UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Digestão ácida em Diptera superiores

ÉRIKA HOTZ ALMEIDA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra

SÃO PAULO

2003

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

Almeida, Érika Hotz
A447d Digestão ácida em Diptera superiores / Érika Hotz
Almeida. -- São Paulo, 2003.
103p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Terra, Walter Ribeiro

1. Bioquímica : Diptera 2. Enzima : Inseto :
Bioquímica animal I. T. II. Terra, Walter Ribeiro,
orientador.

595.7704192 CDD

“Digestão Ácida em Diptera Superiores”

ÉRIKA HOTZ ALMEIDA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Prof. Dr. WALTER RIBEIRO TERRA
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

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

Prof. Dr. PEDRO LAGERBLAD DE OLIVEIRA
UF RJ

SÃO PAULO
10 DE MARÇO 2003.

*Dedico deste trabalho aos meus pais, que me incentivaram
e me ajudaram muito neste difícil período.*

A Daniel Stein, com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, de um modo ou de outro, contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial :

Ao Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra pela orientação, amizade e pela a oportunidade de trabalhar no laboratório ao lado de pessoas tão maravilhosas;

A Prof^a. Dr^a. Clélia Ferreira, pelas sugestões, pelo carinho e amizade, inesquecíveis;

Ao Dr. Plínio Tadeu Cristofolletti Jr, pela paciência e orientação durante a minha iniciação científica;

Aos membros do laboratório, Alexandre H. Ferreira, Pedro Jorge Chimoy Effio, Plínio T. Cristofolletti Júnior, Adriana R. Lopes, Alcides B. Dias, Ana Gomez Durand, Fernando A. Genta, Renata Bolognesi, Lucas Blanes, Maria Cícera P. Silva, Alexandra Dumond, Daniela Soltys e Lucas O. Guerra pelo maravilhoso trabalho em equipe e principalmente por todo apoio nos momentos mais difíceis, pelas sugestões, amizade sincera, bate-papos, e, entre outras coisas, lencinhos de papel;

Ao Prof. Dr. Sandro R Marana, pelas discussões, sugestões e amizade;

A Luiza Y. Nakabayashi e a Maria Ivanilde Marcelino pelo suporte técnico prestado, pelos bate-papos e pela amizade;

A Prof^a Dr^a Sirlei Daffre, pelos clones de lisozimas utilizados neste trabalho;

As amigas de toda hora: Amanda de Souza, Fernanda Desani, Hellen de Lima, Lia Karina Muschelack e Maria Cícera Pereira da Silva, pelos puxões de orelha, boas risadas, bate-papos e baladas;

A Daniel Stein, por todo amor, carinho, amizade, dedicação e apoio, em todos os momentos. Muito obrigada por tudo;

Aos meus pais e meu irmão por toda paciência, todo apoio (emocional e material), pelo carinho e orientação;

A meus irmãos postigos Valéria Novaes Macabelli, Daniel e Thiago Catafesta Martins, que de um jeito ou de outro, sempre estiveram presentes;

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Química da USP, pela compreensão e pela ajuda na resolução de “pepinos” burocráticos (sem mencionar os históricos escolares);

A todos os colegas do Instituto de Química, em especial aos do bloco 12, pela ajuda e bons papos;

A FAPESP e ao CNPq pelos auxílios concedidos ao laboratório e especialmente a FAPESP pela bolsa de estudos a mim concedida.

LISTA DE ABREVIATURAS

DEPC	pirocarbonato de dietila
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	etilenodiaminotetracetato de sódio
FITC	fluoresceína isotiocianato
FPLC	“Fast Protein Liquid Chromatography”
IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
LB	meio de cultura de Luria-Bertani
MES	ácido 2-(N-morfolino)etano sulfônico
NZ-amina	caseína hidrolisada enzimaticamente
NZY	meio de cultura com NZ-amina
PCR	reação em cadeia da polimerase
pb	pares de bases
PM	peso molecular
PVDF	difluoreto de polivinilideno
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
TAE	tampão Tris-acetato EDTA
TCA	ácido tricloroacético
Tris	tris(hidroximetil)amino-metano
UV	ultravioleta

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Considerações Iniciais	01
1.2. Aspectos gerais da digestão de insetos	02
1.3. Digestão ácida nos Diptera superiores	05
1.4. Lizozimas digestivas	07
1.5. Aspártico-proteinase	13
1.6. Aspártico-proteinase de larvas de <i>M. domestica</i>	15
1.7. Objetivos deste projeto	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. Estudo da catepsina D de <i>Musca domestica</i>	19
2.1.1. Animais	19
2.1.2. Preparação das amostras	19
2.1.3. Determinação de proteínas e de atividades enzimáticas	20
2.1.4. Estabilidade ao congelamento	22
2.1.5. Purificação de catepsina D de <i>Musca domestica</i>	22
2.1.5.1 Cromatografia em coluna de troca iônica	23

2.1.5.2. Filtração em gel	23
2.1.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida	24
2.1.7. Preparação de material para seqüenciamento da porção N-terminal	24
2.1.8. Extração de RNA de tecidos para confecção de biblioteca de cDNA	26
2.2. Estudo das lisozimas	27
2.2.1. Expressão de lisozimas em <i>E. coli</i>	27
2.2.1.1. Transformação de bactérias	28
2.2.1.2. Indução de bactérias utilizando IPTG	28
2.2.1.3. Lise de células	30
2.2.1.4. Solubilização de proteínas de corpos de inclusão	33
2.2.2. Expressão de lisozimas em <i>P.pastoris</i>	33
2.2.2.1 Transformação de <i>Pichia pastoris</i>	34
2.2.2.2. Indução de <i>Pichia pastoris</i>	34
2.2.3. Meios e soluções utilizados	35
2.2.3.1. meio LB	35
2.2.3.2. Placas de LB-ágar	35
2.2.3.3. Tampão TAE 50x	35
2.2.3.4. H ₂ O-DEPC	35

2.2.3.5. meio NZY ⁺	36
2.2.3.6. placa MD	36
2.2.3.7. meio MM	36
2.2.3.8. placa ML-ágar	36
2.2.3.9. meio YPD	36
2.2.4. "Primers" desenhados para amplificação dos genes estudados	37
2.2.5. Reação em cadeia com DNA polimerase em termociclador (PCR)	39
2.2.6. PCR de material de colônias de <i>P. pastoris</i>	39
2.2.7. Extração de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose	40
2.2.8. Eletroforese em gel de agarose	40
2.2.9. Purificação de plasmídeos a partir de uma cultura de bactérias	41
2.2.10. Digestão utilizando enzimas de restrição	42
2.2.11. Reação de ligação entre fragmentos de DNA e plasmídeos vetores	42
2.2.12. Detecção de atividade de lisozima	42
2.2.13. Purificação de lisozima D recombinante	43
2.2.14. Efeito do pH e da força iônica sobre a atividade enzimática de lisozima D recombinante	44
2.2.15. Efeito da concentração de substrato sobre a atividade enzimática de	

lisozima D recombinante	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1. Aspártico-proteinase digestiva de <i>M. domestica</i>	46
3.1.1. Escolha de substratos e de condições para preparo do extrato bruto de aspártico-proteinase	46
3.1.2. Purificação da aspártico-proteinase intestinal de <i>M. domestica</i>	49
3.1.3. Clonagem da aspártico-proteinase digestiva de <i>M. domestica</i>	51
3.1.4. Aspártico-proteinase digestiva de <i>M. domestica</i> : considerações finais	55
3.2. A lisozima intestinal de <i>D. melanogaster</i> e salivar de <i>A. darlingi</i>	58
3.2.1. Expressão de clones de lisozimas em <i>E. coli</i>	58
3.2.2. Expressão de clones de lisozimas em <i>Pichia pastoris</i>	69
3.2.3. Purificação da lisozima intestinal recombinante de <i>D. melanogaster</i>	76
3. 2.4. Propriedades cinéticas da lisozima intestinal recombinante de <i>D. melanogaster</i>	82
3.2.5. Lisozimas de <i>D. melanogaster</i> e <i>A. darlingi</i> : considerações finais	84
4. RESUMO	89
5. ABSTRACT	92
6. REFERÊNCIAS	94
7. CURRICULUM VITAE	102

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Iniciais

Os insetos correspondem ao maior grupo animal conhecido, com cerca de 750.000 espécies, o que equivale a aproximadamente 75% das espécies animais descritas (Rupert & Barnes, 1996). Estes números impressionam ainda mais quando comparados com os de mamíferos, que correspondem à cerca de 4,5% do total de espécies conhecidas.

Os insetos estão adaptados para a ocupação dos mais diversos nichos ecológicos e também para a utilização das mais variadas fontes de alimento disponíveis na natureza. Assim, podem ser considerados não só o grupo de maior sucesso evolutivo na Terra, mas também importantes competidores do homem.

Os insetos contribuem para a atividade econômica através da polinização da maioria das angiospermas (plantas que produzem flores). Por outro lado, eles também são responsáveis por efeitos nocivos como a disseminação de doenças ou de pragas capazes de arruinar lavouras inteiras. Assim sendo, os insetos foram classificados como pragas pelo homem nas mais diversas áreas, tais como agricultura, armazenamento de alimentos, indústria de construção, saúde humana e animal.

Esta capacidade dos insetos de utilizarem uma enorme gama de materiais como fonte de alimento tem ampliado o interesse científico em relação à compreensão da digestão dos insetos. Tal compreensão constitui-se num pré-requisito para o desenvolvimento de novos métodos de combate, que sejam menos agressivos ao meio ambiente e ao próprio homem. Métodos que possam agir via canal alimentar, como por exemplo o uso de plantas transgênicas capazes de sintetizar compostos que, de alguma maneira, desorganizem, de alguma maneira, as funções digestivas de insetos fitófagos (Felton & Gatehouse, 1996).

Muitos trabalhos têm contribuído para o entendimento do sistema digestivo de insetos (Vonk & Western, 1984; Applebaum, 1985; Terra, 1988; Ribeiro *et al*, 1990; Terra & Ferreira, 1994) sob os mais diferentes aspectos. Estes trabalhos permitem o aprimoramento das técnicas de defesa contra os insetos existentes na medida em que identificam alvos do produto de novos genes capazes de conferir resistência às plantas transgênicas, por exemplo.

1.2. Aspectos gerais da digestão de insetos

De maneira geral, o tubo digestivo de insetos pode ser dividido em três regiões distintas: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. Os tamanhos destas regiões variam, de inseto para inseto.

Na figura 1 pode ser observada uma representação esquemática do tubo digestivo de um inseto genérico. Os intestinos anterior e posterior não são capazes de secretar enzimas digestivas nem de absorver os produtos da digestão.

O intestino médio consiste em um tubo simples (também denominado ventrículo), cujo epitélio é composto por vários tipos celulares (Terra *et al*, 1988, Ribeiro *et al*, 1990), e de onde podem partir ramificações denominadas cecos gástricos. Ao longo do ventrículo pode haver uma estrutura anatômica quitino-proteica, acelular, denominada membrana peritrófica. Esta separa dois compartimentos: o espaço endo-peritrófico, correspondente ao lúmen, onde se encontra o alimento, e o espaço ecto-peritrófico, correspondente ao espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio do intestino médio.

É no intestino médio que ocorre a maior parte da digestão, visto que é nesta região que ocorre a secreção de enzimas digestivas e a absorção dos nutrientes resultantes do processo digestivo.

A alimentação dos insetos é constituída em sua maior parte de polímeros, tais como amido, celulose e proteínas. O processo digestivo pode ser dividido em três fases: inicial, intermediária e final.

A primeira fase ocorre no espaço endo-peritrófico. A ação de amilases, celulasas e proteinases sobre os polímeros resulta em compostos menores, os quais podem se difundir para o espaço ecto-peritrófico, onde outras enzimas digestivas poderão hidrolisá-los em compostos ainda menores. Estes compostos serão por sua vez, na fase final da digestão, reduzidos a monômeros os quais serão absorvidos pelas microvilosidades das células do epitélio do ventrículo (Terra & Ferreira, 1994). É

Figura 1: Representação esquemática generalizada do intestino de insetos.

interessante salientar que a organização da digestão no tubo digestivo de insetos depende da compartimentalização das enzimas digestivas e dos fluxos de fluidos intestinais, os quais são responsáveis pela circulação de enzimas e pelo transporte dos produtos da digestão em suas diversas fases.

1.3. Digestão ácida nos Diptera superiores

Moscas (Diptera superiores) apresentam uma região ácida em seu intestino médio (Vonk & Western, 1984), sendo, portanto, os únicos animais, além de vertebrados a possuírem esta característica. Dessa forma, o estudo da digestão ácida em Diptera superiores permite examinar, em detalhe, este interessante paralelismo evolutivo, além das possíveis aplicações práticas.

