios. **P:** padrão de pares de bases.

Na terceira tentativa, o cDNA obtido do ventrículo mais cecos intestinais foi submetido a uma amplificação do ssDNA por PCR utilizando o kit Clontech S.M.A.R.T., mas o produto foi ligado ao plasmídeo vetor pGEM-T, sendo posteriormente utilizado para a transformação de células DH10B eletro-competentes. O objetivo era não depender da digestão da enzima de restrição contida no kit, para ligação ao vetor de forma unidirecional. Dessa forma, os vetores portariam os insertos sem orientação definida, mas estariam em maior quantidade. As construções foram utilizadas na transformação de células DH10B eletro-competentes, gerando grande quantidade de transformantes, mas infelizmente com baixa porcentagem de insertos integrados (dados não apresentados).

3.2.2. Purificação da β -1,3-glucanase digestiva

Uma vez que a clonagem do cDNA correspondente a ALAM não foi bem

sucedida, decidimos micro-sequenciar trechos da proteína purificada para projetar iniciadores mais específicos. A purificação da enzima digestiva correspondente à atividade de β -1,3-glucanase em *A. flavolineata* já foi descrita. A marcha foi repetida com a substituição de algumas colunas utilizada originalmente (Genta *et al.*, 2007), devido à descontinuação do fabricante. As colunas novas mantêm o caráter das cromatografias e aumentam a resolução da separação cromatográfica, sendo que as atividades são eluídas em menos frações em comparação com a marcha já descrita. De forma resumida, a marcha consiste em duas trocas iônicas sequenciais (Hitrap Q e Mono Q), num pH em que a atividade laminarinásica majoritária é retida e eluída no gradiente salino, e finalmente eluída na forma purificada em uma filtração em gel (Fig 12 A, B e C). Amostras das frações recolhidas de cada cromatografia foram submetidas à SDS-PAGE e posterior coloração com prata, revelando uma proteína com tamanho esperado de 45 kDa, e alguns contaminantes de baixa massa molecular (Fig 12 D).

Fig 12. Purificação da β -1,3-glucanase digestiva de *A. flavolineata* (ALAM). Perfis de atividade sobre laminarina (curvas em preto) da marcha de purificação em coluna de troca iônica Hitrap Q(A) e MonoQ (B), e coluna de filtração em gel Superose 12 (C). O gradiente de NaCl está indicado pelas curvas em cinza. D. SDS-PAGE e revelação por prata das frações recolhidas da marcha de purificação. Raia P: padrão de massa molecular; frações recolhidas da cromatografia em coluna Hitrap Q (1), Mono Q (2) e Superose 12 (3). A seta indica a proteína enviada ao serviço de sequenciamento de peptídeos.

3.2.3. Sequenciamento de fragmentos internos da proteína purificada

A partir do SDS-PAGE revelado com Coomassie (dados não mostrados), das frações resultantes da marcha de purificação anterior, a banda de 45 kDa foi excisada do gel e enviada para um serviço de sequenciamento interno (Protein Core Facility, Columbia University). Os fragmentos resultantes são compatíveis com β -1,3-glucanases da família GH16, em que se encontram outras laminarinases de insetos. Os fragmentos de proteína resultantes foram YGGWPASGEIDIVESR (sublinhado estão os dois resíduos de glutamato catalíticos), TASQTTASGTK, NQCTNPSFYGCSR e

GFWGYGGFGTNVP, como visualizado no alinhamento em ClustalX destes fragmentos e 3 laminarinases de insetos (Fig 13).

Fig 13. Alinhamento em ClustalX dos fragmentos obtidos pelo sequenciamento interno da enzima de *A. flavolineata* (Af) e das β -glucanases de *S. frugiperda* (SLAM), *D. saccharalis* (DLAM), *T. molitor* (TLAM) e *P. americana* (PLAM).

Para obtermos a sequência de cDNA correspondente a ALAM, foram projetados iniciadores degenerados para PCR com base na tradução reversa dos fragmentos de proteínas obtidos. Estes iniciadores foram utilizados em PCR pareados com o iniciador Q, amplificando alguns fragmentos (Fig 14). O sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados revelou que diversas sequências foram obtidas, mas nenhuma relacionada a β -1,3-glucanases (dados não mostrados).

Fig 14. Separação após eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com iniciadores baseados no sequenciamento interno da ALAM purificada. **MM.** padrão de massa molecular.

3.3. Laminarinase de *T. molitor*

3.3.1. Clonagem, sequenciamento e localização tecidual do cDNA da β -1,3-glucanase de *T. molitor* (TLAM)

Para determinar a identidade e os sítios de expressão da β -1,3-glucanase já caracterizada cineticamente (Genta, 2004), buscamos obter a sequência de cDNA correspondente à laminarinase intestinal de *T. molitor*.

Muitas sequências não relacionadas a β -1,3-glucanases foram obtidas a partir de PCRs com o iniciador degenerado GH16 e a biblioteca de cDNA de *T. molitor* (dados não mostrados). Após diversas tentativas, foi possível obter algumas sequências correspondentes a β -glucanases da família 16. Para completar o contíguo referente à essas sequências, foi necessário estender as duas extremidades (5' e 3') com os iniciadores específicos TmFw e TmRv. Quando utilizados em PCRs pareados com T3 ou T7 e uma biblioteca de cDNA do epitélio ventricular de *T. molitor* como molde, são amplificados fragmentos de DNA com 750-1200 pb, juntamente com um forte arraste

(Fig 15), devido à baixa estringência da reação.

Fig 15. Eletroforese em gel de agarose 1%. As bandas correspondem aos produtos de PCR dos cDNAs amplificados a partir da biblioteca de cDNA do intestino médio de *T. molitor*, utilizando os iniciadores degenerados TmFw1 (1 e 3) e TmRv2 (2 e 4) contra T3 (1 e 3) ou T7 (2 e 4). P. Padrão de pares de bases.

O sequenciamento desses fragmentos de DNA resultou em uma sequência completa de uma β -1,3-glucanase digestiva de *T. molitor* (Fig 16). Esta sequência codifica uma proteína madura de 358 aminoácidos, 40,1 kDa e ponto isoelétrico teórico de 4,33. Apesar de a metionina iniciadora da tradução estar faltando, a análise *in-silico* indica um peptídeo sinal de 21 amino ácidos.

Esta sequência apresenta sítios de O-glicosilação preditos *in silico* (Fig 16), localizados em sua maioria na superfície do modelo tridimensional da proteína (exceto os resíduos de treonina) (Fig 17).

```

1 gcacgaggcaacactctatctttacctttctctccttttgggagttttcatcagtgaga 60
1  A R G N T L F Y L S L L L G V F H Q C R 20
61 tctcaatgtgcgactcccagttccacgacggccagcggtacccacgctccgaccggcgaa 120
21  S O C A T P S P T T A S G T H A P T G E 40
121 atctgctccggagatctcatctttcgaagatgagttcgacgagcttgacatgcaaaaatgg 180
41  I C S G D L I F E D E F D E L D M Q K W 60
181 aaccacgaaagtaccctaggtggaggtggttaattgggaatttgaatggtacaccaacagt 240
61  N H E S T L G G G G N W E F E W Y T N S 80
241 aggtacaacagctatacagaagatggcttccctttatataaaacctactctgttggccgac 300
81  R Y N S Y T E D G F L Y I K P T L L A D 100
301 gagaatggtgaagatttctgtcgtctggacaattggacatcaacggaggttctcccgt 360
101  E N G E D F L S S G Q L D I N G G S P A 120
361 gatgagtgtaccaaccctcaatggtatggttgcgctaggactggaaccgcagataattat 420
121  D E C T N P Q W Y G C A R T G T A D N Y 140
421 cttaacccaatcaaaagcgccgtatccgaagtctctactccttgccttcaaataatggt 480
141  L N P I K S A R I R S L Y S L S F K Y G 160
481 aaagttagagtagagcgaaactccccactggagattgggttggcctgctatttggatg 540
161  K V E V R A K L P T G D W L W P A I W M 180
541 ttgcctcgggtggaatcaatactccggatggccaatttccgggtgagattgacataatggaa 600
181  L P R W N Q Y S G W P I S G E I D I M E 200
601 agtcgtggcaacgcccgacttgggtcaacgcttccgggtgccaacatcggaagcaaaactggtc 660
201  S R G N A D L V N A S G A N I G S K L V 220
661 agttccactcttccactggggggccagcggtggaatatcaacatgtatatgatgacctatgtc 720
221  S S T L H W G P A W N I N M Y M M T H V 240
721 gaaagtagcaaccctgccggattcgacgccgactggcacaactaccagatgacgtggacc 780
241  E S S N P A G F D A D W H N Y Q M T W T 260
781 gaaaacgacatcagcttctcgatcgatgacgcacttttgggcacttttggctcctccggat 840
261  E N D I S F S I D D A L L G T F A P P D 280
841 ggtggcttctgggaatgggggtgacctcgactctagcggattcgccaatccttggaggacc 900
281  G G F W E W G D L D S S G F A N P W R I 300
901 agcaaatccgaaatggctccggttcgatcaagaattctaccttttgatcaacttggcttgt 960
301  S K S E M A P F D Q E F Y L L I N L A C 320
961 ggtggtatggcttatttcccggtatgatgtgaccaatccaggtggcaagccctggccaat 1020
321  G G M A Y F P D D V I N P G G K P W S N 340
1021 acatctcccaccgcttccactgacttctggaagggtagggaccaatggctgcctacgtgg 1080
341  T S P T A S T D F W K G R D Q W L P T W 360
1081 aaattggagactgacactgctgcctttaaaattgattatgtaaaaatttgggcccctgtaa 1140
361  K L E T D T A A F K I D Y V K I W A L - 379

```

Fig 16. Sequências de nucleotídeos e amino-ácidos preditos da laminarinase de *T. molitor* (TLAM). Indicados estão o peptídeo sinal (sublinhado), os resíduos glicosilados (sombreados em preto) e o stop-codon (traço), preditos por análise *in silico*. Os resíduos de glutamato catalíticos estão contornados. Trechos de proteína sobreados em cinza correspondem a sequências obtidas após hidrólise por tripsina e análise por espectrometria de massas. Número de acesso no GenBank: ACS36221.

Fig 17. Modelo tridimensional da TLAM, construído por homologia com a estrutura da β -1,3-glucanase de *Nocardia* (pdb 2HYK). Os resíduos de amino-ácidos correspondentes ao doador (E174) e receptor (E179) de prótons, e os resíduos supostamente glicosilados estão indicados. Os resíduos S279 e S280 não estão modelados.

O RNAm correspondente à TLAM é encontrado no intestino médio, mas ausente em todos os outros tecidos (Fig 18).

Fig 18. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR correspondente à TLAM no intestino médio comparado com o restante dos tecidos. 1: intestino médio; 2: todos os tecidos, menos o intestino médio; rRNA, RNA ribossomal.

3.3.2. Purificação da laminarinase digestiva majoritária de *T. molitor*

A purificação da enzima digestiva correspondente à atividade laminarinásica majoritária em *T. molitor* já foi descrita (Genta, 2004). A marcha foi repetida com a substituição de algumas colunas por novas. O resultado é semelhante ao obtido por estes autores; de forma resumida, a marcha consiste em duas trocas iônicas sequenciais (Hitrap Q e Mono Q), com uma Hitrap Desalting após a Hitrap Q (Fig 19 A) para retirar o NaCl. As frações da coluna Mono Q com maior atividade foram coletadas (Fig 19 B), e saturadas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ numa concentração final de 1 M. O material foi aplicado em uma coluna de interação hidrofóbica (Resource ETH, Fig 19 B), e as frações com maior atividade foram reunidas e aplicadas em uma filtração em gel (Superdex 75, Fig 19 D). As frações 20, 21 e 22 foram reunidas e submetidas à SDS-PAGE (Fig 20).

A **B** **C** **D**

Fig 19. Perfis de atividade sobre laminarina (curvas em preto) da marcha de purificação da β -1,3-glucanase digestiva majoritária de *T. molitor* em coluna de troca iônica Hitrap Q(A) e MonoQ (C), coluna de interação hidrofóbica Resource ETH (B) e coluna de filtração em gel Superdex 75 (D). O gradiente de NaCl está indicado pelas curvas em cinza.

Fig 20. SDS-PAGE revelada com Coomassie da fração resultante da marcha de purificação da β -1,3-glucanase digestiva de *T. molitor*. **Raia P:** padrão de massa molecular; **1.** frações recolhidas da cromatografia em coluna Superdex 75. A seta indica a proteína enviada ao serviço de sequenciamento de peptídeos.

3.3.3. Sequenciamento interno da TLAM

TLAM foi submetida à análise por Espectometria de Massas (LC-MS/MS). Sete sequências de peptídeos foram obtidas. Essas sequências estão sublinhadas na Fig 16, e permitiram a correlação entre o cDNA clonado e a proteína purificada e caracterizada (Genta, 2004).

Por alinhamento da sequência de TLAM com outras enzimas da família 16 das glicosídeo hidrolases, os resíduos de amino-ácidos R127, S146, G160, W173, R181, S193, G194, E195, D197, E200, H204, D269, Y304 e N317 são conservados nas enzimas de insetos (Fig 9). TLAM é modificada quimicamente por fenilglioxal, dietil-pirocarbonato e tetranitrometano, que modificam, respectivamente, resíduos de arginina, histidina e tirosina (Genta, 2004). Uma modelagem molecular baseada na enzima do fungo *Nocardopsis* (pdb 2HYK) permitiu identificar que dos resíduos conservados, R127, R181, H204 e Y304 estão próximos da fenda catalítica (Fig 21). Esse resultado sugere que os resíduos próximos à fenda catalítica correspondem aos modificados quimicamente (Genta, 2004).

Fig 21. Modelo tridimensional da β -1,3-glucanase digestiva de *T. molitor*. Detalhe do sítio ativo, com os resíduos de amino-ácidos supostamente essenciais para o funcionamento da enzima (Genta, 2004).

Estudos futuros baseados em mutação sítio-dirigida são necessários para verificar o papel de cada um destes resíduos de amino-ácido na atividade de TLAM.

3.4. Laminarinase de *S. frugiperda*

3.4.1. Distribuição de SLAM e da atividade laminarinásica digestiva

As diferentes porções do intestino médio de *S. frugiperda* foram submetidos à dosagem de atividade sobre laminarina, separadamente em epitélio e conteúdo luminal (mais a membrana peritrófica). Cada material correspondente ao intestino médio foi separado em três partes aproximadamente iguais (anterior, média e posterior). A atividade sobre laminarina se concentra na porção anterior e média do conteúdo

luminal, e na porção posterior e média no epitélio (Fig 22 A).

A expressão do RNAm correspondente à SLAM por meio de RT-PCR semi-quantitativa demonstra sua restrição ao intestino médio, com presença vestigial nos Túbulos de Malpighi, e ausência no corpo gorduroso e carcaça (Fig 22 B e C).

Fig 22. Distribuição da atividade laminarinásica em diferentes porções do epitélio ventricular (A) e do RNAm correspondente à SLAM em diversos tecidos (B e C) de *S. frugiperda*. **B.** Densitometria relativa de SLAM e β -actina em diferentes tecidos de *S. frugiperda*. Os valores se referem à porcentagem da expressão de SLAM em cada amostra em relação ao total de SLAM em todos os tecidos. **C.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos da RT-PCR semi-quantitativa de SLAM e β -actina em diversos tecidos da larva de *S. frugiperda*. Os números se referem à Fig B e C: 1, 2 e 3: intestino médio anterior, médio e posterior; 4, 5 e 6: túbulos de Malpighi, corpo gorduroso e carcaça, respectivamente.

3.4.2. Purificação e caracterização da laminarinase de *S. frugiperda*

A atividade laminarinásica digestiva majoritária foi purificada após aplicação da fração solúvel do conteúdo do intestino médio em duas cromatografias de troca iônica (Fig 23), e visualizada por eletroforese desnaturante como única proteína detectável por coloração de prata (Fig 24).

Utilizando laminarina como substrato, a laminarinase purificada de *S. frugiperda* foi caracterizada quanto aos seus parâmetros cinéticos (Fig 25 e tabela 4). A enzima não forma quantidades significativas de produtos pequenos a partir de laminarina e não apresentou atividade detectável sobre β -1,3(4)-glucana. Dessa forma, a enzima é classificada como endo-glucanase da classe E.C. 3.2.1.39. Esses dados estão apresentados também na tabela 4, juntamente com outras laminarinases de insetos já caracterizadas. A inativação térmica desta enzima sugere a existência de apenas uma enzima presente no material capaz de atuar sobre a laminarina (Fig 25 B), devido ao seu formato linear por três meias-vidas após transformação logarítmica das atividades remanescentes.

A

B

Fig 23. Perfis de atividade sobre laminarina (curvas em preto) da marcha de purificação da β -1,3-glucanase digestiva de *S. frugiperda* em coluna de troca iônica Hitrap Q(A) e MonoQ (B). O gradiente de NaCl está indicado pelas curvas em cinza.

Fig 24. SDS-PAGE e coloração por prata das frações recolhidas da marcha de purificação da β -1,3-glucanase digestiva de *S. frugiperda*. Raia P: padrão de massa molecular; 1: frações recolhidas da cromatografia em coluna Hitrap Q; 2, 3 e 4: frações 20, 21 e 22 da cromatografia em coluna Mono Q. A seta indica a banda correspondente à laminarinase.

Fig 25. Parâmetros cinéticos obtidos do material parcialmente purificado da larva de *S. frugiperda*. A. Curva de pH ótimo sobre laminarina. B. Efeito da concentração de substrato na atividade da laminarinase digestiva purificada da larva de *S. frugiperda*. Plot de Michaelis para determinação dos parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} (em detalhe, plot de Lineweaver-Burk). C. Aumento de grupos redutores em frações solúveis (preto) e insolúveis (branco) após incubação da enzima com laminarina ao longo do tempo. A proporção solúvel/insolúvel é utilizada para calcular o grau de ataque múltiplo; D. Inativação térmica a 52 °C da enzima purificada de larvas de *S. frugiperda*. Valores logarítmicos da porcentagem da atividade remanescente (%AR) ao longo do tempo.

Tabela 4. Valores de parâmetros cinéticos sobre laminarina da β -1,3-glucanase purificada da larva de *S. frugiperda* e da SLAM expressa em *P. pastoris*. N.D. indica não-determinado.

	pH ótimo	MM (kDa)	Km (%)	kcat (s-1)	kcat/Km (s-1/%)	Processividade	Atividade lítica
<i>S. frugiperda</i> SLAM	9,0	37,5	0,12 $\pm$ 0,004	29 $\pm$ 2	241	0,4	não
<i>T. molitor</i> TLAM	6,0	45	0,15 $\pm$ 0,01	1,4 $\pm$ 0,03	9,3	0,6	sim
<i>A. flavolineata</i> ALAM	5,5	45	0,19 $\pm$ 0,01	29 $\pm$ 1	153	29	sim
<i>P. americana</i> Lam	6,5	45,2	0,074 $\pm$ 0,008	81 $\pm$ 5	1100	11	sim
<i>P. americana</i> Liq 1	6,0	24,6	0,16 $\pm$ 0,01	750 $\pm$ 10	4700	4	sim
<i>P. americana</i> Liq 2	5,08	23,4	0,36 $\pm$ 0,07	4,6 $\pm$ 0,8	n.d.	n.d.	n.d.

3.4.3. Atividade lítica da laminarinase de *S. frugiperda*

A incubação de SLAM recombinante ou purificada a partir da larva de *S. frugiperda* com células de *S. cerevisiae* em meio hipotônico não promove a lise das células. Isso acontece mesmo em altas concentrações de enzima em incubações de 24 hs (dados não mostrados).

3.4.4. Modelagem molecular da laminarinase de *S. frugiperda*

A sequência de amino-ácidos correspondente ao cDNA da laminarinase de *S. frugiperda* foi submetida ao algoritmo de predição tridimensional de proteína EsysPred3D (Lambert *et al.*, 2002) (Fig 26). O modelo obtido foi construído utilizando como molde a estrutura tridimensional da cadeia “A” de uma suposta laminarinase de fungo (*Phanerochaete chrysiosporium*, pdb 2HYK). A laminarinase de *S. frugiperda* compartilha apenas 19.7% de identidade com essa sequência molde. No modelo obtido a distância entre os carboxilatos dos aminoácidos conservados E188 e E193 é de 5,53 Å (Fig 27).

Fig 26. Modelo tridimensional da laminarinase de *S. frugiperda*, gerado por modelagem automática (ESsyPred3D), utilizando como molde a estrutura de uma laminarinase de fungo (*Phanerochaete chrysosporium*, número de acesso BAC67687). Os resíduos catalíticos E188, D190 e E193 estão indicados na figura.