É no intestino médio que ocorre a maior parte da digestão nestes animais. Este é composto do ventrículo (porção tubular) e dos cecos. O ventrículo pode ser dividido em três regiões morfológicas, as quais apresentam diferenças no pH luminal. Enquanto os ventrículos anterior e posterior são aproximadamente neutros, pHs 6,1 e 6,8, respectivamente; o ventrículo médio é muito ácido (pH cerca de 3,0). Na figura 2 pode ser observado uma representação esquemática do intestino de larvas de *M. domestica*, segundo Espinoza-Fuentes & Terra (1987).

Um estudo detalhado do processo digestivo em larvas de *Musca domestica* (Diptera, Cyclorrhapha) mostrou que estes animais estão bem adaptados para

Figura 2: Representação esquemática do intestino de larvas de *M. domestica* (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987).

digestão de bactérias, as quais constituem sabidamente o seu principal alimento (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987).

No ventrículo médio, as bactérias ingeridas com o alimento tornam-se susceptíveis à ação do pH ácido, de uma lisozima e de uma aspártico-proteinase semelhante à catepsina D aí presentes. O material extravasado das bactérias passa então para o ventrículo posterior, onde a digestão pode então se completar (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987).

Detalhes acerca da digestão nos Diptera superiores exigem maiores informações sobre esta lisozima atuante em pH ácido, bem como sobre a aspártico-proteinase semelhante à catepsina D. A presença destas enzimas no tubo digestivo de Diptera superiores apresenta interessante paralelismo com vertebrados, visto que ruminantes, por exemplo, digerem bactérias presentes no seu tubo digestivo através da ação de uma lisozima e uma aspártico-proteinase, a pepsina. Isto será discutido com mais detalhes adiante.

1.4. Lisozimas digestivas

A lisozima (EC 3.2.1.17) é parte do mecanismo de defesa contra bactérias e foi descrita na maioria dos animais (Jollès & Jollès, 1984), incluindo insetos (Hultmark, 1996). Ela catalisa a hidrólise da ligação 1,4- β -glicosídica entre o ácido *N*-acetilmurâmico e *N*-acetilglucosamina da peptideoglucona presente na parede celular de muitas bactérias, o que enfraquece a parede celular, podendo levar à lise

bacteriana. Algumas lisozimas também apresentam propriedade quitinásica, hidrolisando as ligações β -1,4 entre os resíduos de N-acetilglicosaminas da quitina (Jollès & Jollès, 1984).

A estrutura tridimensional da lisozima de clara de ovo de aves (HEW) foi elucidada por David Phillips em 1965. A estrutura por raio X mostra que esta enzima tem forma elipsoidal, com uma notável reentrância no sítio de ligação ao substrato, que atravessa uma face da molécula. A cadeia polipeptídica forma cinco segmentos helicoidais e uma folha β pregueada formada por três fitas antiparalelas que compõem uma das paredes do sítio ativo (Voet *et al.*, 2000).

A lisozima encontra-se entre as enzimas mais extensamente estudadas, apresentando uma ampla distribuição entre invertebrados e vertebrados (Jollès & Jollès, 1984). A sua atividade primordial, tanto em invertebrados como em vertebrados, é a participação no sistema imune contra bactérias. Este papel antibacteriano parece ser mediado através de sua ação bacteriolítica direta sobre estes microorganismos (Biggar & Sturgess, 1977) ou através de efeitos estimulatórios sobre a função fagocítica dos macrófagos, estando neste caso, associada a outros componentes ou anticorpos (Adinolfi, 1981).

Mais recentemente, a lisozima tem sido associada à digestão intestinal de bactérias em espécies que mantêm uma cultura destes microorganismos no trato digestivo, como por exemplo os ruminantes (Dobson *et al.*, 1984) e macacos ingestores de folhas (Stewart *et al.*, 1987), ou ainda por aqueles animais que ingerem grandes quantidades de bactérias, como por exemplo bivalves marinhos (McHenery *et al.*, 1979) e larvas de *M. domestica* (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987). O

desenvolvimento desta nova função das lisozimas foi acompanhado da ocorrência de alterações das características cinéticas e estruturais desta enzima, como veremos a seguir.

A partir de extratos ácidos aquecidos de ventrículos larvais de *M. domestica*, Lemos *et al* (1993) purificaram duas lisozimas até a homogeneidade. As lisozimas 1 e 2 apresentam massa molecular aparente de 22 kDa, determinado por ultracentrifugação em gradiente ou eletroforese em condições não desnaturantes, ou de 17 kDa, determinado por eletroforese em SDS-gradiente de poliacrilamida. Através de focalização isoeletrica, foram obtidos valores de pI para estas enzimas: pI de 7,9 para a lisozima 1 e pI de 8,2 para a lisozima 2.

As lisozimas 1 e 2 apresentam propriedades cinéticas idênticas, que incluem diminuição na atividade, deslocamento do pH ótimo para valores ácidos e aumento no Km à medida que a força iônica torna-se maior. Ambas são resistentes a uma enzima semelhante à catepsina D presente no ventrículo de *M. domestica* e apresentam uma atividade de quitinase seis vezes maior do que aquela da lisozima de galinha (Lemos *et al.*, 1993).

A capacidade dos insetos Cyclorrhapha em usar lisozima como enzima digestiva parece ter evoluído em paralelo à dos vertebrados. Assim, a lisozima está ausente na maioria dos tecidos, mas presente em grandes quantidades no estômago ácido dos ruminantes (Prieur, 1986) e no ventrículo médio de *M. domestica* (Lemos & Terra, 1991b). A lisozima ventricular de *M. domestica* é resistente a catepsina D ventricular (Lemos *et al*, 1993), enquanto a lisozima de ruminantes é resistente à

pepsina (Dobson *et al*, 1984). Ambas as enzimas são mais ativas em valores de pH ácidos quando presentes em meios com forças iônicas fisiológicas.

Uma comparação entre as seqüências das lisozimas envolvidas na digestão estomacal de bactérias em ruminantes e em macacos ingestores de folhas mostrou que essas lisozimas apresentam trocas de aminoácidos semelhantes quando comparadas à lisozima não digestiva ancestral de cada grupo (Stewart *et al*, 1987).

Regel *et al* (1998) purificaram uma lisozima digestiva de *Drosophila melanogaster* com propriedades similares às descritas para a de *M. domestica*: alta atividade de quitinase (muito maior do que a apresentada pela lisozima de galinha); valor de pI menor do que o da lisozima de muitos animais (Imoto *et al*, 1972); além de apresentarem maior atividade em valores de pH ácidos, quando presentes em meios com forças iônicas fisiológicas, como mencionado anteriormente. Tal lisozima parece ser um produto do gene Lys D (Kylsten *et al*, 1992; Daffre *et al*, 1994), a julgar pelo microseqüenciamento de peptídeo interno dessa enzima (Regel *et al*, 1998).

Aliando estes dados aos resultados do microseqüenciamento completo de uma das lisozimas digestivas de *M. domestica* (Ito *et al*, 1995), bem como ao alinhamento de seqüências de diversas lisozimas, Regel *et al* (1998) propuseram que a evolução de uma lisozima, para funcionar em meio ácido - tanto em vertebrados como insetos - implica na diminuição do número de aminoácidos básicos, bem como na presença de um resíduo de serina na posição 104.

A confirmação dessa hipótese exige o esclarecimento das propriedades das lisozimas salivares de Diptera superiores, que parecem não possuir (pelo menos em

D. melanogaster, cf Kyslsten *et al*, 1992; Daffre *et al*, 1994) uma serina na posição 104.

Rossignol & Lueders (1985) verificaram a presença de um fator bacteriolítico em glândulas salivares de *Aedes aegypti*, aparentemente associado a mecanismos de defesa deste inseto. Como a esterilidade das fontes de açúcar disponíveis na natureza é um tanto duvidosa, a presença de lisozima na saliva poderia proporcionar proteção contra bactérias presentes no alimento.

De modo semelhante, a lisozima detectada por Moreira-Ferro *et al*, (1998) em glândulas salivares de *Anopheles darlingi*, parece estar associada a mecanismos de defesa contra invasão de bactérias no trato bucal deste díptero. Esta lisozima é produto do gene Lysdar e o seqüenciamento desta enzima mostrou que ela também não possui uma serina na posição 104 e sim uma arginina (Regel *et al*, 1998).

Para a confirmação da hipótese formulada por Regel *et al*, (1998) faz-se necessário, também, maior conhecimento de seqüências completas de lisozimas digestivas de insetos. Deste modo poder-se-ia verificar se as trocas propostas para o funcionamento de lisozimas em pHs ácidos - de vertebrados e insetos - são observadas em relação às lisozimas digestivas de insetos, o que poderia revelar uma evolução paralela em nível molecular em filos distintos.

Numa tentativa de se estudar mais profundamente as propriedades das lisozimas digestivas de insetos, clones de lisozimas, gentilmente cedidos pela Prof^a Dr^a. Sirlei Daffre do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, foram submetidos à expressão em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*. Os clones

utilizados neste estudo foram o clone Lys D de lisozima intestinal de *D. melanogaster* e o clone Lysdar de glândulas salivares de *Anopheles darlingi*.

O clone Lysdar é expresso exclusivamente em glândulas salivares de adultos de *A. darlingi* (Moreira-Ferro *et al*, 1998). Este foi escolhido por ser um clone de lisozima de Díptera, cujo produto de expressão atua em pH aproximadamente neutro. A análise das suas propriedades possibilitaria a comparação com as propriedades de lisozimas intestinais e, conseqüentemente, forneceria informações que poderiam confirmar ou refutar a hipótese proposta por Regel *et al.* (1998).

O clone Lys D corresponde a um dos quatro grupos principais de lisozimas expressos em *D. melanogaster*. Todos os grupos de lisozimas de *D. melanogaster* são expressos em diferentes porções do trato digestivo, sendo Lys D expresso na porção anterior do ventrículo de larvas e adultos, o que sugere que seu produto é secretado para o lúmen intestinal, semelhantemente às demais enzimas digestivas. Este clone foi escolhido por se tratar de um modelo bem conhecido, visto que corresponde a lisozima intestinal de *D. melanogaster*, anteriormente purificada e caracterizada por Regel *et al.* (1998).

Os demais grupos de lisozimas de *D. melanogaster* correspondem a Lys P, expresso apenas nas glândulas salivares, principalmente de adultos, devendo contribuir para a digestão pré-entérica das bactérias, onde o alimento ingerido pode ser armazenado por um longo tempo (Kylsten *et al.*, 1992); Lys S, expresso na porção anterior do intestino médio, região correspondente ao epitélio do ceco gástrico e Lys X, expresso em porções do intestino médio onde não é verificada a expressão dos demais genes (Kylsten *et al.*, 1992; Daffre *et al*, 1994).

1.5. Aspártico-proteinase

Em geral, as aspártico-proteinases são ativas em meios ácidos hidrolisando ligações peptídicas internas em proteínas, embora algumas também sejam capazes de hidrolisar substratos sintéticos. Nas aspártico-proteinases, o nucleófilo que ataca a ligação peptídica é uma molécula de água ligada a resíduos de ácidos aspárticos (Dash *et al.*, 2001; Fruton, 1976; Oliveira, 2002)

As aspártico-proteinases são inibidas pelo pentapeptídeo pepstatina A (obtido de filtrados de culturas de *Streptomyces*) e por compostos diazoacetil-norleucina na presença de Cu^{2+} (Gildberg, 1988). Pepstatina A é um inibidor “tight binding” muito específico (Rich & Sun, 1980), utilizado para quantificar aspártico-proteinases por titulação (Knight & Barrett, 1976). A inativação por compostos diazoacetil-norleucina se deve a esterificação dos grupos carboxílicos dos resíduos Asp presentes no sítio ativo (Rajagapolan *et al.*, 1966). As aspártico-proteinases não são afetadas por inibidores de outras classes de proteínas. As aspártico-proteinases de origem animal melhor conhecidas são a pepsina (EC 3.4.23.1) (Fruton, 1976) e a catepsina D (Barrett, 1977).

A catepsina D é aspártico-proteinase lisossômica que participa de forma importante na hidrólise de proteínas no meio intracelular. Esta é normalmente estável em meios pouco alcalinos, apresenta atividade ótima entre 3,5 e 5,0 (Barrett, 1977). Sapolsky & Woessner (1972) verificaram a existência de várias isoformas de catepsina D no útero bovino. Estas isoformas apresentavam pesos moleculares que variavam de 13 a 42 kDa.