Fig 27. Detalhe do sítio catalítico no modelo tridimensional da laminarinase de *S. frugiperda*, mostrando a distância em Å entre o doador (Glu-188) e aceptor (Glu-193) de prótons.

3.4.6. Modulação de pKa dos resíduos catalíticos de SLAM

A Fig 28 mostra E228 como o único resíduo de amino-ácido no sítio catalítico de SLAM conservado nas β -1,3-glucanases encontradas no intestino de insetos que possuem pH luminal alcalino. Isso ocorre em larvas de *Anopheles gambiae* Ag.3 e Ag.4 (Oviedo *et al.*, 2008) e em enzimas de lepidópteros (*S. frugiperda*, *Bombyx mori*, *Pieris rapae*) (Fig 28). Na enzima de *Diatraea saccharalis* E228 é substituído por D228. Dessa forma, E228 (ou D228 em *D. saccharalis*) pode ser a causa do deslocamento do pH ótimo de SLAM (e de outras β -1,3-glucanases similares), em concordância com o intestino médio larval alcalino dos Diptera nematóceros como *A. gambiae*, e lepidópteros como *S. frugiperda*, *D. saccharalis*, *Bombyx mori* e *P. brassicae* (Terra e Ferreira 1994). Ag.1 e Ag.5, que não possuem esses resíduos, são expressas nos intestinos médios de adultos de *A. gambiae* (Marinotti *et al.*, 2005; Oviedo *et al.*, 2008), que, ao contrário de suas larvas, não possuem pH luminal alcalino. A β -glucanase do Coleoptera *Tenebrio molitor* (Genta, 2004) está presente no intestino médio de larvas, o mesmo provavelmente ocorrendo com a de *Tribolium castaneum*, outro Coleoptera. Esses organismos têm pH luminal ácido e não possuem um resíduo de amino-ácido na posição do E228.

Fig 28. Alinhamento de resíduos de amino-ácidos próximos dos resíduos catalíticos (*) de SLAM e outras β -1,3-glucanases. Os resíduos de amino-ácidos contornados são conservados entre as β -1,3-glucanases de insetos com um lúmen intestinal alcalino. As setas numeradas correspondem às folhas mostradas na Fig 4. Ag., *Anopheles gambiae*: Ag.1 (GNBPB 1, número de acesso EU073458), Ag.5 (GNBPB5, XP_313748), Ag.3 (GNBPB3, XM_312116), Ag.4 (GNBPB4, XM_312118); Sf, *S. frugiperda* (SLAM, ABR284478); Ds, *Diatraea saccharalis* (ABR28479); Bm, *Bombyx mori* (anotada como Glucan-Binding, NP_001159614); Pr, *Pieris rapae* (ACI32824); Nt, *Nasutitermes tiodi* (anotada como Glucan-Binding, AA08488); Tm, *Tenebrio molitor* (ACS36221); Tc, *Tribolium castaneum* (XP_970010). Os valores de pI teóricos calculados a partir das sequências acima são: Ag.1, 5.08; Ag.5, 5.07; Ag.3, 6.00; Ag.4, 5.00; Sf, 6.08; Ds, 6.21; Bm, 6.26; Pr, 6.00; Nt, 4.67; Tm, 4.37; Tc, 4.54.

A Fig 29 mostra o posicionamento de E228 na fenda catalítica de SLAM. Esta configuração sugere que E228 possa afetar a ionização dos resíduos catalíticos, o que deslocaria o pH ótimo da enzima para o lado alcalino.

Fig 29. Modelagem por homologia da estrutura de SLAM. Detalhe da fenda catalítica, mostrando alguns resíduos canônicos (numeração de resíduos da *S. frugiperda*) da GH16, E188, D190 e E193. A linha tracejada mostra a distância entre o resíduo catalítico E193 e o resíduo E228, provavelmente responsável pelo deslocamento do pH ótimo da enzima. As folhas- β são numeradas baseadas na endo- β -1,3-glucanase de *Nocardioopsis* sp (PDB 2HYK). T209 é conservado em todas as laminarinases de inseto. Figura gerada com PyMol.

O pI teórico de SLAM é 6,08, próximo do encontrado em enzimas de lepidópteros (*D. saccharalis*, *B. mori* e *P. rapae*) e uma enzima larval de *A. gambiae* (Ag.3, veja legenda da Fig 28). A outra enzima larval de *A. gambiae* (Ag.4) tem um pI teórico de 5,0, que é excepcionalmente baixo. β -1,3-glucanases de Isoptera e Lepidoptera tem valores de pI abaixo de 5 (legenda da Fig 28). Associado com o alto pI, SLAM tem mais cargas positivas em sua superfície do que, por exemplo, TLAM (Fig 30).

Fig 30. Superfície molecular de SLAM e TLAM, mostrando o mapa de potencial eletroestático. Azul indica potencial positivo, vermelho negativo, e branco nulo.

3.4.7. Produção da SLAM recombinante em *E. coli*

Utilizando a sequência completa da laminarinase digestiva de *S. frugiperda*, desenhamos dois iniciadores oligonucleotídicos específicos (SFFW e SFRV), contendo

sítios de restrição *NdeI* e *NotI*, respectivamente. A reação da polimerase em cadeia usando esses iniciadores e a biblioteca de cDNA do ventrículo de larvas de *S. frugiperda* como molde resultou em um fragmento de DNA com cerca de 1000 pares de bases (dados não apresentados), o qual foi eluído do gel de agarose e digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *NotI*, sendo então ligado no plasmídeo pET-28A linearizado com as mesmas enzimas. Essa construção foi usada para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3), e um dos transformantes (selecionado em meio sólido com kanamicina) foi usado para produzir a laminarinase truncada na forma recombinante. Na presença de IPTG, grande quantidade da proteína com a massa molecular esperada é produzida (41 kDa, Fig 31). Entretanto, toda essa proteína se apresenta na forma insolúvel (corpos de inclusão), e a atividade de laminarinase do lisado (fração solúvel) das células após a indução não é significativamente maior que a atividade observada nos controles da indução, indicando que a enzima recombinante está inativa (dados não apresentados).

Fig 31. Eletroforese em SDS-PAGE de proteínas derivadas de bactérias controle (3, 4, 7 e 8) e bactérias contendo o inserto que codifica a laminarinase (1, 2, 5 e 6). P. Padrão de massa molecular. 1 e 3. material obtido antes da indução. 2 e 4. proteínas obtidas após 3 hs de indução. 5 e 7. proteínas obtidas no sedimento após centrifugação. 6 e 8. proteínas solúveis. A laminarinase recombinante está indicada por um retângulo preto.

3.4.8. Produção de anti-corpos policlonais anti-laminarinase de *S. frugiperda*

SLAM recombinante na forma insolúvel foi utilizada como material para gerar anti-corpos policlonais anti-SLAM em coelhos. 300 ug de SLAM purificada foram injetadas como primeira aplicação, com 100 ug em duas injeções subsequentes. O anti-serum pré ou pós injeções foi utilizado em western-blots contra diversos materiais oriundos de *S. frugiperda*, demonstrando a especificidade dos anti-corpos gerados (Fig 32).

Fig 32. Detecção de proteína após eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), não-desnaturantes (PAGE) e western blots. **A. Raia 1.** conteúdo luminal solúvel do intestino médio; **2.** epitélio do intestino médio; **3.** SLAM purificada do intestino médio da larva de *S. frugiperda*; **4 e 5,** SLAM recombinante produzida em *P. pastoris*. **Raias de 1 a 4.** western-blots revelados com anticorpos contra SLAM recombinante produzida em *E. coli*. **Raia 5** foi revelada com coloração por prata. **B.** Fração solúvel do homogeneizado do conteúdo ventricular de *S. frugiperda* submetida à PAGE. **Raia 1.** Revelação de proteína com coloração de prata; **2.** Revelação de atividade sobre laminarina com TTC; **3.** Western blot revelado com anti-corpos anti-laminarinase.

3.4.9. Imunocitocalização da laminarinase de *S. frugiperda*

A imunocitocalização da laminarinase de *S. frugiperda* foi realizada no epitélio do intestino médio da larva. O epitélio foi cortado em 3 regiões de tamanho aproximadamente igual. Foram utilizadas as regiões anterior e posterior, já que a média é uma região de transição entre as duas. Os anti-corpos específicos utilizados foram gerados contra a laminarinase recombinante expressa em *E. coli*, como descrito anteriormente. Os controles da preparação de imunofluorescência (Fig 33 A e B) resultaram em reconhecimento inespecífico em diversos locais e tipos celulares, inviabilizando o uso desta técnica. Dessa forma, uma nova preparação, a ser revelada com ouro coloidal, demonstrou a secreção de SLAM por células colunares do epitélio. As vesículas contêm a proteína distribuída de forma aleatória, indicando que esta não

está ligada à membrana vesicular. SLAM é observada também na superfície de microvilosidades. Foi possível visualizar uma vesícula dentro de uma microvilosidade, contendo a laminarinase, para ser secretada no espaço ectoperitrófico (Fig 33 C e D). Estas imunocitocalizações estão de acordo com a atividade laminarinásica encontrada principalmente no epitélio posterior (Fig 22 A), e com os resultados obtidos por RT-PCR semi-quantitativo, que mostram produção de SLAM tanto pelo epitélio anterior quanto pelo posterior (Fig 22 B e C).

Fig 33. Controles de imunofluorescência confocal (A e B) e localização da laminarinase de *S. frugiperda* por imunocitoquímica de transmissão eletrônica (C e D) ao longo do ventrículo. A. Material revelado com PBS e Alexa Fluor. B. Material revelado com TDA e FITC. C. Células colunares do intestino médio anterior. D. Células colunares do intestino médio posterior, com vesículas contendo a proteína. MV - microvilosidade.

3.4.10. Produção da SLAM recombinante em *P. pastoris*

O cDNA correspondente à SLAM foi clonado em vetor de expressão pPIC9K (Fig 34), e utilizado para eletroporação de células de *P. pastoris* linhagem GS115.

Fig 34. Construção dos vetores pET28-A e pPIC9K-SLAM visualizados por eletroforese em gel de agarose. pPIC9K não-digerido (1) e digerido (2), SLAM amplificada por PCR (3). P. Padrão de pares de bases.

SLAM é produzida com sucesso na forma nativa em células de levedura de *P. pastoris* (GS115). Ela é recuperada do meio líquido devido à tradução do fator alfa "upstream" à sequência de SLAM, que direciona a proteína para fora da célula, sendo purificada em um passo cromatográfico hidrofóbico (Fig 32 A, raia 5).

3.4.11. Caracterização da SLAM recombinante

O sobrenadante da cultura de *P. pastoris* induzida por metanol foi submetido à purificação por cromatografia de interação hidrofóbica. Amostras das frações com maior atividade foram reunidas e submetidas à eletroforese desnaturante para confirmar a homogeneidade do material (Fig 32 A, raia 5), e foram utilizadas também para a caracterização da enzima. A proteína obtida apresenta a mesma migração

eletroforética em relação à laminarinase purificada do ventrículo e à recombinante expressa em *E. coli*, ambas com massas estimadas em 37 kDa (Fig 31 e 32 A, raia 5). Os anti-corpos específicos reconhecem esta proteína em western-blot deste material (Fig 32 A, raia 4). Utilizando laminarina como substrato, a enzima apresenta um pH ótimo de 9,0 e K_m de $0,13 \pm 0,005\%$ (m/v) (Fig 35), e cinética de inativação térmica (Fig 25 D) comparáveis com os obtidos para a proteína purificada do ventrículo (tabela 4 e Fig 25).

A enzima não é capaz de hidrolisar liquenana nem β -glucanas mistas de cereal, pelo menos até um nível de detecção 0,5 mU/animal (dados não mostrados).

Fig 35. Parâmetros cinéticos obtidos com a laminarinase recombinante expressa em *P. pastoris*. **A.** Curva de pH ótimo sobre laminarina. **B.** Curva de duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) da velocidade contra concentração de substrato (laminarina).

3.5. Evolução das β -1,3-glucanases e sua relação com proteínas ligantes de β -glucana

Alinhamentos múltiplos (dados não mostrados) de todas as sequências utilizadas nos cladogramas apresentadas na Fig 36 e 37 revelaram que todas as

proteínas ligantes de glucana tem uma região N-Terminal com cerca de 100 resíduos de amino-ácidos (dados não mostrados). Essa região N-Terminal está ausente em todas as β -1,3-glucanases de insetos, crustáceos e algumas enzimas de moluscos, mas presente em outras de moluscos (e.g. *Crassostrea gigas* e *Biomphalaria glabrata*) e dos filos remanescentes (Fig 36). Ainda, o alinhamento mostrou que os resíduos de amino-ácidos ao redor dos resíduos catalíticos são mais conservados entre as β -1,3-glucanase de insetos do que nas regiões homólogas das proteínas ligantes de glucana (dados não mostrados). A porção N-Terminal deve ter sido exposta a uma alta pressão seletiva, já que muitos resíduos de amino-ácidos são conservados, mesmo quando espécies distantes filogeneticamente são consideradas. (Fig 36 B).

Fig 36. Ocorrência de GNBPs e β -1,3-glucanases em metazoários. A. Árvore filogenética de alguns metazoários de acordo com Halanych *et al.* (2004). Barras laterais indicam a ocorrência de GNBPs de insetos (branca), β -1,3-glucanases sem a região do N-Terminal estendida (hachurada) e com a mesma região (preta). A seta indica o possível ponto em que a duplicação gênica ocorreu. B. Alinhamento parcial de sequências da região N-Terminal estendida de GNBPs e β -1,3-glucanases selecionadas. Resíduos bastante conservados estão sombreados em preto. Organismos e número de acesso do GenBank das sequências de nucleotídeos: Dw: *Drosophila willistoni* (XM_002061567); Tn: *Trichoplusia ni* (EU770373); Tc: *Tribolium castaneum* (XM_966587); Rp: *Rhodnius prolixus* (EF634459); Pf: *Pinctata fucata* (FJ775601); Sp: *Strongylocentrotus purpuratus* (XR_025993); Sk: *Saccoglossus kowalevskii* (XM_002740940); Ci: *Ciona intestinalis* (XM_002126654).

SLAM é homóloga a β -1,3-glucanases, a proteínas classificadas como Gram-Negative bacteria Binding Proteins (GNBPs) e proteínas ligantes de β -glucana de insetos (β GRP). A análise filogenética de sequências de proteínas da família GH16 pertencente a artrópodes e moluscos, incluindo SLAM, mostra um grupo monofilético (bootstrap 100), contendo todas as β -1,3-glucanases verdadeiras (com os resíduos catalíticos) de insetos (Fig 37). Algumas dessas sequências foram depositadas em banco de dados como GNBPs ou outras proteínas ligantes de glucanas, sendo o caso de muitas enzimas de Isoptera (Bulmer e Crozier 2006). O cladograma também mostra um arranjo polifilético de sequências de proteínas ligantes de diversos insetos, dos quais *Rhodnius prolixus* é o organismo mais basal. Não foi encontrado nenhuma sequência de proteína ligante verdadeira (sem os resíduos catalíticos) no banco de dados GenBank pertencendo a grupos exceto insetos. A β -glucanase de *Periplaneta americana* inesperadamente se agrupa com as de moluscos, formando um ramo (bootstrap 75) isolado do grupo monofilético (bootstrap 86) das β -1,3-glucanases de insetos. Provavelmente isso ocorre porque a enzima de *Periplaneta americana* é uma β -1,3(4)-glucanase (Genta *et al.*, 2003), enquanto as remanescentes de insetos são β -1,3-glucanases.

Fig 37. Cladograma das sequências de proteína de β-1,3-glucanases e proteínas ligantes de β-glucana de insetos e moluscos. Os ramos são suportados estatisticamente por análise de bootstrap (cut off 50). C, Coleoptera; Cr, Crustacea; D, Diptera; Dy, Dytioptera; H, Hemiptera; I, Isoptera; L, Lepidoptera; M, mollusks. As sequências estão identificadas de cima para baixo como aparecem no cladograma. *S. frugiperda* (ABR28478), *H. armigera* (ABU98621), *N. fumigatus* (AAZ08496), *A. gambiae* (XP_313748), *A. aegypti* (XXP_001659797), *A. Gambiae* (XP_312118), *C. quinquefasciatus* (XP_001845963), *A. gambiae* (XP_312116), *T. Castaneum* (XP_970010), *T. Molitor* (ACS36221), *P. fucata* (ACN76701), *H. Gammarus* (CAE47485), *H. diversicolor supertexta* (ACO07358), *P. americana* (ABR28480), *B. Glabrata* (ABO40828), *C. gigas* (BAG82630), *M. yessoensis* (AAW34372), *R. prolixus* (ABU96697), *T. molitor* (BAC99308), *H. armigera* (ACI32828), *T. molitor* (BAC99308), *T. castaneum* (XP_972063), *A. aegypti* (XP_001658512), *D. melanogaster* (AAF33851), *H. armigera* (ACI32825), *B. mori* (BBAA92243), *M. sexta* (AAF44011), *P. rapae* (ACI32821), *H. armigera* (ACI32827), *S. littoralis* (ACI32819), *M. sexta* (AAN10151), *P. rapae* (ACI32822), *P. interpunctella* (AAM95970), *B. mori* (NP_001128672).

3.6. Função das β -1,3-glucanases intestinais de insetos

O conteúdo de β -1,3-glucana na dieta e nas fezes da larva de *S. frugiperda* foi quantificada por Aniline Blue. A dieta artificial, na qual as larvas são criadas, contém $0,093 \pm 0,013\%$ (m/m) de β -1,3-glucana, enquanto as fezes contêm $0,044 \pm 0,01\%$ (m/m), indicando uma digestibilidade de $52,86 \pm 14\%$ do conteúdo de β -1,3-glucana da dieta.

Helicoverpa armigera aparentemente altera a expressão da atividade sobre laminarina quando alimentada com microorganismos (Pauchet *et al.*, 2009). Para verificar se *T. molitor* apresenta uma resposta semelhante, três microorganismos foram adicionados à dieta de forma independente, mas a atividade sobre laminarina não foi alterada significativamente (Fig 38).

Fig 38. Atividade sobre laminarina encontrada no conteúdo do intestino médio de larvas de *T. molitor* após alimentação com dietas contendo *E. coli* (Gram -), *M. lisodeikticus* (Gram +) e *P. pastoris* (levedura).

4. Discussão

4.1. Classificação das β -1,3-glucanases de insetos

Neste trabalho, nós demonstramos que as β -1,3(4)-glucanases de insetos pertencem à família 16 das glicosídeo hidrolases. Essa família pertence ao clã B, que também compreende a família 7, onde encontram-se celulasas e celobiohidrolases. As proteínas pertencentes ao clã B apresentam um motivo de dobramento do tipo “ β -jelly roll”. No entanto, dentro da família 16 existe uma grande variedade de sequências e atividades enzimáticas, o que não ocorre com a família 7. Na família 16 encontramos, além de laminarinases pertencentes ao EC 3.2.1.39 ou 3.2.1.6 (e as GNBPs), as liqueninases, xiloglicosil tranferases, queratan sulfato endo-galactosidases, agarases e κ -carragenases. Somente 7 proteínas dessa família tiveram sua estrutura resolvida, e entre as laminarinases de eucariotos, somente uma β -1,3(4)-glucanase de fungo, *Phanerochaete chrysosporium* (Vasur et al., 2006). Em comparação, SLAM é uma endo- β -1,3-glucanase, e compartilha apenas cerca 20% de identidade. Dentro dos procariotos há uma endo β -1,3-1,4 glucanase, uma β -galactosidase, uma liqueninase, uma κ -carragenase e 2 β -agarases cuja estrutura foi desvendada. Portanto, nem sequer todos os tipos de enzimas da família 16 tiveram sua estrutura determinada, o que seria interessante para verificar as bases moleculares das diferentes propriedades, inclusive a processividade de ALAM descrita anteriormente.

Ao iniciarmos os trabalhos com laminarinases de insetos, não havia sequências de insetos descritas na família 16 das glicosídeo-hidrolases, apenas proteínas

correspondentes a GNBP's de cupins (Dictyoptera). Recentemente, inúmeras sequências oriundas de diversos ordens de insetos foram depositadas (<http://cazy.org/>).

4.2. Laminarinase de *S. frugiperda* (SLAM)

4.2.1. Propriedades de SLAM

Depois de amilase, SLAM é a glucanase com maior atividade encontrada nos intestinos médios da larva de *S. frugiperda*. SLAM se destaca de todas as β -1,3-glucanases já caracterizadas, por não ser capaz de lisar células de *S. cerevisiae* e apresentar um pH ótimo aproximadamente 3 unidades acima das outras enzimas. SLAM não é uma enzima processiva, da mesma forma que TLAM, mas em contraste com esta, não apresenta atividade lítica. SLAM é provavelmente membro da E.C. 3.2.1.39, já que é uma endoglucanase que hidrolisa apenas β -1,3-glucana.