Até o final da década de 70, a presença de aspártico-proteinases em insetos era restrita a metamorfose (digestão de tecidos larvais). A partir de 1978, proteinases semelhantes a catepsinas (catepsina B e catepsina D) extraceculares participando do processo digestivo do sangue ingerido foram descritas (Houseman, 1978; Houseman & Downe, 1980; Terra *et al.*, 1988). A partir disto, muitos pesquisadores observaram a presença de cisteíno-proteinases semelhantes a catepsina B e aspártico-proteinases semelhantes a catepsina D em insetos. Por exemplo, Cho *et al.* (1990) purificaram uma catepsina D de *Aedes aegypti* de 40 kDa.

Pôde-se constatar ainda, utilizando a cadeia β da insulina como substrato, que a especificidade da aspártico-proteinase ácida é semelhante a da pepsina em relação à preferência por aminoácidos hidrofóbicos como doadores de NH e CO da ligação peptídica hidrolisada no sítio de clivagem (Barrett, 1977).

Como em outras aspártico-proteinases, a fenda de interação com o substrato pode, na catepsina D, acomodar até sete aminoácidos. A especificidade secundária da ligação do substrato tem sido estudada através da clivagem de proteínas (van Noort & Van der Drift, 1989), ou de substratos peptídicos sintéticos (Scarborough *et al.* 1993) e, mais recentemente, por mutagênese (Scarborough & Dunn, 1994). As clivagens de proteínas confirmaram estudos anteriores com a cadeia β da insulina, que mostraram que a catepsina D preferencialmente catalisa a hidrólise entre dois resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, além de mostrarem evidências de especificidade secundária, notando a preferência por aminoácidos hidrofóbicos na posição P₂ (van Noort & Van der Drift, 1989).

Foi proposto por Scarborough *et al* (1993 e 1994) e Gulnik *et al* (1997) um modelo para o subsítio S₂ de catepsina D humana, o qual é constituído por um bolsão hidrofóbico. Apenas uma mutação neste bolsão (Met²³⁸ para Glu ou Gln) levou a catepsina D a hidrolizar, de maneira eficiente, peptídeos contendo Arg ou Lys na posição P₂, indicando que S₂ é um subsítio crítico para o controle de especificidade desta enzima.

1.6. Aspártico-proteinase de larvas de *M. domestica*

A mais estudada aspártico-proteinase corresponde à pepsina, que é secretada no estômago de vertebrados, na forma de um precursor, o pepsinogênio. A pepsina é ativa em pHs ácidos e se desnatura em pH superior a 6,0 (Foltmann, 1981). A presença de uma aspártico-proteinase semelhante à pepsina em invertebrados, parece estar restrita às larvas de *M. domestica* (Applebaum, 1985).

As tentativas de Pendola & Greenberg (1975) em demonstrar que a aspártico-proteinase ventricular de *M. domestica* era uma pepsina verdadeira permaneceram inconclusivas. Por outro lado, Lemos & Terra (1991a) foram capazes de demonstrar, usando preparações semi-purificadas, que a aspártico-proteinase de *M. domestica* é na realidade semelhante à catepsina D.

A aspártico-proteinase de *M. domestica*, relativamente estável em meio alcalino, é inibida por ditiotreitol, reage lentamente com diazoacetil-norleucinanorleucina na presença de CuSO₄, hidrolisa hemoglobina melhor que

albumina e é virtualmente inativa frente a substratos sintéticos para pepsina (Lemos & Terra, 1991a). Esses resultados, juntamente com os valores de pH ótimo de ação, peso molecular e *pI* (Lemos & Terra, 1991a), estão de acordo com as propriedades de catepsina D (Barrett, 1977) e em contraste com as de pepsina (Fruton, 1976).

Estudos de seqüência sugerem que a pepsina evoluiu do mesmo gene arquetípico que a catepsina D em vertebrados (Takahashi & Tang, 1981). A digestão ácida extracelular de proteínas ocorre em vertebrados pela ação da catepsina D (por exemplo degradação tecidual de cartilagem, Barrett, 1977) ou por enzimas evoluídas a partir do mesmo gene ancestral, como a pepsina no estômago.

Acredita-se que uma tendência evolutiva similar tenha ocorrido nos Diptera superiores, que parecem usar enzima semelhante à catepsina D como enzima digestiva na zona ácida de seus ventrículos. Deve ser mencionado, entretanto, que a aspártico-proteinase semelhante à catepsina D ventricular de *M. domestica*, de forma similar à pepsina, não é ativada por ATP (Lemos & Terra, 1991a). A ativação por ATP da enzima semelhante à catepsina D é considerada como importante regulador fisiológico da proteólise em lisossomos (Pillai & Zull, 1985). Assim, a falta de ativação por ATP da catepsina D ventricular de *M. domestica* é consistente com o seu suposto papel extracelular, como é o caso de pepsina. Aspártico-proteinases semelhantes à catepsina D foram encontradas em várias famílias de percevejos, Hemiptera, (Terra & Ferreira, 1994). Infelizmente, nenhuma desta foi caracterizada até o momento.

Apesar dos avanços no estudo da aspártico-proteinase de *M. domestica*, três problemas importantes permanecem sem solução. Um refere-se à especificidade da enzima, que poderia ser inferida pelo estudo do padrão de ação desta enzima sobre

substratos protéicos. Outro problema é a sua estrutura primária (até o momento desconhecida), que permitiria avaliar a sua evolução e sua distância relativa das pepsinas e das catepsinas verdadeiras.

Finalmente, outro problema refere-se à sua origem celular; pois embora existam evidências (centrifugação diferencial de homogeneizados celulares) de que a enzima catepsina D-símile esteja no interior de vesículas nas células ventriculares (Lemos & Terra, 1991a), não é claro se estas são vesículas secretoras ou lisossomos. Cabe aqui ressaltar que catepsinas são geralmente enzimas lisossomais e não se pode descartar a possibilidade de que a aspártico-proteinase de *M. domestica* seja uma verdadeira catepsina D e que lisossomos as contendo estejam esvaziando seus conteúdos no lúmen ventricular.

Para resolver as questões quanto à especificidade da enzima, à sua estrutura primária, e à sua origem celular, faz-se necessário o desenvolvimento de uma marcha de purificação eficiente para a obtenção de aspártico-proteinase a partir de extratos brutos de intestinos médios de *M. domestica*. Em relação à origem celular desta aspártico-proteinase, também se faz necessária produção de anticorpos específicos contra esta enzima, os quais poderiam ser utilizados em estudos de imunocitocalização.

Além da utilização de substratos protéicos, o uso de substratos de fluorescência apagada desenvolvidos por Pimenta *et al.* (2002) para a catepsina D humana poderiam ser muito úteis no estudo detalhado da especificidade da aspártico-proteinase de *M. domestica*.

1.7. Objetivos deste projeto

- a) Purificação e caracterização da enzima semelhante à catepsina D de larvas de *M. domestica*.
- b) Expressão do clone da lisozima salivar (Lysdar) de *Anopheles darlingi*.
- c) Expressão dos clones de lisozima intestinal (Lys D) e de lisozima salivar (Lys P) de *Drosophila melanogaster*.
- d) Análise das propriedades das enzimas recombinantes a serem obtidas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Estudo da aspártico-proteinase intestinal de *Musca domestica*

2.1.1. Animais

A cultura de larvas de *Musca domestica* (Diptera, Cyclorrhapha, Muscidae) é mantida à temperatura de 24-26 °C em uma mistura fermentada de ração comercial para porcos e casca de arroz (2 : 5, v/v). Larvas de último estágio larval foram lavadas em água destilada, secas em papel filtro e imobilizadas em gelo para dissecação.

2.1.2. Preparação das amostras

As larvas de *M. domestica* foram dissecadas em solução de NaCl 150 mM gelada. O intestino médio de *M. domestica* foi dividido em duas partes, uma correspondendo aos ventrículos anterior e médio; a outra correspondendo ao ventrículo posterior.

A porção referente aos ventrículos anterior e médio foi homogeneizada em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 3,5, contendo 10 µM de pepstatina A e 5 mM de benzamidina, com um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem, centrifugada a 20000

x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi filtrado em lâ de vidro, sendo este filtrado utilizado como fonte de enzima (homogeneizado inicial). A porção referente aos ventrículos anterior e médio foi escolhida para preparo das amostras por representar as porções de maior concentração da enzima semelhante à catepsina D (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987).

2.1.3. Determinação de proteínas e de atividades enzimáticas

A determinação de proteínas foi realizada de acordo com Bradford (1976), com ácido bicinchonínico (Smith *et al*, 1985, modificado por Morton, 1992) e com nitrato de prata (Krystal *et al*, 1985), utilizando-se ovoalbumina como padrão em todos os casos.

Como a hemoglobina é melhor substrato do que a albumina para a enzima catepsina D-símile (Lemos & Terra, 1991a), esta foi utilizada. Assim, a hemoglobina foi desnaturada pela adição de HCl 0,06 N. A esta mistura foi acrescentado tampão citrato-fosfato 100 mM pH 3,5 de forma que a concentração de hemoglobina fosse de 2%. Os ensaios foram montados utilizando 20µl de amostra e 20µl da solução de hemoglobina referida. As misturas de reação foram incubadas em banho termostático (30°C) por diferentes períodos de tempo. Duas metodologias foram utilizadas para a detecção da atividade proteolítica ensaiada como descrito acima. Segue abaixo uma descrição de cada uma destas metodologias.

Precipitação por TCA: a reação foi interrompida pela adição de TCA 50%, o que levou à precipitação das proteínas não hidrolisadas, as quais foram separadas por centrifugação a 15000 x g por 5 min a 4 °C. Do sobrenadante, 200µl foram coletados e submetidos à reação de Folin-Lowry modificada (Barrett, 1977). A leitura do produto da reação foi realizada a 750 nm, onde uma unidade de enzima foi definida como a quantidade que causa mudança na absorbância de 1,0 unidade após 60 minutos.

Deteccção por fluorescamina: a reação foi interrompida pela adição de 200µL de tampão fosfato 50 mM pH 7.3. A cada tubo foram adicionados 100µL de solução de fluorescamina (0,03% em acetona). A fluorescamina é capaz de reagir com grupos amino dos resíduos N-terminal e ε-amino de aminoácidos de proteínas, conferindo fluorescência a estes produtos (Garesse *et al*, 1979). O volume de cada tubo foi acertado para 2 ml com água. A leitura foi feita em espectrofotômetro de fluorescência (excitação 375 nm; emissão 475 nm). Uma unidade de enzima correspondeu à quantidade capaz de elevar 100 unidades de emissão em 60 minutos.

Baseado no protocolo descrito por Twining (1984), foi preparado um segundo substrato com hemoglobina, agora marcado com FITC (fluoresceína isotiocianato). Segundo Twining (1984) proteínas marcadas com FITC podem ser utilizadas como substratos fluorescentes, sendo a leitura feita em espectrofotômetro de fluorescência (excitação 490 nm, emissão 525 nm). Para este substrato, uma unidade de enzima foi

definida como sendo a quantidade que causava mudança de 1,0 unidade na absorbância em 60 minutos.

2.1.4. Estabilidade ao congelamento

O homogeneizado intestinal inicial foi submetido a ensaio de aspártico-proteinase em quatro tempos antes e após congelamento e descongelamento e as atividades correspondentes calculadas. Este procedimento foi repetido cinco vezes e em triplicata e as atividades remanescentes foram calculadas em porcentagem em relação às atividades antes do congelamento.

2.1.5. Purificação da aspártico-proteinase intestinal de *Musca domestica*

Na tentativa de purificar a aspártico-proteinase intestinal de *Musca domestica*, várias técnicas cromatográficas foram testadas: troca iônica, interação hidrofóbica, filtração em gel, afinidade; utilizando tanto sistema de média pressão (sistema FPLC - Pharmacia) quanto de baixa pressão (EconoSystem - BioRad).

Todas as colunas utilizadas foram testadas mais de uma vez, variando-se as condições de eluição, visando encontrar combinações (coluna e condições de eluição) que se mostrassem mais eficazes na purificação da catepsina D de *M. domestica*.

As técnicas cromatográficas de filtração em gel e troca iônica utilizando sistema de média pressão (sistema FPLC - Pharmacia) apresentaram melhores resultados e foram combinadas para purificar a catepsina D de *Musca domestica*.

2.1.5.1 Cromatografia em coluna de troca iônica

Nesta técnica cromatográfica foi utilizada a coluna Resource Q, sistema de média pressão FPLC - Pharmacia. O método seguido consiste na lavagem daquela coluna com três diferentes tampões, a saber: tampão A, tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0; tampão B, tampão A contendo os inibidores de proteinases pepstatina A (10 μ M) e benzamidina (5 mM) e tampão C, tampão A contendo 1M NaCl.