O pH ótimo elevado de SLAM permite a enzima ter a máxima atividade no pH alcalino (9,8) do intestino médio da larva de *S. frugiperda*, como mostrado anteriormente com tripsina e amilase, em *S. frugiperda* e outros lepidópteros (Ferreira *et al.*, 1994; Terra e Ferreira, 2005).

É esperado que SLAM apresente características estruturais particulares para ser ativa em pH alcalino. Para estudar estas propriedades, uma biblioteca de cDNA de expressão preparada com o intestino médio da larva de *S. frugiperda* foi varrida com iniciadores baseados em sequências conservadas de β -1,3-glucanases de invertebrados. Obtivemos um clone cuja sequência completa era homóloga a outras β -

1,3-glucanases de invertebrados. Ele foi utilizado para produzir a proteína recombinante para indução de anti-corpos específicos e ensaios enzimáticos. A correspondência da identidade da enzima recombinante (SLAM) com a enzima purificada (selvagem) e caracterizada do animal foi demonstrada por: (1) SLAM e a enzima selvagem apresentam a mesma migração eletroforética e valores de pH ótimo e K_m ; (2) anti-corpos específicos anti-SLAM reconhecem uma única proteína do tecido do intestino médio e conteúdo, com a mesma migração eletroforética da única atividade laminarinásica e da enzima selvagem purificada.

A modelagem tridimensional de SLAM por homologia da fenda catalítica mostrou que E228, embora localizado a uma distância considerável dos resíduos catalíticos, poderia afetar a ionização destes. Esta hipótese é sustentada pelo fato de E228 ser conservado entre as β -1,3-glucanases ativas em um intestino com pH luminal bastante alcalino, como os das larvas de lepidópteros e Diptera nematóceros. É interessante notar que as β -1,3-glucanases com um pH ótimo elevado também apresentam maior potencial eletroestático em suas superfícies. As implicações deste resultado não são totalmente claras, já que outra enzima do mesmo inseto (uma carboxipeptidase A) está presente no mesmo pH luminal elevado, mas sua superfície apresenta um potencial eletroestático consideravelmente menor (dados não mostrados).

4.2.2. Distribuição de SLAM na fase larval

No intestino médio, a maior parte da atividade enzimática sobre laminarina se encontra no conteúdo luminal (82%), enquanto o epitélio contribui com apenas 18%. Essa localização majoritária no lúmen ventricular (82% da atividade total) é comparável

à determinada para amilase (97%) e tripsina (94%), que são enzimas secretadas pelo inseto (Ferreira *et al.*, 1994).

Ao longo do intestino médio, a atividade enzimática luminal apresenta um gradiente decrescente em direção à região posterior, enquanto no epitélio a atividade predomina na região posterior. A distribuição da atividade enzimática encontrada no epitélio está de acordo com as marcações de imunocitocalização de SLAM, que também mostram a predominância da enzima na porção posterior do epitélio intestinal. Essa diferença entre a predominância de expressão no epitélio posterior e maior atividade enzimática no conteúdo da porção anterior pode ser devido à circulação contra-fluxo que ocorre no espaço ecto-peritrófico (Bolognesi *et al.*, 2001). A enzima seria secretada pelo epitélio posterior do intestino médio, e então carregada para a porção anterior.

Para detectar a presença do RNAm correspondente a SLAM, utilizamos iniciadores específicos PCRs. Dessa forma, diferentes tecidos da larva de *S. frugiperda* - intestino médio anterior, médio ou posterior, Túbulos de Malpighi, corpo gorduroso ou carcaça - foram submetidos à extração de RNA total, para produção do cDNA correspondente. O DNA amplificado em PCRs revelou que SLAM é produzida exclusivamente pelo tubo digestivo. Ela também é detectada nos Túbulos de Malpighi, mas de forma bastante vestigial, o que poderia indicar uma contaminação na preparação. Devido à sua localização, SLAM provavelmente desempenha sua função exclusivamente no tubo digestivo.

4.2.3. Secreção da laminarinase de *S. frugiperda*

Os insetos lepidópteros possuem 2 mecanismos de secreção no intestino médio. As proteínas são secretadas em pequenas vesículas, por secreção microapócrina na porção anterior do intestino, e por exocitose clássica na região posterior (Ferreira *et al.*, 1994). O primeiro tipo é responsável pela secreção de tripsinas (Jordao *et al.*, 1999), de amilase e de uma peritrofina (Bolognesi *et al.*, 2001).

A inspeção dos cortes feitos para imunocitocalização em microscopia confocal mostra uma marcação de todo o tecido, e por isso esse método não pôde ser utilizado para a determinação do sítio de secreção da enzima.

Quando o material tratado com o anti-corpo foi observado em microscopia eletrônica de transmissão, nós verificamos que quase não há marcação nas células da região anterior do ventrículo, nem ao redor das microvilosidades, indicando que elas estariam adsorvidas ao glicocálix. Já as células colunares presentes na região posterior do ventrículo apresenta marcação dentro das vesículas de secreção e ao redor das microvilosidades.

As determinações de atividade laminarinásica ao longo do epitélio do intestino médio revelaram uma distribuição condizente com a demonstrada pelos experimentos de imunohistoquímica. A atividade determinada na porção posterior é maior do que na porção anterior e porção média.

A detecção da laminarinase nas vesículas de secreção das células do intestino médio de *S. frugiperda* demonstra que a enzima é secretada pelo epitélio do intestino, e não por simbiontes. O papel de tais simbiontes na digestão de β -glucanas foi inicialmente muito enfatizado, mas cada vez mais se verifica que os insetos e outros invertebrados são capazes de produzir essas enzimas em grandes quantidades, e o

papel dos simbiossiontes é muitas vezes nulo (Genta *et al.*, 2006; Slaytor 1992).

4.3. Laminarinase de *T. molitor* (TLAM)

4.3.1. Identificação da enzima selvagem purificada e caracterizada

A laminarinase digestiva de *T. molitor* já foi purificada e caracterizada, incluindo modificações químicas de resíduos de aminoácidos importantes para sua atividade (Genta, 2004). Inúmeras tentativas para obter a sequência codificante da laminarinase de *T. molitor* foram feitas, mas sem sucesso. Entre diversas sequências de cDNA obtidas, muitas correspondiam a β -glicosidases. Utilizando uma abordagem de larga escala, em que PCRs de menor especificidade resultaram em um número grande de fragmentos diferentes, foi possível obter a sequência completa de uma β -1,3-glucanase digestiva de *T. molitor*. Dentre as sequências obtidas de proteínas diversas, uma era mais semelhante às laminarinases de insetos já conhecidas, cuja sequência apresenta alguns possíveis sítios de glicosilação. Outros sítios de glicosilação foram preditos, mas em uma modelagem automática da estrutura tridimensional, os sítios se encontram consideravelmente distantes da superfície da molécula, sendo pouco provável que esses resíduos de aminoácidos fossem glicosilados de fato. O tamanho da enzima madura, predita *in-silico* a partir da sequência de cDNA (40,1 kDa), é comparável com a laminarinase de *S. frugiperda* (40,41 kDa), e *D. saccharalis* (40,44 kDa). A migração visualizada em SDS-PAGE da laminarinase de *T. molitor* purificada a partir do animal corresponde a uma massa molecular de 50 kDa, diferente do observado para a de *S. frugiperda*, de 45 kDa. A proteína purificada foi submetida à espectrometria de massas,

e sua identidade definida como sendo a sequência de cDNA obtida por nós. Os resíduos catalíticos e os possíveis resíduos de amino-ácidos próximos a eles foram correlacionados com os resultados obtidos por modificação química da enzima. Estes resíduos de amino-ácidos são candidatos a mutações sítio-dirigidas, a fim de elucidar o papel que os mesmos desempenham no mecanismo catalítico da enzima.

4.4. Evolução e função das β -glucanases de insetos

Após a demonstração que um cupim (*Reticulitermes flavipes*) é incapaz de sobreviver sem protozoários em seu intestino posterior (Cleveland 1924), a presença de protozoários simbióticos foi utilizada pelas próximas décadas para explicar a digestão de celulose em invertebrados e mamíferos herbívoros. Sendo uma carboidrase típica de microorganismos, as laminarinases se encontravam dentro desse mesmo paradigma. Somente em 1995 a primeira β -1,3-glucanase animal foi descrita, a partir de um ouriço-do-mar (Bachman e McClay 1996). β -1,3-glucanases digestivas são amplamente distribuídas em todas as ordens de insetos estudadas até o momento, mas a origem dessas enzimas permanece pouco explorada. β -1,3-glucanases são produzidas pelo intestino médio de *S. frugiperda* (este trabalho), *T. molitor* (Genta, 2004 e este trabalho), *Periplaneta americana* e *Abracris flavolineata* (Genta *et al.*, 2007; Genta *et al.*, 2003) e *Helicoverpa armigera* (Pauchet *et al.*, 2009). São encontradas também em outros invertebrados, plantas, fungos e bactérias, mas ausentes em Cephalocordata e Vertebrata (CAZy, www.cazy.org).

Em *S. frugiperda*, demonstramos a secreção de uma β -1,3-glucanase (SLAM)

por imunocitocalização, a primeira evidência histológica de produção endógena de uma laminarinase por um inseto. Atualmente, há diversas sequências de laminarinases depositadas em bancos de dados, pertencentes à mesma família 16 das glicosil-hidrolases (CaZy), mas curiosamente *Drosophila* sp. não possui sequência codificante de laminarinase em seu genoma. Isso ocorre também com genes correspondentes à atividade enzimática sobre β -1,3-glucanas, como β -1,3-glicosidases.

Os alinhamentos *in silico* das sequências de proteínas obtidas revelaram que a β -glucanase de *P. americana* tem menor identidade e similaridade com a β -glucanase de *S. frugiperda* do que com enzimas de outros insetos. Provavelmente isso ocorre devido ao fato da enzima de *P. americana* ser uma liqueninase (β -1,3-1,4 glucanase), e as outras enzimas de insetos obtidas por nós serem laminarinases (β -1,3-glucanases). Obtivemos uma sequência parcial da proteína purificada a partir do intestino de *P. americana* (resultados não apresentados) e verificou-se que ela correspondia à sequência completa obtida por nós. Essa enzima já foi caracterizada anteriormente e denominada LIC1 (Genta *et al.*, 2003).