Na coluna previamente equilibrada em tampão A, foram feitas 10 aplicações de homogeneizado inicial diluído 15 vezes neste mesmo tampão (2 ml em cada aplicação). A cada aplicação a coluna foi lavada com 5 ml de tampão A, sendo que após a última aplicação, iniciou-se a eluição. Esta consistiu em lavagem da coluna com 15 ml de tampão A, 15 ml de tampão B e 20 ml de tampão C, respectivamente. Esta cromatografia foi realizada com fluxo de 1ml/min e frações de 0,4 ml foram coletadas.

2.1.5.2. Filtração em gel

Esta cromatografia foi realizada em sistema FPLC – Pharmacia em coluna Superdex 75. Para isto, 500 μ l do reunido de frações oriundas da cromatografia de troca iônica foram aplicados na coluna previamente equilibrada com tampão Tris-HCl

30 mM pH 7,0 contendo 200 mM NaCl e 5 mM de benzamidina e 5 μ M de pepstatina A. A coluna foi lavada com 30 ml do tampão referido, com fluxo de 0,5 ml/min e frações de 0,4 ml foram coletadas.

2.1.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada segundo Laemmli (1970) a fim de averiguar o grau de purificação alcançado pelas diferentes técnicas testadas, em gel de poliacrilamida de 12% contendo 0.1% de SDS, utilizando-se o kit Mini-Protean II (BioRad). As amostras foram misturadas ao tampão de amostra contendo Tris 60 mM, pH 6,8, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5% (p/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v) e fervidas por 5 minutos. As amostras foram mantidas submetidas sob voltagem constante de 200 V. Após a eletroforese, o gel foi corado com prata segundo o método descrito por Blum *et al* (1987). Como marcadores de peso molecular foram utilizados: lisozima (14,4 kDa), SBTI (21,5 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), ovoalbumina (45 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa) e fosforilase b (97,4 kDa).

2.1.7. Preparação de material para seqüenciamento da porção N-terminal da proteinase purificada

A marcha de purificação da aspártico-proteinase intestinal foi repetida várias

vezes para a obtenção de quantidade suficiente desta para seqüenciamento de sua porção N-terminal.

A proteína purificada foi submetida à fervura por 5 min, sendo na seqüência dialisada contra água milliQ para a retirada, tanto do sal, quanto dos inibidores de proteinases presentes na amostra. Após a diálise, a amostra foi liofilizada, resolvida em SDS-PAGE e o gel resultante corado com Comassie Blue R por 30 - 60 min, seguido de descoloração até que a banda de proteinase purificada se tornasse visível e o "background" transparente.

A banda correspondente a aspártico-proteinase intestinal foi recortada do gel e transferida para um microtubo estéril. Por sua vez, este fragmento de gel foi submetido à liofilização por cerca de 3 horas.

Foi recortado um pequeno pedaço (cerca de 5 mm x 5mm) de membrana de PVDF, a qual foi umedecida em metanol. O fragmento de gel liofilizado foi ressuspenso em 50 µl de tampão Tris-HCl 200mM pH 8,5 contendo 2% SDS, tendo permanecido nesta solução por cerca de 20 minutos. Após isto, adicionou-se 200 µl de água milli Q.

A membrana de PVDF recortada foi transferida para este microtubo e metanol foi adicionado ao meio para a concentração final de 8-10%. Este material permaneceu a temperatura ambiente por aproximadamente 10 dias.

A transferência da proteína do gel para a membrana de PVDF ocorreu neste período; as mudanças de coloração do gel e da membrana indicavam esta transferência. Como a proteína presente no gel foi corada com comassie blue R, o fragmento de gel, com a aspártico-proteinase intestinal pura, apresentava coloração

azul. À medida em que a proteína era transferida do gel, a membrana de PVDF tomava-se azul e o gel, transparente.

A proteína purificada foi encaminhada, em membrana de PVDF, para a Universidade de Kentucky, onde o seqüenciamento foi realizado.

2.1.8. Extração de RNA de tecidos para confecção de biblioteca de cDNA

Larvas de *M. domestica* de último estágio larval foram retiradas do meio de cultura (vide item 2.1.1.), lavadas em água destilada, transferidas para camada de amido insolúvel 10%, e deixadas ali por 12 horas.

As larvas de *M. domestica* alimentaram-se do amido insolúvel presente no meio e as bactérias, presentes no tubo digestivo destes animais, foram removidas, visto que o amido de milho insolúvel ocupou seu lugar no intestino destes animais. Estas larvas foram, então, lavadas em água destilada estéril, imobilizadas em gelo e dissecadas em solução de NaCl 150 mM gelada preparada com água DEPC (conforme item 2.2.3.4).

A extração de RNA de intestino médio destas larvas de *M. domestica* foi feita com TRIZOL® Reagent da Life Technologies, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

O RNA total assim isolado foi encaminhado para Stratagene, USA, onde foi feito o isolamento do RNAm, o qual foi utilizado, pela própria empresa, na confecção da biblioteca de cDNA de intestino médio de *M. domestica* em fago Lambda ZAP® II.

2.2. Estudo das lisozimas

A Profa. Dra. Sirlei Daffre do Instituto de Ciências Biomédicas da USP cedeu-nos gentilmente clones de lisozimas de *Drosophila melanogaster* e de *Anopheles darlingi*. O clone LysD, que é fortemente expresso no intestinos médios de larvas e adultos de *D. melanogaster*, e o clone LysP, que é expresso em glândulas salivares de adultos deste inseto; e Lysdar, clone de lisozima de glândulas salivares de *A. darlingi*.

Para cada um destes genes foram desenhados "primers" específicos, tanto da porção N-terminal, quanto da porção C-terminal (ver item 2.2.4.). Estes "primers" foram utilizados na amplificação destes clones por reação em cadeia da polimerase (PCR).

A expressão destes clones foi feita utilizando dois organismos: a bactéria *Escherichia coli* e a levedura *Pichia pastoris*. As metodologias seguidas para a expressão de proteínas nestes organismos estão descritas adiante.

2.2.1. Expressão de lisozimas em *E. coli*

Para estes experimentos foram utilizadas bactérias *E. coli*, linhagem Origami™ B (DE3). Esta linhagem de bactérias possui mutações nos genes tio-redoxina redutase (*trxB*) e glutational redutase (*gor*), que juntos mediam a formação de pontes

dissulfeto em proteínas presentes no citoplasma. As células referidas também possuem genes de resistência aos antibióticos canamicina e tetraciclina.

2.2.1.1. Transformação de bactérias

Células competentes *E. coli* Origami™ B (DE3) foram misturadas aos vetores de expressão contendo os respectivos genes de interesse, sendo posteriormente mantidas em gelo por 30 min. Em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico de 42°C por 90 segundos, retornando ao gelo por mais 3 min. Neste ponto, foi adicionado 0,5 ml de meio NZY⁺ (para meios e soluções ver item 2.2.1.), sendo as células incubadas à 37°C por 1 hora, para recuperação e expressão do gene de resistência ao antibiótico presente no plasmídeo usado na transformação. Na sequência, as células foram plaqueadas em LB-ágar contendo ampicilina (50µg/ml) e mantidas à 37°C por 16 horas. As bactérias transformadas com plasmídeo cresceram nestas placas originando colônias.

2.2.1.2. Indução de bactérias utilizando IPTG

Para que genes inseridos em bactérias transformadas sejam expressos, faz-se necessário que o promotor a eles associados sejam induzidos. Para tanto, adiciona-se ao meio um indutor, o qual aciona a transcrição que é acompanhada pela síntese de proteínas. Esta indução por IPTG pode ser realizada, tanto em pequena, quanto em grande escala. A indução em pequena escala é conhecida por mini-indução, e a em grande escala, maxi-indução.

Na mini-indução, uma colônia isolada de bactéria Origami™ B (DE3) transformada foi transferida para um tubo contendo 2 ml de meio LB contendo carbenicilina (50 µg/ml). Este tubo foi incubado a 37°C, 250 rpm, em uma incubadora com agitação, por cerca de 4 horas, ou até o meio tornar-se turvo, para obtenção de células em grande número e ainda em fase de crescimento exponencial.

Desta cultura retirou-se uma alíquota (controle não induzido) para posterior análise por SDS-PAGE. Foi adicionado IPTG (concentração final 1mM) à cultura de bactérias, sendo estas incubadas a 37°C, 250 rpm, por 3 horas, incubadora com agitação. Após indução, retirou-se uma nova alíquota da cultura (induzida por IPTG) para análise por SDS-PAGE.

Nos casos em que houve expressão diferencial da proteína, as bactérias foram submetidas à maxi-indução.

De modo semelhante ao que foi feito na mini-indução, uma colônia isolada de bactéria transformada foi incubada à 37°C, sob agitação de 250 rpm em 2 ml de meio LB contendo carbenicilina (50 µg/ml), por cerca de 4 horas, ou até o meio tornar-se turvo. As células que cresceram em 2 ml foram centrifugadas a 2000 x g, por 10 minutos, para a retirada do sobrenadante (meio de cultura contendo resíduos metabólicos das bactérias).

Em um erlenmeyer de 2L foram colocados 500 ml de meio LB contendo carbenicilina (50 µg/ml). As células (sedimento da centrifugação), ressuspensas em meio LB novo, foram transferidas para o erlenmeyer e, novamente, incubadas a 37°C, sob agitação de 250 rpm. Alíquotas foram retiradas periodicamente, de 30 em 30 minutos, para leitura de absorbância. Esta leitura foi realizada à 600nm contra branco

(meio LB). A leitura da absorbância entre 0,6 e 1,0 indica que a densidade de bactérias no meio está adequada para realização da maxi-indução.

IPTG foi adicionado ao erlenmeyer (concentração final 1mM), sendo este incubado por 3 horas, sob agitação (250 rpm), a 25°C ou a 37°C. Aliquotas foram retiradas antes da adição de IPTG e após o período de indução para análise por SDS-PAGE.

O conteúdo restante do erlenmeyer, contendo as células induzidas por IPTG, foi centrifugado a 7000 x g, por 20 minutos. O sedimento desta centrifugação, correspondente às células bacterianas transformadas e induzidas, foi transferida para um tubo de 50 ml e acondicionado em freezer - 80°C, para posterior lise das células.

2.2.1.3. Lise de células

Bactérias oriundas da maxi-indução foram ressuspensas em 30ml de tampão citrato-fosfato 50mM pH 3,5, contendo NaCl 0,15M e 0,001% Triton X-100, e aliquotadas em 6 tubos (5 ml por tubo).

Para a realização da lise com sonicador, um dos tubos, contendo as bactérias advindas da maxi-indução, foi submetido a 5 ciclos de congelamento-descongelamento. O congelamento foi realizado por imersão em banho de gelo seco e etanol e o descongelamento, por imersão em banho-maria termostatizado a 30°C. Em seguida, este tubo foi submetido a 5 ciclos no sonicador (Branson Sonifier 250), a saber: 30 segundos “sonicando” (output 4,0), seguidos de 60 segundos à 4°C, em repouso.

O sonicado foi centrifugado a 7000 x g, por 20 minutos à 4°C, sendo o sobrenadante desta centrifugação chamada de lisado solúvel, e o sedimento de lisado insolúvel. Aliquotas de cada uma destas frações foram coletadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes.

Para a lise com pérolas de vidro (figura 3), cerca de 1g de células induzidas foram ressuspensas em 4ml de tampão citrato-fosfato 20mM pH 6,0, contendo NaCl 50mM. A esta solução adicionou-se 8ml de pérolas de vidro, sendo esta mistura submetida a 4 ciclos de agitação e repouso em gelo. Os ciclos consistiram em 1min sob agitação, em um agitador de tubos, e 1 min em repouso em gelo.

Após esses quatro ciclos, o tubo foi deixado em repouso para a decantação das pérolas de vidro. Com o auxílio de um micropipetador, o sobrenadante foi recolhido e transferido para um tubo novo, sendo este líquido denominado lisado. O material decantado foi novamente ressuspenso em 4 ml de tampão citrato-fosfato 20mM pH 6,0, contendo NaCl 50mM, e submetido a todo o processo novamente. Isto foi repetido por 7x, para garantir que todas as células tenham sido lisadas.

O lisado resultante foi submetido à centrifugação a 7000 x g por 30 min, à 4°C. Do sobrenadante e do sedimento (após ressuspensão em 1ml de tampão citrato-fosfato 20mM pH 6,0, contendo NaCl 50mM) desta centrifugação; chamados de lisado solúvel e lisado insolúvel, respectivamente; foram retiradas alíquotas para análise por SDS-PAGE.

Figura 3: Representação esquemática do protocolo de lise de bactérias utilizando pérolas de vidro (item 2.2.1.3)

2.2.1.4. Solubilização de proteínas de corpos de inclusão

O lisado insolúvel, correspondente aos corpos de inclusão, foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 e alíquotas deste foram incubadas com solução desnaturante (1:9, v/v) por diferentes intervalos de tempo (1h, 4h, 8h, 16h). Foram testados dois agentes desnaturantes: uréia 8M e SDS 3%, sendo as soluções preparadas em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0.

Após o período de incubação, estas amostras foram centrifugadas a 10500 x g por 10min à temperatura ambiente. Os sobrenadantes oriundos desta centrifugação foram submetidos à diálise em passos para a retirada do agente desnaturante. Na diálise em passos, as amostras foram dialisadas contra tampões contendo concentrações sucessivamente menores do respectivo agente desnaturante, sendo que a última diálise foi feita contra tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0. Alíquotas destas amostras dialisadas foram submetidas à análise por SDS-PAGE.

2.2.2. Expressão de lisozimas em *P.pastoris*

P. pastoris GS115 (*his4*) foi utilizada para expressão dos genes de lisozima de *D. melanogaster* (LysD) e *A. darlingi* (Lysdar), porque a cadeia polipeptídica expressa pode ser secretada para o meio extracelular. Além do mais, os níveis de expressão neste organismo são geralmente muito maiores do que expressão em *E. coli*.

O plasmídeo utilizado como vetor para transformação em *P. pastoris* foi o pPIC9Kf1. Este plasmídeo possui o promotor da álcool-oxidase induzida por metanol (AOX1) e o gene *HIS4*, que confere ao organismo que o carrega a habilidade de

sobreviver na ausência do aminoácido histidina.

2.2.2.1 Transformação de *Pichia pastoris*

Pichia pastoris foi cultivada em meio YPD (item 2.2.3.9.) até $A_{600} = 1,3 - 1,5$. As células foram então lavadas duas vezes em água milliQ gelada e uma vez com sorbitol 1M gelado e ressuspensas em sorbitol 1M gelado. Os vetores linearizados contendo os respectivos insertos de lisozimas foram reunidos às células-alvo em cubeta de eletroporação 0,2 cm a 1,5 kV, 25 μ F, 200 Ω , usando um gene Pulser da BioRad. Sorbitol gelado (1ml de solução 1M) foi adicionado a cubeta imediatamente após a “pulsção”, e as células transformadas foram transferidas para placas MD (item 2.2.3.6.) e incubadas a 30°C até o aparecimento de colônias (cerca de 2 dias).

2.2.2.2. Indução de *Pichia pastoris* transformadas

Colônias de *P. pastoris* transformadas foram coletadas ao acaso e submetidas a PCR conforme descrito no item 2.2.6. As colônias que originaram produtos de PCR de tamanho esperado foram cultivadas sob agitação (150 rpm) a 30°C em 5 ml de meio YPD, para indução. Quando estas células atingiram $A_{600}=1,0$, as preparações foram centrifugadas a 5000 x g a 4°C, por 20 min. O meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas duas vezes em água milli Q estéril.

As células recuperadas foram cultivadas sob agitação (150 rpm) em meio MM (item 2.2.3.7.), a 30°C por 72 horas, para indução. A cada 12 horas, foram acrescentados à cultura de células, 100 μ l de metanol para garantir a indução. Decorridas 72 horas, as células foram centrifugadas a 5000 x g e 4°C, por 20 min,

para a separação das células do meio MM. Como as cadeias polipeptídicas expressas podem ser secretadas para o meio extracelular neste organismo, o meio MM deve conter a enzima de interesse. Assim sendo, foi retirada uma alíquota do sobrenadante obtido (meio MM) para ensaio de atividade.

2.2.3. Meios e soluções utilizados

2.2.3.1. meio LB

Meio de cultura LB líquido. 1 litro de água milli Q, 10 g de NaCl, 10 g de Bactotryptona e 5 g de extrato de levedura.

2.2.3.2. Placas de LB-ágar

1 litro de LB líquido acrescido de 20 g de bactoágar. Derramar a mistura ainda líquida em placas de Petri (100 mm ou 150 mm). Foram preparadas placas contendo ampicilina (50 µg/ml), adicionado ao LB-ágar antes que este se solidificasse.

2.2.3.3. Tampão TAE 50x

Tampão Tris–Acetato 40 mM pH 8,5, contendo EDTA 2 mM.

2.2.3.4. H₂O-DEPC

200 µl de dietilpirocarbonato (DEPC) para 100 ml de H₂O.

2.2.3.5. meio NZY⁺

5 g de NaCl, 2 g de MgSO₄, 5 g de extrato de levedura e 10g de NZ-amina em 1 litro de água; ajustar o pH para 7,5 com NaOH e autoclavar. Adicionar 12,5 ml de MgCl₂ 1M, 12,5 ml de MgSO₄ 1M e 10 ml de glicose 2M. Todas as soluções foram previamente esterilizadas por filtração.

2.2.3.6. placa MD

Placas de meio mínimo dextrosa, contendo YNB 1,34%, biotina 4x10⁻⁵%, dextrosa 1%, ágar 1,5%, em tampão fosfato 60 mM pH 6,0.

2.2.3.7. meio MM

Meio mínimo metanol, contendo YNB 1,34%, biotina 4x10⁻⁵ %, metanol 2%, em tampão fosfato 60 mM pH 6,0.

2.2.3.8. placa ML-ágar

Placas de *Micrococcus lysodeikticus*. Contém: ágar 1,5%, *M. lysodeikticus* (1mg/ml) em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 3,5, contendo NaCl 150 mM.

2.2.3.9. meio YPD

Meio de cultura líquido contendo extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%, em tampão citrato-fosfato 100 mM pH 6,0.

2.2.4. "Primers" desenhados para amplificação dos genes estudados

Foram desenhados "primers" para as extremidades 5' e 3' dos insertos estudados, contendo sítios para as enzimas de restrição: Nde I, Xba I, Hind III e Pst I.

Seguem abaixo as seqüências dos "primers" utilizados para a expressão de cada um dos clones em *E. coli*. Os trechos em destaque correspondem aos sítios de restrição, estando indicadas ainda, as enzimas de restrição correspondentes.

LysP

5' GGGAATTCCATATGCGAACGATGGATAGGTGTTCC 3'

Nde I

5' CTAGTCTAGACTAGAAGCAACTGTTGATCGA 3'

Xba I

LysD

5' GGGAATTCCATATGCGCACCATGGACCGTTGCTCC 3'

Nde I

5' CCCAAGCTTTTAAAAGCAGTCATCGATGGA 3'

Hind III

Lysdar

5' GGGAATTCCATATGAAGACGTTTGGCAAGTGTGA 3'

Nde I

5' ATGCACTGCAGTTAGAGGCACTCGGTCACACT 3'

Pst I

A seguir, encontram-se descritas as seqüências dos “primers” utilizados para a expressão dos clones de lisozimas em *P. pastoris*. Novamente, os destaques correspondem aos sítios de restrição, estando abaixo indicadas as enzimas de restrição correspondentes. A seqüência do peptídeo sinal do fator α presente no vetor pPIC9 está sublinhada. Para que o “frame” de leitura seja adequado, esta seqüência deve ser mantida.

LysD

5' CCGCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTCGCACCATGGACCGTTGCTCC 3'

Xho I

5' TTAGCCTAGGTTAAAAGCAGTCATCGATGGA 3'

Avr II

Lysdar

5' CCGCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTAAGACGTTTGGCAAGTGTGA 3'

Xho I

5' TTAGCCTAGGTTAGAGGCACTCGGTCACACT 3'

Avr II

2.2.5. Reação em cadeia com DNA polimerase em termociclador (PCR)

Os PCRs foram realizados 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), $MgCl_2$ 1,5 mM e dNTP 0,2 mM. Os “primers” foram usados em uma concentração final de 1,5 μ M e amplificação foi feita com 5 U de Taq DNA Polimerase (Life Technologies) Em geral utilizou-se cerca de 0,2 μ g de DNA molde e as reações foram feitas em um termociclador Robocycler Stratagene.

Cada procedimento envolvendo PCR era composto por 17 ciclos, sendo que as condições de cada ciclo de PCR foram: desnaturação por 1 min a 94°C, alongamento por 1 min a 72°C e o passo de pareamento, que também era de 1 min, em uma temperatura escolhida de acordo com os “primers” usados.

2.2.6. PCR de material de colônias de *P. pastoris*

A reação em cadeia com DNA polimerase, a partir de colônias de *Pichia pastoris*, foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Higgins & Cregg, (1998), utilizando os “primers” adequados (ver item 2.2.4.).

Com o auxílio de um palito estéril, umedecido em água milli Q, colônias de *P. pastoris* transformadas foram transferidas para um microtubo contendo 20 μ l de SDS

0,1% e aquecidas a 95°C por 5 minutos. Este procedimento visava o rompimento da parede celular e a liberação do DNA cromossomal.

Após isto, as amostras foram centrifugadas a 10500 x g por 1 minuto a temperatura ambiente, sendo que 2 µl do sobrenadante desta centrifugação foram transferidos para um microtubo estéril para realização de reação de PCR como descrito no item 2.2.5.

2.2.7. Extração de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose

Fragmentos de DNA derivados de digestão enzimática de plasmídeos ou amplificados com PCR foram recuperados diretamente dos géis de agarose usando um protocolo de extração denominado QIAEX II ® (Qiagen), o qual baseia-se na dissolução de agarose em um tampão de alta força iônica e ligação do DNA em uma resina de troca iônica. Os detalhes estão descritos pelo fornecedor.

2.2.8. Eletroforese em gel de agarose

Os géis foram preparados com a concentração final de agarose de 1% (p/v) em tampão TAE 1x e as amostras de DNA eram resolvidas em tampão TAE 1x a cerca de 100 V.

Nas amostras foi adicionado um tampão de amostra (0,1 volumes da amostra) contendo azul de bromofenol 0,025% e xileno cianol 0,025%. Esses marcadores coloridos foram usados para monitorar a movimentação da amostra e determinar o encerramento da eletroforese. Após isso, o DNA foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e visualizado em transiluminador de luz UV (312 nm).

2.2.9. Purificação de plasmídeos a partir de uma cultura de bactérias

Os plasmídeos foram preparados a partir de 5 ml de culturas de bactérias utilizando-se o protocolo Wizard Miniprep (Promega). Resumidamente, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação e ressuspensas em um tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo EDTA 10 mM e RNase A 100 µg/ml. Em seguida, realizou-se uma lise alcalina utilizando uma solução de NaOH 0,2M e SDS 1% (p/v). A solução foi neutralizada com acetato de potássio 1,32 M pH 4,8. Essa mistura foi, então, centrifugada a 10000 x g por 5 min, sendo o sobrenadante aplicado em uma mini-coluna contendo uma resina de troca iônica produzida pela Promega.

A coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 8,3 mM pH 7,5, contendo acetato de potássio 80 mM, EDTA 40 mM e etanol 55% (v/v) para retirada do material não ligado (provavelmente RNA e fragmentos de DNA genômico). A coluna foi eluída com água milliQ para retirada dos plasmídeos ligados, estando o material pronto para digestão enzimática e/ou seqüenciamento. Rendimento e pureza da amostra de plasmídeos foram avaliados através de determinação da absorbância a 260 nm e 280 nm.

2.2.10. Digestão utilizando enzimas de restrição

As amostras contendo plasmídeos (de 1 a 2 μg de DNA) foram digeridas com enzimas de restrição, com atividade e tampões indicados pelo fabricante, a 37°C por 2 horas. A reação foi interrompida com fervura durante 3 min e os produtos foram então resolvidos em gel de agarose 1%. As enzimas utilizadas neste projeto foram adquiridas junto a New England Biolab ou Promega.

2.2.11. Reação de ligação entre fragmentos de DNA e plasmídeos vetores

Para clonagem de fragmentos de DNA nos vetores pT7-7 e pPIC9, a reação de ligação foi realizada em um banho-maria (temperatura inicial: 10° C e temperatura final: 25° C) por um período de 16 horas. Em cada reação empregou-se cerca de 1 μg do plasmídeo e do fragmento de DNA a ser clonado. Nas reações de ligação usou-se T4 DNA ligase (New England BioLabs inc.).

2.2.12. Detecção de atividade de lisozima

A detecção de atividade de lisozima foi feita tanto em meio líquido quanto em placa, sendo o ensaio em placa uma adaptação do ensaio em meio líquido.