Nos animais menos derivados, as β -1,3-glucanases possuem uma região N-Terminal com cerca de 100 amino-ácidos, que está ausente nas glucanases de artrópodes. Moluscos têm os dois tipos de enzima, sugerindo que nesse grupo as β -1,3-glucanases sofreram duplicação gênica, e uma das cópias teria perdido essa região N-Terminal.

Proteínas ligantes de β -glucana como GNBPs são encontradas na hemolinfa de insetos, sendo secretadas pelo corpo gorduroso e hemócitos (Fabrick *et al.*, 2003; Ochiai e Ashida 2000; Zhang *et al.*, 2003), e são parte do sistema imune dos insetos

(Warr *et al.*, 2008). GNBPs e outras proteínas ligantes de β -glucana são muito similares a β -1,3-glucanases. Devido a isso, a intensa busca pelos componentes do sistema imune em insetos levou a classificação equivocada de muitas β -1,3-glucanases como proteínas ligantes de β -glucana (Genta, 2004; Pauchet *et al.*, 2009). É interessante destacar que as seqüências de proteínas ligantes de glucanas ou ligantes de bactérias que possuem os resíduos catalíticos oriundas de cupins, por exemplo, foram obtidas a partir de ácidos nucleicos extraídos de organismos inteiros (Bulmer e Crozier 2006), e que as sequências oriundas de mosquitos (Valenzuela *et al.*, 2002) foram obtidas a partir de glândulas salivares do insetos. Dessa forma, é possível que as sequências de GNBPs obtidas para cupins sejam na verdade digestivas, e não oriundas da hemolinfa. Além disso, nos dois casos os organismos estudados (cupins e larvas de mosquitos) são detritívoros, cuja dieta pode incluir grande quantidade de fungos.

As GNPBs e outras proteínas ligantes de β -glucana possuem a região N-Terminal citada anteriormente, da mesma forma que as β -1,3-glucanases menos derivadas. Assim, é provável que as proteínas ligantes tenham se originado da duplicação do gene da β -1,3-glucanase ao perder os resíduos catalíticos. Essa região N-Terminal é responsável pela ligação a oligossacarídeos na GGBP de *Drosophila* (Mishima *et al.*, 2009) e em *Bombyx mori* (Takahasi *et al.*, 2009), mas em β -glucanases seu papel é desconhecido. Devido à similaridade entre as sequências, é possível que desempenhe um papel semelhante, mas que não seria necessário no caso das β -glucanases de insetos, que não têm esse N-Terminal.

A localização da enzima no tubo digestivo não significa necessariamente uma função digestiva. São encontradas outras funções, como a de defesa imunológica (amidase PGRB-LB, Zaidman-Remy *et al.*, 2006). Uma enzima que cumpre um papel digestivo deve atuar sobre o alimento ingerido, cujos produtos sofrem digestão adicional e/ou são absorvidos e utilizados como nutrientes pelo animal.

O baixo grau de ataque múltiplo da laminarinase de *S. frugiperda* poderia diminuir o tamanho de cadeias de polisacarídeo rapidamente. Isso diminuiria a viscosidade do bolo alimentar mais rapidamente do que uma enzima processiva, pois a cada hidrólise do substrato sua cadeia cai para aproximadamente a metade. Uma vez que a enzima não ataca β -1,3(4)-glucanas nem β -glucanas de cereais, seu papel *in vivo* não deve ser o de diminuir a viscosidade do material ingerido, impedindo a obstrução do movimento do bolo alimentar ao longo do intestino.

Sua função fisiológica pode ser a desestruturação da parede de fungos, para obter alimento ou defesa. A propriedade lítica de β -1,3-glucanases provenientes de insetos já foi descrita anteriormente (Genta *et al.*, 2007; Genta *et al.*, 2003). Essa capacidade sugere um papel de defesa contra fungos, e também pode permitir obter nutrientes a partir dessas células, porque a enzima seria capaz de atacar a parede celular, muitas vezes composta principalmente de β -1,3-glucana. Esses insetos detritívoros vivem em ambientes ricos em materiais decompostos, onde é esperado uma presença considerável de fungos, entre outros organismos decompositores. De fato, nos trabalhos já realizados, após incubar a laminarinase na presença de células vivas de *S. cerevisiae*, a viabilidade das células de levedura decresce no decorrer do tempo (Genta, 2004). Diferente do observado para outras enzimas, a β -1,3-glucanase

de *S. frugiperda* não promove a lise das células. Isso acontece mesmo em altas concentrações de enzima em incubações de 24 hs (dados não mostrados). A incubação das leveduras com a fração solúvel do conteúdo da larva indica que também não é um problema de sinergismo, em que a laminarinase caracterizada prescindisse de outras enzimas para promover a lise das células de *S. cerevisiae*. É possível que a enzima apresente uma especificidade majoritária para outro substrato, não sendo capaz de atacar a parede celular de fungos. Isso indicaria uma função biológica diferente, como por exemplo atacar a calose produzida pelas células vegetais, em resposta à herbivoria. Quando um tecido vegetal sofre injúrias de qualquer natureza, seja mecânica, química ou infecção por vírus, as células vegetais da região da injúria rapidamente iniciam a deposição de uma parede de β -1,3-glucana (chamada de calose) entre a membrana celular e a parede vegetal, para proteger o tecido contra novos danos. Assim, insetos herbívoros que possuam enzimas capazes de degradar essa parede obtêm os nutrientes contidos nessas células vegetais. A larva de *S. frugiperda* não está exposta a fungos e bactérias da mesma maneira que larvas de *T. molitor*, por exemplo, cuja laminarinase é ativa contra leveduras. Em *S. frugiperda* não se encontra atividade de celulase digestiva, o que aumentaria a importância de uma laminarinase na digestão de tecido vegetal. Uma β -1,3-glucanase de *Helicoverpa armigera* poderia aparentemente estar envolvida na defesa contra patógenos (Pauchet *et al.*, 2009). Esses autores correlacionaram a dieta contendo bactérias e fungos com o aumento da expressão do RNAm correspondente à laminarinase, e sugerem, portanto, que a enzima poderia atuar como um detector de patógenos ingeridos pelo animal. O conteúdo luminal dessa Lepidoptera apresentou

atividade somente sobre CM-curdlan (que contém exclusivamente ligações do tipo β -1,3), mas não sobre liquenana (β -1,4) ou β -glucana de cevada (β -1,3(4) mista) (Pauchet *et al.*, 2009), a mesma especificidade encontrada por nós para a enzima purificada de *S. frugiperda*. A criação em dietas contendo bactérias e fungos foi testada por nós no Coleoptera *T. molitor*, cuja enzima tem alta atividade lítica contra fungos (Genta, 2004). Após 48 hs em dietas contendo bactérias ou fungos, a atividade laminarinásica do conteúdo luminal foi medida, mas não foi encontrada diferença entre as amostras. Esse material foi também submetido à um ensaio *in-gel* para separação das diferentes atividades sobre laminarina, mas as diferenças não foram significativas (dados não mostrados). Isso indica que, pelo menos em *T. molitor*, a β -1,3-glucanase desempenha um papel digestivo, atuando sobre a parede de fungos, mantendo baixa a quantidade deste componente da dieta no intestino (Genta *et al.*, 2006), sem indícios de modulação da expressão influenciada pela dieta. A larva de *H. armigera*, assim como a de *S. frugiperda*, não é detritívora, e portanto está menos exposta à fungos e bactérias oriundos da dieta. Dessa forma, e devido à falta de atividade lítica contra fungos, a enzima de *H. armigera* e de *S. frugiperda* poderia desempenhar um papel de digestão, atuando sobre a calose depositada em tecidos vegetais que sofreram injúria. A laminarinase de *H. armigera* é capaz de se ligar e clivar curdlan, uma β -1,3-glucana produzida por algumas bactérias do gênero *Agrobacterium* sp e *Rhizobium* sp, presentes no solo (Pauchet *et al.*, 2009). A primeira infecta raízes de plantas, causando tumores, enquanto a segunda está envolvida na fixação de nitrogênio atmosférico. A curdlan produzida por bactérias do gênero *Agrobacterium* sp aparentemente está envolvida na formação de biofilmes, que as protegem de ataques de outros

microorganismos e outras condições adversas (Costerton *et al.*, 1987; Roberts 1996). O que não está estabelecido é se *H. armigera* ingere esse tipo de bactéria em sua dieta natural, e se essa laminarinase possui capacidade lítica sobre essas mesmas bactérias. Ainda seria necessário demonstrar que a ingestão dessas bactérias causa algum problema ao inseto, e/ou sua digestão provê algum valor nutricional. Por outro lado, nas outras bactérias, a parte da parede celular que seria reconhecida contém majoritariamente (quando não exclusivamente) polissacarídeos modificados e unidos por ligações que não são do tipo β -1,3 (Muller-Loennies *et al.*, 2003; Niedziela *et al.*, 2002). É possível que o aumento da expressão da laminarinase digestiva quando o animal ingere bactérias seria uma resposta genérica, em que o animal estaria antecipando uma defesa contra fungos, já que a co-existência desses dois patógenos não é incomum, e a detecção de bactérias seria feita de outro modo.

A técnica de RNA de interferência seria interessante para ajudar a estabelecer a função das β -1,3-glucanases digestiva de insetos. No caso de *S. frugiperda*, a larva seria criada em uma dieta mais próxima ao natural. Se SLAM desempenhar uma função digestiva, atuando por exemplo sobre a calose formada, a supressão de sua expressão poderia diminuir o ganho de peso ou encurtar a fase larval, antecipando a pupa. Já no caso de TLAM, sua supressão por RNAi poderia ocasionar um aumento na quantidade de fungos encontrados em seu intestino. Os efeitos podem ser mais diversos em comparação com *S. frugiperda*, já que o equilíbrio da microbiota intestinal na larva de *T. molitor* estaria comprometido.

Muitos estudos futuros ainda devem ser realizados para um entendimento mais claro do papel fisiológico dessas enzimas no intestino dos insetos.

5. Conclusões

As sequências de cDNA correspondentes a laminarinases digestivas de *S. frugiperda*, *D. saccharalis*, *T. molitor* e *P. americana* foram obtidas, e tiveram suas estruturas primárias determinadas.