Para ensaio em meio líquido, usou-se uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (1mg/ml) em tampão. Nos ensaios de atividade de lisozima digestiva de *D. melanogaster*, citrato-fosfato 50 mM pH 3,5, contendo 150 mM de NaCl, foi utilizado como tampão. Para ensaio de lisozima salivar de *A. darlingi* foi utilizado tampão citrato-fosfato 50 mM pH 6,0, contendo 50 mM de NaCl.

Em cada tubo de ensaio foram colocados 250 µl de solução de enzima e 250 µl de suspensão de *M. lysodeikticus*. A reação foi incubada a 30°C pelo tempo estipulado e interrompida pela adição de 250 µl de carbonato de sódio 0,5M. Uma unidade de lisozima corresponde à quantidade de enzima que causa uma variação de 0,01 de absorbância por minuto, a 650nm.

Foram preparadas placas ML-ágar, como descrito no item 2.2.3.8. Com o auxílio de uma micropipeta, foram feitos pequenos poços, nos quais foram adicionados 10µl de amostra. A placa foi incubada a 30°C até o surgimento de um halo transparente ao redor dos poços. Este halo era indicativo da atividade de lisozima. A reação foi interrompida pela adição de 1ml de carbonato de sódio 0,5M à placa.

Foi utilizado como controle positivo solução de lisozima de galinha (Sigma) a concentração de 0,2 mg/ml. Como controle negativo foi utilizado tampão de ensaio.

2.2.13. Purificação de lisozima D recombinante

O meio MM após a indução da *P. pastoris* foi utilizado como fonte de lisozima D recombinante, visto que, como já mencionado, as cadeias polipeptídicas expressas

em *P. pastoris* podem ser secretadas para o meio extracelular deste organismo.

Amostras de 500µl foram aplicadas em uma coluna de filtração em gel Superose 12, sistema FPLC - Pharmacia, equilibrada e eluída com tampão Imidazol 20mM pH 6,4. O material eluído com um fluxo de 0,5 ml/min, foi coletado em frações de 0,4 ml. As frações com atividade foram reunidas e submetidas a SDS-PAGE.

2.2.14. Efeito do pH e da força iônica sobre a atividade enzimática de lisozima D recombinante

O efeito do pH do meio de reação sobre a atividade de lisozima D recombinante de *D. melanogaster*, purificada a partir do meio de indução, foi determinado usando-se os seguintes tampões (Miller & Golder, 1950): glicina-HCl (pH 2,0 - 3,5), acetato de sódio (pH 4,0 - 5,5), fosfato de sódio (pH 6,0 - 7,5) e Tris-HCl (pH 8,0) preparados com forças iônicas de 0,02 e 0,2.

O pH foi medido numa mistura contendo substrato e tampão nas condições de concentração e temperatura utilizadas para cada ensaio. Este cuidado deve ser tomado uma vez que a temperatura pode alterar a ionização de certos grupos e provocar uma mudança no pH do meio de reação.

2.2.15. Efeito da concentração de substrato sobre a atividade enzimática de lisozima D recombinante

Para a determinação do efeito da concentração de *M. lysodeikticus* sobre a

atividade da lisozima intestinal recombinante pura de *D. melanogaster* foi utilizado tampão 50mM acetato de sódio, pH 4,3, de diferentes forças iônicas (de 0,02 a 0,2). Foram utilizadas dez concentrações de substrato que variaram de 0,2 a 2,0 mg/ml. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados através de regressão linear ponderada, usando-se o programa Enzfitter (Leatherbarrow, R.J., Elsevier – Biosoft, 1987).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Aspártico-proteinase digestiva de *M. domestica*

3.1.1. Escolha de substratos e de condições para preparo do extrato bruto de aspártico-proteinase

Para determinação da atividade de aspártico-proteinase de larvas de *M. domestica* foi utilizada a fração solúvel do homogeneizado dos ventrículos anterior e posterior de larvas de *M. domestica* (36 animais/ml), preparados como descrito no item 2.1.2. A atividade de aspártico-proteinase foi testada sobre diferentes substratos para verificar qual deles seria mais sensível. Na tabela 1, seguem os valores de atividade obtidos.

Substrato	Atividade (U/ml)	Atividade (U/animal)
Hb (TCA)	14,1	0,4
Hb - FITC	7220	206
Hb (fluorescamina)	89000	2550

Tabela 1: Atividade da aspártico-proteinase de homogeneizados de ventrículos anterior e médio de larvas de *M. domestica* detectada sobre substratos diversos. Hb (TCA) corresponde à reação com hemoglobina desnaturada 2% precipitada com TCA 50%; Hb-FITC corresponde à hemoglobina marcada com FITC; e, finalmente, Hb (fluorescamina) corresponde à reação com hemoglobina desnaturada 2% avaliada após adição de solução de fluorescamina 0,03%. Em todos os ensaios realizados, além dos quatro tempos de ensaio, foi determinado um tempo zero para cada reação.

Nesta tabela, podem ser observados os valores de atividade calculados para a aspártico-proteinase intestinal de *M. domestica*. A atividade calculada para o substrato Hb (Fluorescamina) é consideravelmente maior do que aqueles calculados para os substratos Hb – FITC, cerca de 500x e Hb (TCA), cerca de 6000x. Assim, hemoglobina associada à metodologia de detecção por fluorescamina foi utilizada como substrato para medir atividade desta enzima durante os passos cromatográficos.

A atividade deste material foi testada frente a substratos para outras classes de proteases, neste mesmo pH, entretanto nenhuma atividade foi obtida (dado não mostrado). Isto é uma garantia de que os valores apresentados na tabela 1 correspondem à atividade da aspártico-proteinase intestinal de *M. domestica*.

A presença de pepstatina A no tampão de homogeneização visou à diminuição das perdas de atividade devido a efeitos da atividade proteolítica da aspártico-proteinase intestinal de *M. domestica* (autólise). Analogamente, a presença de benzamidina visou a diminuição das perdas de atividade por ação da tripsina, uma importante proteinase digestiva deste inseto, presente durante os passos cromatográficos. Estes foram realizados em pH 7,0, no qual aquela proteinase é ativa.

Na tabela 2, pode-se observar as atividades remanescentes nos homogeneizados após os ciclos de congelamento-descongelamento. Pode-se afirmar que o homogeneizado ventricular de *M. domestica* perde cerca de 35 % de seu poder catalítico inicial após cinco ciclos de congelamento/descongelamento.

ciclo congelamento-descongelamento	atividade perdida
primeiro	13,5 %
segundo	6,75 %
terceiro	32,5 %
quarto	33,7 %
quinto	34,8 %

Tabela 2: Atividade de aspártico-proteinase intestinal de *M. domestica* obtidas após ciclos de congelamento e descongelamento. Os ensaios de quatro tempos foram feitos sobre hemoglobina-FITC.

O uso de tampão pH 3,5 na homogeneização dos ventrículos possibilitou a precipitação de diversas proteínas, o que aumentou em até 5,5x a atividade específica, quando comparado com o mesmo material homogeneizado em água bidestilada, como pode ser observado na tabela 3.

Meio de homogeneização	atividade específica
água bidestilada	19200 U/mg
tampão citrato-fosfato 20mM pH 3,5	106000 U/mg

Tabela 3: Atividade específica de aspártico-proteinase de *M. domestica* em homogeneizados intestinais preparados em água bidestilada e em tampão citrato-fosfato 20mM pH 3,5. A atividade específica é aumentada 5,5 vezes quando o homegeneizado é feito em tampão citrato-fosfato 20mM pH 3,5.

3.1.2. Purificação da aspártico-proteinase intestinal de *Musca domestica*

Para evitar grandes perdas na atividade enzimática da aspártico-proteinase intestinal de *M. domestica*, os homogeneizados foram preparados nos mesmos dias em que as cromatografias referentes ao primeiro passo da marcha de purificação foram realizadas. A mistura de frações ativas foi guardada a 4 °C, quando não foi possível a realização imediata das cromatografias referentes ao segundo passo da marcha de purificação.

Hemoglobina desnaturada 2% foi utilizada como substrato em todas as cromatografias testadas e a atividade de hidrólise avaliada pelo método de fluorescamina. Seguem abaixo os resultados obtidos para as cromatografias que se mostraram como a melhor combinação de passos para a purificação da aspártico-proteinase de larvas de *M. domestica*.

Na figura 4, pode-se verificar o perfil de atividade obtido com a coluna Resource Q (Pharmacia), na qual a enzima de interesse foi eluída com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,0, contendo pepstatina A 10 µM e benzamidina 5mM. Pode-se notar um único pico de atividade. As frações correspondentes à atividade proteolítica foram reunidas e submetidas à filtração em gel em coluna Superdex 75 (sistema FPLC – Pharmacia), resultando em um único pico de atividade também. O perfil de eluição do componente ativo pode ser observado na figura 5. Os valores de recuperação obtidos

Figura 4: Perfil de eluição de atividade da aspártico-proteinase intestinal de *M. domestica* em cromatografia de troca iônica com coluna Resource Q, Pharmacia, sistema FPLC. Condições de eluição: lavagem com 15 ml de tampão trietanolamina 20 mM pH 7,0, seguida de lavagem com 15 ml deste mesmo tampão acrescido de pepstatina 10 μ M e benzamidina 5mM; posteriormente a coluna foi lavada com 20 ml de tampão trietanolamina 20 mM pH7,0 contendo 1M NaCl. Fluxo de 1,0 ml por minuto, frações de 0,4 ml foram coletadas.

Figura 5: Perfil de eluição das frações com atividade de aspártico-proteinase intestinal (figura 4) em filtração em gel com coluna Superdex 75, Pharmacia, sistema FPLC. Condições de eluição: lavagem da coluna com 30 ml de tampão Tris-HCl 20 mM pH7,0, contendo 200mM de NaCl, pepstatina 5 μ M e benzamidina 5mM. Fluxo de 0,5 ml por minuto, frações de 0,4 ml foram coletadas.

para as cromatografias foram de cerca de 14% na cromatografia com coluna Resource Q, e cerca de 64% na cromatografia com coluna Superdex 75.

A figura 6 consiste numa representação esquemática da marcha de purificação para aspártico-proteinase intestinal de larvas de *M. domestica*.

Aliquotas de amostras correspondentes aos diferentes passos de purificação da aspártico-proteinase de *M. domestica* foram submetidas à análise em SDS-PAGE, conforme pode ser observado na figura 7. Esta análise revela que esta marcha de purificação permite o isolamento de uma banda de proteína de cerca de 30 kDa.

As frações oriundas da cromatografia em coluna Superdex 75 submetidas a SDS-PAGE revelaram que, à medida que a atividade proteolítica aumenta em cada fração, há o aumento da intensidade da banda de proteína de 30 kDa. Como pode ser observado na figura 8, a fração 38, que contém a banda de proteína mais intensa (e portanto com maior quantidade de amostra), também corresponde àquela de maior atividade proteolítica. Isto demonstra que a proteína purificada utilizando esta marcha corresponde a aspártico-proteinase intestinal de larvas de *M. domestica*.

3.1.3. Clonagem da aspártico-proteinase digestiva de *M. domestica*

A estratégia para clonar a aspártico-proteinase digestiva de *M. domestica* envolvia a obtenção da sequência N-terminal da enzima e o uso dessa sequência para sintetizar sondas adequadas. Essas seriam usadas para varrer uma biblioteca de cDNA de ventrículo de larvas de *M. domestica*.

Ventrículos anterior e médio de *M. domestica* homogeneizados em tampão citrato-fosfato 50 mM pH3,5

Figura 6: Representação esquemática da marcha de purificação da aspártico-proteinase digestiva de larvas de *Musca domestica*.

Figura 7: SDS-PAGE de amostras obtidas durante a marcha de purificação de aspártico-proteinase intestinal de *Musca domestica*. Raia 1: homogeneizado inicial; Raia 2: reunido das frações ativas da cromatografia com coluna Resource Q; Raia 3: reunido das frações ativas da cromatografia com coluna Superdex 75; Raia 4: padrões de peso molecular. Os pesos moleculares estão indicados à direita do gel. A seta vermelha indica a enzima purificada nesta marcha.

Figura 8: Comparação entre atividade e migração em SDS-PAGE de amostras obtidas após a cromatografia de aspártico-proteinase de *M. domestica* em Superdex 75. PM: padrões de peso molecular; demais raiais: frações de 34 a 41. Os pesos moleculares estão indicados à esquerda do gel.