As laminarinases digestivas de insetos pertencem à família 16 das Glicosídeo-Hidrolases.

A laminarinase de *S. frugiperda* é originária do epitélio intestinal, e não de simbioses. Ela foi purificada e caracterizada, e imunocitocalizada no epitélio intestinal. Suas propriedades indicam um papel fisiológico distinto dos descritos em outras laminarinases, possivelmente atuando em calose apositadas em tecido vegetal após injúria por herbivoria.

6. Referências

- Allouch, J.; Helbert, W.; Henrissat, B.; and Czjzek, M. Parallel substrate binding sites in a beta-agarase suggest a novel mode of action on double-helical agarose. **Structure London England** **1993**, v. 12, p. 623-632, 2004.
- Alstad, D. N.; and Andow, D. A. Managing the Evolution of Insect Resistance to Transgenic Plants. **Science**, v. 268, p. 1894-1896, 1995.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; and Lipman, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- Bachman, E. S.; and McClay, D. R. Molecular cloning of the first metazoan beta-1,3 glucanase from eggs of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 6808-6813, 1996.
- Bauer, L. S. Resistance: A threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Florida Entomologist**, v. 78, p. 414-443, 1995.
- Bendtsen, J. D.; Nielsen, H.; Heijne, G. von; and Brunak, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, p. 783-795, 2004.
- Benen, J. A.; Kester, H. C.; and Visser, J. Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. **The Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 259, p. 577-585, 1999.
- Blum, H.; Beier, H.; and Gross, H. J. Improved Silver Staining of Plant-Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- Bolognesi, R.; Ribeiro, A. F.; Terra, W. R.; and Ferreira, C. The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: Secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, p. 62-75, 2001.
- Breyer, W. A.; and Matthews, B. W. A structural basis for processivity. **Protein Science**, v. 10, p. 1699-1711, 2001.
- Bulmer, M. S.; and Crozier, R. H. Variation in positive selection in termite GNBPs and relish. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, p. 317-326, 2006.
- Cleveland, L. R. The physiological and symbiotic relationships between the intestinal protozoa of termites and their host, with special reference to *Reticulitermes flavipes* Kollar. **Biological Bulletin**, v. 46, p. 178-201, 1924.
- Costerton, J. W.; Cheng, K. J.; Geesey, G. G.; Ladd, T. I.; Nickel, J. C.; Dasgupta, M.; and Marrie, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 435-464, 1987.
- Coutinho, P. M.; and Henrissat, B. Carbohydrate-active enzymes: An integrated database approach. In **Recent Advanced in Carbohydrate Bioengineering**, p. 3-12, 1999.

- Dahlqvist, A. Assay of Intestinal Disaccharidases. **Analytical Biochemistry**, v. 22, p. 99-107, 1968.
- Davies, G.; and Henrissat, B. Structures and Mechanisms of Glycosyl Hydrolases. **Structure**, v. 3, p. 853-859, 1995.
- Dixon, M.; and Webb, E. C. Enzymes. **Academic Press, Inc., New York**, 1979.
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; and Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- Evans, N. A.; Hoyne, P. A.; and Stone, B. A. Characteristics and Specificity of the Interaction of a Fluorochrome from Aniline Blue (Sirofluor) with Polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 4, p. 215-230, 1984.
- Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M. C.; and Green, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.
- Fabrick, J. A.; Baker, J. E.; and Kanost, M. R. cDNA cloning, purification, properties, and function of a beta-1,3-glucan recognition protein from a pyralid moth, *Plodia interpunctella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 579-594, 2003.
- Ferreira, A. H. P.; Marana, S. R.; Terra, W. R.; and Ferreira, C. Purification, molecular cloning, and properties of a beta-glycosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 1065-1076, 2001.
- Ferreira, C.; Capella, A. N.; Sitnik, R.; and Terra, W. R. Digestive Enzymes in Midgut Cells, Endoperitrophic and Ectoperitrophic Contents, and Peritrophic Membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) Larvae. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 26, p. 299-313, 1994.
- Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R. D.; and Bairoch, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 3784-3788, 2003.
- Genta, F. A. Purificação e Caracterização de beta-1,3-glucanases de Insetos. São Paulo: IQ-USP. p. 232, 2004.
- Genta, F. A.; Dillon, R. J.; Terra, W. R.; and Ferreira, C. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, p. 593-601, 2006.
- Genta, F. A.; Dumont, A. F.; Marana, S. R.; Terra, W. R.; and Ferreira, C. The interplay of processivity, substrate inhibition and a secondary substrate binding site of an insect exo-beta-1,3-glucanase. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1774, p. 1079-1091, 2007.
- Genta, F. A.; Terra, W. R.; and Ferreira, C. Action pattern, specificity, lytic activities, and physiological role of five digestive beta-glucanases isolated from *Periplaneta*

- americana. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 1085-1097, 2003.
- Gordon, D.; Abajian, C.; and Green, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.
- Gorman, M. J.; Kankanala, P.; and Kanost, M. R. Bacterial challenge stimulates innate immune responses in extra-embryonic tissues of tobacco hornworm eggs. **Insect Molecular Biology**, v. 13, p. 19-24, 2004.
- Grimaldi, D.; and Engel, M. S. Evolution of Insects. **Cambridge University Press, Cambridge, UK**, 2005.
- Groombridge, B.; and Jenkins, M. D. World Atlas of Biodiversity. **University of California Press, Berkeley**, 2002.
- Hahn, M.; Olsen, O.; Politz, O.; Borriss, R.; and Heinemann, U. Crystal structure and site-directed mutagenesis of *Bacillus macerans* endo-1,3-1,4-beta-glucanase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 3081-3088, 1995.
- Higgins, D. G. CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences. **Methods Mol Biol**, v. 25, p. 307-318, 1994.
- Hilder, V. A.; and Boulter, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance - a critical review. **Crop Protection**, v. 18, p. 177-191, 1999.
- Irwin, D.; Shin, D.-H.; Zhang, S.; Barr, B. K.; Sakon, J.; Karplus, P. A.; and Wilson, D. B. Roles of the catalytic domain and two cellulose binding domains of *Thermomonospora fusca* E4 in cellulose hydrolysis. **Journal Of Bacteriology**, v. 180, p. 1709-1714, 1998.
- Janeway, C. A.; and Medzhitov, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197-216, 2002.
- Jiang, H.; Ma, C.; Lu, Z.-Q.; and Kanost, M. R. Beta-1,3-glucan recognition protein-2 (betaGRP-2) from *Manduca sexta*; an acute-phase protein that binds beta-1,3-glucan and lipoteichoic acid to aggregate fungi and bacteria and stimulate prophenoloxidase activation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 89-100, 2004.
- Johnston, M.; Flick, J. S.; and Pexton, T. Multiple Mechanisms Provide Rapid and Stringent Glucose Repression of Gal Gene-Expression in *Saccharomyces-Cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, p. 3834-3841, 1994.
- Jordao, B. P.; Capella, A. N.; Terra, W. R.; Ribeiro, A. F.; and Ferreira, C. Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, and trypsin and secretory mechanisms in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, p. 29-37, 1999.
- Jordao, B. P.; Lehane, M. J.; Terra, W. R.; Ribeiro, A. F.; and Ferreira, C. An immunocytochemical investigation of trypsin secretion in the midgut of the stablefly, *Stomoxys calcitrans*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, p. 445-453, 1996.

- Jouanin, L.; Bonade-Bottino, M.; Girard, C.; Morrot, G.; and Giband, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v. 131, p. 1-11, 1998.
- Julenius, K.; Molgaard, A.; Gupta, R.; and Brunak, S. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. **Glycobiology**, v. 15, p. 153-164, 2005.
- Keitel, T.; Simon, O.; Borriss, R.; and Heinemann, U. Molecular and active-site structure of a *Bacillus* 1,3-1,4-beta-glucanase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 5287-5291, 1993.
- Kim, Y. S.; Ryu, J. H.; Han, S. J.; Choi, K. H.; Nam, K. B.; Jang, I. H.; Lemaitre, B.; Brey, P. T.; and Lee, W. J. Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 32721-7, 2000.
- Kozhemyako, V. B.; Rebrikov, D. V.; Lukyanov, S. a; Bogdanova, E. a; Marin, A.; Mazur, A. K.; Kovalchuk, S. N.; Agafonova, E. V.; Sova, V. V.; Elyakova, L. a; and Rasskazov, V. a. Molecular cloning and characterization of an endo-1,3-beta-D-glucanase from the mollusk *Spisula sachalinensis*. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 137, p. 169-78, 2004.
- Kramhøft, B.; Bak-Jensen, K. S.; Mori, H.; Juge, N.; Nøhr, J.; and Svensson, B. Involvement of individual subsites and secondary substrate binding sites in multiple attack on amylose by barley alpha-amylase. **Biochemistry**, v. 44, p. 1824-1832, 2005.
- Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, p. 680-&, 1970.
- Lambert, C.; Leonard, N.; De Bolle, X.; and Depiereux, E. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. **Bioinformatics**, v. 18, p. 1250-1256, 2002.
- Larson, S. B.; Greenwood, A.; Cascio, D.; Day, J.; and McPherson, A. Refined molecular structure of pig pancreatic alpha-amylase at 2.1 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 235, p. 1560-1584, 1994.
- Lee, H.; Kwon, H.-M.; Park, J.-W.; Kurokawa, K.; and Lee, B. L. N-terminal GGBP homology domain of Gram-negative binding protein 3 functions as a beta-1,3-glucan binding motif in *Tenebrio molitor*. **BMB reports**, v. 42, p. 506-510, 2009.
- Leung, M. Y. K.; Liu, C.; Koon, J. C. M.; and Fung, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology letters**, v. 105, p. 101-14, 2006.
- Luo, H.; Yang, J.; Yang, P.; Li, J.; Huang, H.; Shi, P.; Bai, Y.; Wang, Y.; Fan, Y.; and Yao, B. Gene cloning and expression of a new acidic family 7 endo-beta-1,3-1,4-glucanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1015-1023, 2010.
- Ma, C.; and Kanost, M. R. A beta1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca*

- sexta, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 7505-7514, 2000.
- Manners, D. J.; Masson, A. J.; and Patterso, J. C. Structure of a Beta-(1-3)-D-Glucan from Yeast-Cell Walls. **Biochemical Journal**, v. 135, p. 19-30, 1973.
- Marinotti, O.; Nguyen, Q. K.; Calvo, E.; James, A. A.; and Ribeiro, J. M. C. Microarray analysis of genes showing variable expression following a blood meal in *Anopheles gambiae*. **Insect Molecular Biology**, v. 14, p. 365-373, 2005.
- McGaughey, W. H.; and Whalon, M. E. Managing Insect Resistance To *Bacillus-Thuringiensis* Toxins. **Science**, v. 258, p. 1451-1455, 1992.
- Michel, G.; Chantalat, L.; Duee, E.; Barbeyron, T.; Henrissat, B.; Kloareg, B.; and Dideberg, O. The kappa-carrageenase of *P. carrageenovora* features a tunnel-shaped active site: a novel insight in the evolution of Clan-B glycoside hydrolases. **Structure London England** 1993, v. 9, p. 513-525, 2001a.
- Michel, T.; Reichhart, J. M.; Hoffmann, J. A.; and Royet, J. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. **Nature**, v. 414, p. 756-759, 2001b.
- Mishima, Y.; Quintin, J.; Aimanianda, V.; Kellenberger, C.; Coste, F.; Clavaud, C.; Hetru, C.; Hoffmann, J. A.; Latge, J. P.; Ferrandon, D.; and Roussel, A. The N-terminal Domain of *Drosophila* Gram-negative Binding Protein 3 (GNBP3) Defines a Novel Family of Fungal Pattern Recognition Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 28687-28697, 2009.
- Muller-Loennies, S.; Lindner, B.; and Brade, H. Structural analysis of oligosaccharides from lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* K12 strain W3100 reveals a link between inner and outer core LPS biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 34090-34101, 2003.
- NC-IUB. Symbolism and terminology in Enzyme Kinetics. Recommendations 1981. **Biochemical Journal**, 1983.
- Niedziela, T.; Lukasiewicz, J.; Jachymek, W.; Dzieciatkowska, M.; Lugowski, C.; and Kenne, L. Core oligosaccharides of *Plesiomonas shigelloides* O54 : H2 (strain CNCTC 113/92) - Structural and serological analysis of the lipopolysaccharide core region, the O-antigen biological repeating unit, and the linkage between them. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 11653-11663, 2002.
- Noelting, G.; and Bernfeld, P. *Sur Les Enzymes Amylolytiques .3. La Beta-Amylase - Dosage Dactivite Et Controle De Labsence Dalpha-Amylase. **Helvetica Chimica Acta**, v. 31, p. 286-290, 1948.
- Ochiai, M.; and Ashida, M. A pattern-recognition protein for beta-1,3-glucan. The binding domain and the cDNA cloning of beta-1,3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 4995-5002, 2000.
- Oviedo, M. N.; VanEkeris, L.; Corena-Mcleod, M. D. P.; and Linser, P. J. A microarray-

- based analysis of transcriptional compartmentalization in the alimentary canal of *Anopheles gambiae* (Diptera : Culicidae) larvae. **Insect Molecular Biology**, v. 17, p. 61-72, 2008.
- Parra, J. R. P. Criação de Insetos para Estudos com Patógenos. **Controle Microbiano de Insetos. São Paulo: Editora Manole**, p. 348-373, 1986.
- Pauchet, Y.; Freitak, D.; Heidel-Fischer, H. M.; Heckel, D. G.; and Vogel, H. Immunity or digestion: glucanase activity in a glucan-binding protein family from Lepidoptera. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 2214-2224, 2009.
- Planas, N. Bacterial 1,3-1,4-beta-glucanases: structure, function and protein engineering. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, p. 361-382, 2000.
- Rajagopal, R.; Sivakumar, S.; Agrawal, N.; Malhotra, P.; and Bhatnagar, R. K. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 46849-46851, 2002.
- Roberts, I. S. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 285-315, 1996.
- Roby, J. F.; and French, D. Multiple Attack Hypothesis of Alpha-Amylase Action - Action of Porcine Pancreatic Human Salivary and *Aspergillus Oryzae* Alpha-Amylases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 122, p. 8-&, 1967.
- Rocchia, W.; Sridharan, S.; Nicholls, A.; Alexov, E.; Chiabrera, A.; and Honig, B. Rapid grid-based construction of the molecular surface and the use of induced surface charge to calculate reaction field energies: Applications to the molecular systems and geometric objects. **Journal of Computational Chemistry**, v. 23, p. 128-137, 2002.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; and Coulson, A. R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- Schomburg, D.; and Salzmann, M. Enzyme Handbook 3: Hydrolases. p. 1-825, 1991.
- Schoonhoven, L. M. Insect-plant relationships: the whole is more than the sum of its parts. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 115, p. 5-6, 2005.
- Schuler, T. H.; Poppy, G. M.; Kerry, B. R.; and Denholm, I. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in biotechnology**, v. 16, p. 168-175, 1998.
- Shade, R. E.; Schroeder, H. E.; Pueyo, J. J.; Tabe, L. M.; Murdock, L. L.; Higgins, T. J. V.; and Chrispeels, M. J. Transgenic pea seeds expressing the alpha-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. v. 12, p. 793-796, 1994.
- Sheffield, J. B. ImageJ, a useful tool for biological image processing and analysis. **Microscopy and Microanalysis**, v. 13, p. 200-201, 2007.
- Slaytor, M. Cellulose Digestion in Termites and Cockroaches - What Role Do Symbionts

- Play. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 103, p. 775-784, 1992.
- 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. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.
- Stahl, E. Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook. **Berlin: Springer-Verlag**, 1969.
- Stefanin, M.; Demartin, C.; and Zamboni, L. Fixation of Ejaculated Spermatozoa for Electron Microscopy. **Nature**, v. 216, p. 173-174, 1967.
- Takahasi, K.; Ochiai, M.; Horiuchi, M.; Kumeta, H.; Ogura, K.; Ashida, M.; and Inagaki, F. Solution structure of the silkworm betaGRP/GNBP3 N-terminal domain reveals the mechanism for beta-1,3-glucan-specific recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 11679-84, 2009.
- Terra, W. R.; and Ferreira, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry Molecular Biology**, v. 109, p. 1-62, 1994.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; and Gordon, J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
- Valenzuela, J. G.; Pham, V. M.; Garfield, M. K.; Francischetti, I. M. B.; and Ribeiro, J. M. C. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 1101-1122, 2002.
- Varrot, A.; Frandsen, T. P.; Ossowski, I.; Boyer, V.; Cottaz, S.; Driguez, H.; Schüle, M.; and Davies, G. J. Structural basis for ligand binding and processivity in cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens*. **Structure London England** **1993**, v. 11, p. 855-864, 2003.
- Vasur, J.; Kawai, R.; Larsson, A. M.; Igarashi, K.; Sandgren, M.; Samejima, M.; and Stahlberg, J. X-ray crystallographic native sulfur SAD structure determination of laminarinase Lam16A from *Phanerochaete chrysosporium*. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 62, p. 1422-1429, 2006.
- Wang, Y.; Sumathipala, N.; Rayaprolu, S.; and Jiang, H. Recognition of microbial molecular patterns and stimulation of prophenoloxidase activation by a beta-1,3-glucanase-related protein in *Manduca sexta* larval plasma. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 41, p. 322-331, 2011.
- Warr, E.; Das, S.; Dong, Y.; and Dimopoulos, G. The Gram-negative bacteria-binding protein gene family: its role in the innate immune system of *Anopheles gambiae* and in anti-*Plasmodium* defence. **Insect Molecular Biology**, v. 17, p. 39-51, 2008.

- Westermeier, R. Isoelectric focusing. **Methods Mol Biol**, v. 244, p. 225-232, 2004.
- Winfrey, R.; Aguilar, R.; Vazquez, D.; LeBuhn, G.; and Aizen, M. A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. **Ecology**, v. 90, p. 2068-2076, 2009.
- Yan, J. X.; Wait, R.; Berkelman, T.; Harry, R. A.; Westbrook, J. A.; Wheeler, C. H.; and Dunn, M. J. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 21, p. 3666-3672, 2000.
- Zaidman-Remy, A.; Herve, M.; Poidevin, M.; Pili-Floury, S.; Kim, M. S.; Blanot, D.; Oh, B. H.; Ueda, R.; Mengin-Lecreulx, D.; and Lemaitre, B. The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. **Immunity**, v. 24, p. 463-473, 2006.
- Zhang, R.; Cho, H. Y.; Kim, H. S.; Ma, Y. G.; Osaki, T.; Kawabata, S.-I.; Söderhäll, K.; and Lee, B. L. Characterization and properties of a 1,3-beta-D-glucan pattern recognition protein of *Tenebrio molitor* larvae that is specifically degraded by serine protease during prophenoloxidase activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 42072-42079, 2003.

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome: Ivan Bragatto

Local e data de nascimento: São Paulo, 17 de agosto de 2011

EDUCAÇÃO

Colégio Rio Branco, Cotia, 1999

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

Bacharel em Ciências Biológicas

OCUPAÇÃO

Aluno de Pós-Graduação, (doutorado), Universidade de São Paulo, 2006 até o presente

Bolsista CNPq

PUBLICAÇÕES

Artigos Completos

Bragatto, I.; Genta, F. A.; Ribeiro, A. F.; Terra, W. R.; and Ferreira, C. Characterization of a beta-1,3-glucanase active in the alkaline midgut of *Spodoptera frugiperda* larvae and its relation to beta-glucan-binding proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 861-872, 2010.

Genta, F. A.; Bragatto, I.; Terra, W. R.; and Ferreira, C. Purification, characterization and sequencing of the major beta-1,3-glucanase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. **Insect Biochemistry and molecular biology**, v. 39, p. 861-74, 2009.

Resumos em Congressos internacionais

Bragatto, I.; Genta, F. A.; Ribeiro, A. R.; Terra, W. R.; Ferreira, C. Partial purification, characterization, molecular cloning, recombinant expression and immunocytochemical localization of a b-1,3-glucanase from the midgut of *Spodoptera frugiperda* larvae, **34th meeting of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS)**, 2009

Florsheim, E. B.; Gomes, E.; Ferreira, C.; Russo, M. **Allergic Lung Disease Induced by Serine or Cysteine Proteases**, **15th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI)**, 2011

PARTICIPAÇÃO DO PROGRAMA DE APERFEIÇOAMENTO DE ENSINO (PAE)

Participação do Estágio supervisionado em docência do Programa de aperfeiçoamento de ensino (PAE) junto à disciplina de Bioquímica Experimental (QBQ-215), ministrado aos alunos da Farmácia (Integral) no 2º semestre de 2007, 2008 e 2009.