Com este objetivo, a marcha de purificação de aspártico-proteinase intestinal foi repetida várias vezes para a obtenção de quantidade suficiente de catepsina D pura (cerca de 10 μ g) para seqüenciamento de sua porção N-terminal. A proteína purificada foi transferida para uma membrana de PVDF (item 2.1.8.), sendo encaminhada para Universidade de Kentucky, onde o seqüenciamento seria realizado, mas, infelizmente, nenhuma seqüência desta região pode ser obtida.

Ainda dentro do objetivo referido, uma biblioteca de cDNA de intestino médio de larvas de *M. domestica* foi confeccionada na Stratagene (USA), como já mencionado, utilizando RNA extraído como descrito em 2.1.7. Esta biblioteca foi confeccionada em fago Lambda ZAP® II e não foi utilizada neste estudo devido ao atraso ocorrido na sua entrega. Ela deverá ser usada no futuro para clonar a aspártico-proteinase ventricular.

3.1.4. Aspártico-proteinase digestiva de *M. domestica*: comentários finais

A detecção da hidrólise de hemoglobina por aspártico-proteinase é facilitada quando utilizamos o protocolo de detecção por fluorescamina. Este procedimento consiste num enorme avanço em relação aqueles utilizados até o presente, nos quais os substratos são proteínas. De fato, a aspártico-proteinase intestinal de *M. domestica* é virtualmente inativa sobre os substratos sintéticos para pepsina. Além disto, a detecção da hidrólise de hemoglobina feita com protocolo utilizando TCA 50%

é de 14, $1 \pm 0,3$ U/ml (Lemos & Terra, 1991a) enquanto que, a utilização do protocolo de detecção por fluorescamina permite a obtenção de valores da ordem de 80000 U/ml, o que representa um aumento de sensibilidade de cerca de 6000x.

A precipitação de proteínas com tampão pH 3,5 é um passo importante na purificação da aspártico-proteinase intestinal de *M. domestica*. Isto porque, quando amostra preparada em água bidestilada é submetida a esta mesma marcha de purificação, pode-se verificar na análise por SDS-PAGE (dado não mostrado) que há uma série de bandas contaminantes. Alguns deles não são eliminadas durante as cromatografias, impossibilitando, desta maneira, o isolamento da catepsina D de *M. domestica* (ver item 2. Materiais e Métodos).

Devido às perdas de atividade de aspártico-proteinase por congelamento-descongelamento, os homogeneizados foram preparados nos mesmos dias em que as cromatografias foram realizadas. Quando não foi possível a realização de todas as cromatografias num único dia, as amostras foram guardadas a 4°C, evitando assim, perdas de atividade por congelamento-descongelamento.

Não foi possível a obtenção de seqüência da porção N-terminal da aspártico-proteinase de *M. domestica* possivelmente devido a um bloqueio nesta região. Não se tem idéia ainda da natureza deste bloqueio, e se isto é comum entre outras aspártico-proteinases digestivas de insetos.

A marcha de purificação estabelecida possibilitou o isolamento de uma proteína de cerca de 30 kDa, correspondente a aspártico-proteinase de *M. domestica*. Lemos & Terra (1991a) demonstraram, utilizando preparações semi-purificadas, que larvas de *M. domestica* apresentam múltiplas isoformas de aspártico-proteinases

intestinais, possuindo a maioria pesos moleculares entre 40 e 80 kDa. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos para catepsina D por Sapolsky & Woessmer (1972) e Barret (1977).

Sendo assim, é possível que a diferença entre os pesos moleculares obtidos por Lemos & Terra (1991a) e neste trabalho seja devida a não formação de agregados de aspártico-proteinase intestinal neste último, o que se deve, possivelmente, à purificação até a homogeneidade da aspártico-proteinase intestinal em questão.

Como a aspártico-proteinase intestinal de *M. domestica* foi purificada associada ao inibidor pepstatina A, para a realização de estudos de especificidade desta enzima, é necessário que o complexo enzima-inibidor seja desfeito, o que, infelizmente, ainda não foi possível sem resultar em autólise que inviabiliza as medidas. Uma possibilidade, a ser testada, consiste em cromatografia de filtração em gel em coluna HighTrap ou PD-10 (ambas da Pharmacia), que podem separar molecular grandes como proteínas de moléculas pequenas como sais, e inibidores como a pepstatina A. Após incubação da amostra contendo o complexo enzima-inibidor em pH levemente alcalino, estas colunas poderiam separar a aspártico-proteinase intestinal de *M. domestica* de seu inibidor.

Espera-se que a disponibilização futura de grandes quantidades de aspártico-proteinase recombinante viabilize os experimentos cinéticos através de correções aplicadas levando em conta a autólise. A clonagem da aspártico-proteinase poderia ser auxiliada pela determinação de seqüências dessa enzima obtidas por espectrometria de massas.

Os dados resultantes desta análise orientariam a confecção de sondas para a busca do gene codificador da aspártico-proteinase na biblioteca de cDNA de intestinos médios de larvas de *M. domestica*. Conforme ressaltado na Introdução, há enorme carência de dados sobre aspártico-proteinases digestivas de insetos.

3.2. A lisozima intestinal de *D. melanogaster* e salivar de *A. darlingi*

3.2.1. Expressão de clones de lisozimas em *E. coli*

Os clones de lisozima intestinal (Lys D) e de lisozima salivar (Lys P), ambos de *D. melanogaster*, cedidos pela Dra. Sirlei Daffre, encontravam-se “linearizados” por digestão com a enzima de restrição BamHI. Para aumentar o número de cópias destes clones e formar um estoque destes materiais, estes genes foram submetidos à ligação para posterior transformação de bactérias competentes.

Após a ligação, estes clones foram submetidos à reação de PCR, sendo os produtos analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. O único clone que resultou em produto de PCR de tamanho esperado foi Lys D, correspondente a lisozima intestinal de *D. melanogaster*.

A análise do mapa de restrição do clone LysP não amplificado revelou a existência de dois sítios de restrição para Bam HI dentro do gene. Como este gene havia sido submetido à digestão com esta enzima previamente, não foi possível obter o produto de PCR esperado.

Assim, este estudo foi feito apenas com os clones de lisozima salivar de *A. darlingi* (Lysdar) e de lisozima digestiva de *D. melanogaster* (Lys D), já que submetidos à reação de PCR com os primers outrora descritos, resultaram em produtos de tamanho esperado (cerca de 360 pb, que traduzem proteínas de cerca de 13,5 kDa).

Para a confecção dos vetores de expressão utilizando pT7-7, os insertos e os seus respectivos vetores foram digeridos com os pares de enzimas de restrição adequados, de acordo com os sítios de restrição presentes nos “primers”.

Na figura 9, pode ser visto uma foto do gel de agarose de onde, os insertos e seus respectivos vetores foram extraídos - conforme item 2.2.8. – sendo submetidos à reação de ligação como descrito em 2.2.11. Desta forma, obtivemos os vetores pT7-D e pT7-dar (figura 10).

Estes vetores foram utilizados na transformação de bactérias competentes Origami™ B (DE3); o que resultou em dois lotes de células: Origami pT7-D e Origami pT7-dar, correspondendo, respectivamente, a células transformadas com pT7-D e pT7-dar.

Estas bactérias transformadas foram submetidas à mini-indução, conforme descrito no item 2.2.1.2. Podemos verificar na figura 11, que houve a expressão diferencial do gen Lysdar na presença do indutor IPTG. Entretanto, o mesmo não foi observado para bactérias Origami pT7-D.

Por esta razão, bactérias Origami pT7-D foram submetidas à indução por IPTG, por um tempo mais prolongado. Entretanto, como pode ser verificado na figura

Figura 9: Produtos de digestão com enzimas de restrição do vetor de expressão pT7-7 e dos genes Lys D e Lysdar. 1: padrões de peso molecular de DNA (Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder, ready-to-use, Fermentas); 2: vetor pT7-7 digerido com as enzimas Nde I e Pst I; 3: vetor pT7-7 digerido com as enzimas Nde I e Hind III; 4: gen Lysdar digerido com as enzimas Nde I e Pst I; 5: gen Lys D digerido com as enzimas Nde I e Hind III. Os pesos moleculares estão indicados à esquerda do gel. A seta vermelha indica as bandas correspondentes aos insertos dos clones estudados.

Figura 11: SDS-PAGE mostrando o resultado da mini-indução de bactérias Origami™ B (DE3) transformadas. 1: padrões de peso molecular; 2: bactérias transformadas com pT7-dar não induzido; 3: bactérias transformadas com pT7-D não induzido; 4: padrões de peso molecular; 5: bactérias transformadas com pT7-dar induzido; 6: bactérias transformadas com pT7-D induzido. Os pesos moleculares estão indicados à esquerda do gel. A seta vermelha indica uma banda de proteína na raia 5 correspondente à lisozima salivar de *A. darling* recombinante.

12, ainda este tempo não foi suficiente para induzir a expressão diferencial do gene Lys D.

As células Origami pT7-dar que apresentaram expressão diferencial foram submetidas à maxi-indução seguida de lise celular com o auxílio do sonificador, a qual não foi eficaz (figura 13), já que praticamente todas as proteínas bacterianas encontram-se no sedimento.

É interessante ressaltar que a lise da bactéria transformada não foi feita com lisozima comercial de galinha, apesar de esta técnica ser muito eficiente, porque a enzima a ser expressa era uma lisozima. A presença da lisozima comercial no lisado adulteraria os resultados de atividade a serem obtidos.

As células foram então submetidas à lise com pérolas de vidro, seguindo o protocolo descrito no item 2.2.1.3. Antes, porém, as bactérias Origami pT7-dar foram maxi-induzidas a 25°C e 37°C. Como a 25°C a taxa metabólica das bactérias é reduzida, a quantidade de proteína sintetizada é bem menor. Com este recurso, era esperado que houvesse uma diminuição na formação dos corpos de inclusão.

Durante o período de indução, alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo para análise por SDS-PAGE. Nas figuras 14 e 15 podem ser observados resultados para as bactérias Origami pT7-dar induzidas a 25°C e 37°C, respectivamente. É evidente que em ambas preparações houve expressão diferencial do gene de interesse.

As células obtidas nestas maxi-induções foram lisadas com pérolas de vidro e alíquotas dos materiais lisado solúvel e lisado insolúvel de cada uma das preparações foram submetidas à análise por SDS-PAGE (figura 16). A lisozima

Figura 12: SDS-PAGE de amostras resultando de bactérias Origami™ B (DE3) transformadas com pT7-D submetidas à indução por IPTG 1mM, por diferentes intervalos de tempo. 1: padrões de peso molecular; 2: bactérias Origami™ B (DE3) contendo inserto do gen Lys D não induzido; 3, 4, 5, 6, 7 e 8: bactérias Origami™ B (DE3) contendo inserto do gen Lys D induzido por 30, 60, 120, 240, 360 e 480 minutos. Os pesos moleculares estão indicados à esquerda do gel.

Figura 13: SDS-PAGE de amostras obtidas por lise celular com o auxílio de sonicador. Raia 1: padrões de peso molecular (valores indicados à esquerda do gel). Raias 2 e 3: bactérias OrigamiTM B (DE3) transformadas com vetor pT7-dar; 2: não induzido por IPTG; 3: induzido por IPTG. Raias 4 e 5: frações do lisado de bactérias OrigamiTM B (DE3) transformadas com vetor pT7-dar induzidas por IPTG, expressando o gene Lysdar; 4: fração solúvel; 5: fração não solúvel.

Figura 14: SDS-PAGE mostrando o resultado da maxi-indução à 25°C de bactérias *E. coli*, linhagem Origami™ B (DE3) transformadas com pT7-dar. Raia 1: padrões de peso molecular; Raia 2: bactérias transformadas com pT7-dar não induzidas; Raias 3 a 7: bactérias transformadas com pT7-dar submetidas a diferentes tempos de indução, a saber 1, 2, 3, 4 e 15 horas, respectivamente; Raia 8: padrões de peso molecular, cujos valores encontram-se indicados à esquerda do gel. As setas azuis indicam a banda de proteína correspondente à lisozima salivar de *A. darling* recombinante.

Figura 15: SDS-PAGE mostrando o resultado da maxi-indução à 37°C de bactérias *E. coli*, linhagem Origami™ B (DE3) transformadas com pT7-dar. Raia 1: padrões de peso molecular; Raia 2: bactérias transformadas com pT7-dar não induzidas; Raias 3 a 7: bactérias transformadas com pT7-dar submetidas a diferentes tempos de indução, a saber 1, 2, 3, 4 e 15 horas, respectivamente; Raia 8: padrões de peso molecular, cujos valores encontram-se indicados à esquerda do gel. As setas vermelhas indicam a banda de proteína correspondente à lisozima salivar de *A. darling* recombinante.

Figura 16: SDS-PAGE de proteínas de bactérias *E. coli*, linhagem Origami™ B (DE3) transformadas com pT7-dar submetidas a lise celular com pérolas de vidro. Raia 1: padrões de peso molecular (valores indicados à esquerda do gel); Raia 2: bactérias transformadas com pT7-dar não induzidas; Raia 3: bactérias transformadas com pT7-dar induzidas a 25°C, por 15 horas; Raia 4 e 5: lisado das bactérias transformadas com pT7-dar induzidas a 25°C. Raia 4: lisado solúvel; Raia 5: lisado insolúvel; Raia 6: bactérias transformadas com pT7-dar não induzidas; Raia 7: bactérias transformadas com pT7-dar induzidas a 37°C, por 15 horas; Raia 8 e 9: lisado das bactérias transformadas com pT7-dar induzidas a 37°C. Raia 8: lisado solúvel; Raia 9: lisado insolúvel. As setas coloridas indicam a proteína correspondente à lisozima salivar de *A. darling* recombinante, a qual encontra-se na fração insolúvel do lisado de bactérias. Oas retângulos indicam as raia correspondentes a material oriundo de bactérias induzidas à 25 °C (em azul) e à 37 °C (em vermelho).

salivar de *A. darlingi*, em ambas preparações, foi diagnosticada no lisado insolúvel (corpos de inclusão).

O lisado insolúvel, oriundo da maxi-indução a 37°C, foi submetido ao protocolo de solubilização descrito no item 2.2.1.4. Na figura 17, verifica-se que a lisozima salivar de *A. darlingi* não foi solubilizada quando uréia 8M foi utilizada como solução desnaturante. Entretanto, quando SDS 3% foi utilizado como agente desnaturante, foi possível detectar uma banda de cerca de 14 kDa, correspondente ao produto de expressão do gene *Lysdar* (figura 18).

Não foi possível detectar atividade da lisozima salivar de *A. darlingi* solubilizada de corpos de inclusão por SDS 3% quando esta enzima foi submetida a ensaio de atividade, conforme descrito no item 2.2.12.

A ausência de atividade hidrolítica da enzima sintetizada, mensurável pelos métodos de detecção utilizados neste estudo, pode ser devida à presença de resíduos de detergente na amostra, apesar da realização de diálises sucessivas para a retirada de SDS (item 2.2.1.4.). Esses resíduos comprometeriam o dobramento adequado da lisozima. Isto poderia prejudicar a conformação do sítio ativo da enzima, impedindo a ligação desta ao substrato e/ou a atividade catalítica.

3.2.2. Expressão de clones de lisozimas em *Pichia pastoris*

Para a confecção dos vetores de expressão utilizando pPIC9, insertos e respectivos vetores foram digeridos com os pares de enzimas de restrição

Figura 17: SDS-PAGE de amostras obtidas após as tentativas de solubilização de corpos de inclusão utilizando uréia 8M como agente desnaturante. Raia 1: padrões de peso molecular; raia 2: bactérias Origami™ B (DE3) transformadas com pT7-dar não induzidas; raia 3: bactérias Origami™ B (DE3) transformadas com pT7-dar induzidas; raia 4: lisado solúvel de bactérias; raia 5: lisado insolúvel de bactérias; raias 6 a 9: diferentes tempos de incubação com uréia 8M: 1, 4, 8 e 16 horas, respectivamente. A seta vermelha indica a ausência da banda de proteína correspondente à lisozima salivar de *A. darling* recombinante. Os padrões de peso molecular estão indicados à esquerda do gel.

Figura 18: SDS-PAGE de amostras obtidas após as tentativas de solubilização de corpos de inclusão utilizando SDS 3% como agente desnaturante. Raia 1: padrões de peso molecular; raia 2: lisado solúvel de bactérias; raia 3: lisado insolúvel de bactérias; raias 4 a 7: diferentes tempos de incubação com SDS 3%: 1, 4, 8 e 16 horas, respectivamente. A seta vermelha indica a banda de proteína correspondente à lisozima salivar de *A. darling* recombinante. Os padrões de peso molecular estão indicados à esquerda do gel.

adequados, de acordo com os sítios de restrição presentes nos “primers”, e analisados em gel de agarose.

Os insertos e seus respectivos vetores foram extraídos do gel de agarose-conforme item 2.2.8 – sendo submetidos, na seqüência, à reação de ligação como descrito em 2.2.11. Desta forma, obtivemos os vetores pPIC9-D e pPIC9-dar contendo os insertos dos genes Lys D e Lysdar, respectivamente (figura 19).

Bactérias *E. coli* XL Blue foram transformadas com estes vetores para a obtenção de um maior número de cópias dos mesmos. Após a purificação, estes plasmídeos foram submetidos à digestão com enzima de restrição Sac I para transformação de *P. pastoris* (item 2.2.2.1).

Na figura 20, pode ser vista foto de gel de agarose no qual foram aplicados os produtos de PCR de 12 colônias transformadas com pPIC9-D escolhidas ao acaso. É evidente a presença de quatro colônias com produtos de PCR de tamanho esperado. Após a indução por metanol, o meio de cultura destas colônias foi submetido a ensaio de atividade em placa ML-ágar, de acordo com protocolo descrito no item 2.2.12.

Na figura 21, verifica-se o resultado obtido neste ensaio de atividade em placa. É evidente a presença de halos mais claros ao redor dos poços onde alíquotas do meio de cultura, contendo a lisozima intestinal de *D. melanogaster*, foram aplicados. Estes halos indicam a hidrólise da parede celular de *Micrococcus lysodeikticus* pela ação da lisozima intestinal recombinante de *D. melanogaster*.

Colônias de *P. pastoris* transformadas com o vetor pPIC9-dar linearizado com Sac I foram induzidas conforme descrito no item 2.2.10. Feito isto, uma alíquota do meio de cultura de cada uma destas colônias foi submetida a ensaio de atividade em

Figura 19: Representação esquemática dos vetores confeccionados com os clones LysD e Lysdar para transformação de *P. Pastoris* GS115 (*his4*). **A:** vetor pPIC9-D. O inserto LysD foi ligado no vetor pPIC9 nos sítios Xho I e Avr II. **B:** vetor pPIC9-dar. O inserto Lysdar foi ligado no vetor pPIC9 nos sítios Xho I e Avr II.

Figura 20: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de colônia de *P. pastoris* transformadas com pPIC9-D. PM: padrões de peso molecular (Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder, ready-to-use, Fermentas); 1 a 4: produtos de PCR de colônias escolhidas ao acaso. É possível notar que as colônias de 1 a 4 geraram produtos de tamanho esperado, indicando a que o inserto LysD foi incorporado ao genoma destas colônias de *P. pastoris*. Pesos moleculares encontram-se indicados ao lado esquerdo do gel.

Figura 21: Ensaio de atividade de lisozima intestinal de *D. melanogaster* em placa ML-ágar. Poço 1: controle negativo (tampão citrato-fosfato 50mM pH 3,5, contendo NaCl 150mM); Poço 2: controle positivo (lisozima de galinha 0,2 mg/ml); Poços de 3 a 6: alíquotas do meio de cultura das colônias de *P. pastoris* que apresentaram produtos de tamanho esperado em PCR de colônia.

meio líquido, conforme descrito no item 2.2.12. Entretanto, não foi possível detectar atividade lisozímica em nenhuma das amostras testadas (dado não mostrado). Quando alíquotas dos referidos meios de cultura foram submetidas a análise por SDS-PAGE, não foi possível detectar nenhuma banda de proteína com o peso molecular esperado (cerca de 14 kDa), mesmo submetendo o gel à coloração com prata (Blum *et al*, 1987), mais sensível para detecção. Este resultado (dado não mostrado) indica que a lisozima salivar de *A. darlingi*, ao contrário do esperado, não foi expressa.

Uma possível explicação para este resultado é a perda do “frame” de leitura do inserto, o que justificaria a não expressão da enzima. Durante a transformação, o vetor é inserido no genoma da *P. pastoris*. Assim sendo, é possível que durante a inserção, tenha ocorrido a perda de uma ou algumas bases nesta região, e, em decorrência, a perda do “frame” de leitura do inserto. Outra possível explicação é a presença de sítios de restrição, no inserto, semelhantes ao da enzima de restrição utilizada. Estes teriam sido reconhecidos como sítios de clivagem pela enzima Sac I, utilizada na digestão. Isto contaria o inserto impedindo, conseqüentemente, sua expressão.

3.2.3. Purificação da lisozima intestinal recombinante de *D. melanogaster*

Alíquotas de 500ml do meio de cultura de *Pichia pastoris* transformadas, contendo lisozima D recombinante foram submetidas à cromatografia de filtração em

gel em coluna Superose 12, sistema FPLC – Pharmacia, previamente equilibrada com tampão Imidazol 20mM pH 6,4. A proteína foi eluída com o referido tampão com fluxo de 0,5 ml/min e frações de 0,4 ml foram coletadas. A figura 22 mostra o perfil de eluição de atividade da lisozima D recombinante e uma alíquota da mistura das frações ativas reunidas foi submetida à análise em SDS-PAGE. Como pode ser observado na figura 23, a cromatografia foi eficaz, permitindo o isolamento de um componente proteico de cerca de 14 kDa.

Na tabela 4 estão resumidos os resultados de atividade eluída, atividade específica e recuperação obtidos na purificação da lisozima intestinal recombinante de *D. melanogaster*.

	Atividade (U/ml)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%U)
Meio MM ^{LysD}	12,6	2,1	-
Superose 12	39,1	36,2	79,6

Tabela 4: Quadro-resumo dos resultados obtidos na purificação da lisozima intestinal recombinante de *D. melanogaster*. Meio MM^{LysD}: meio mínimo metanol contendo lisozima intestinal recombinante de *D. melanogaster*. Superose 12: reunido de frações ativas da cromatografia com coluna Superose 12.

O valor de recuperação obtido para a cromatografia foi de cerca de 80%, sendo a atividade eluída da coluna 39,1 U/ml e a atividade específica do material eluído da coluna 36,2 U/mg.

O valor de atividade específica obtido por Regel *et al.* (1998) para a lisozima intestinal de *D. melanogaster* (purificada a partir de 11.000 larvas deste inseto) foi de

Figura 22: Perfil de eluição do meio MM^{LysD} submetido à filtração em gel com coluna Superose 12, Pharmacia, sistema FPLC. Condições de eluição: lavagem da coluna com 30 ml de tampão imidazol 20 mM pH 6,4 a um fluxo de 0,5 ml por minuto, frações de 0,4 ml foram coletadas.

Figura 23: SDS-PAGE do reunido de frações ativas oriundas da cromatografia com coluna Superose 12, utilizada na purificação de lisozima D de *D. melanogaster*. Raia 1: padrões de peso molecular (cujos valores encontram-se indicados à esquerda do gel); Raia 2: reunido das frações ativas da cromatografia com coluna Superose 12. A seta indica a proteína de cerca de 14 kDa isolada por esta cromatografia, correspondente à lisozima intestinal recombinante de *D. melanogaster*.

20000 U/ml, cerca de 550x maior do que a obtida neste trabalho para a lisozima intestinal recombinante de *D. melanogaster*. Duas seriam as possíveis explicações para esta diferença: (1) nem toda a proteína expressa encontra-se na forma ativa; (2) a proteína recombinante apresenta atividade menor do que a da proteína selvagem, devido a erros de dobramento que afetem as suas estruturas secundária ou terciária e, em consequência, o seu sítio ativo ou sua ligação com o substrato.

A primeira possibilidade parece ser mais correta, já que a enzima recombinante tem as mesmas propriedades cinéticas que a lisozima intestinal selvagem isolada das larvas de *D. melanogaster* por Regel *et al.* (1998), conforme descrito adiante no item 3.2.4.

Assim sendo, assumindo esta hipótese como verdadeira, e sabendo que a lisozima intestinal de *D. melanogaster* caracterizada cineticamente por Regel *et al.* (1998) é semelhante a lisozima intestinal de *M. domestica* caracterizada por Lemos *et al.* (1992), intestinos médios de larvas de *M. domestica* foram submetidos aos procedimentos descritos por Lemos *et al.* (1992), sendo o extrato aquecido utilizado em ensaios enzimáticos para a verificação de fatores que poderiam afetar a atividade de lisozima intestinal.

A detecção de atividade de lisozima intestinal foi feita segundo descrito no item 2.2.12 de materiais e métodos. Os ensaios enzimáticos foram realizados sob diversas condições, a saber: em ausência de metanol (grupo controle); em presença de diferentes concentrações de metanol (2%, 4%, 6% e 12%); após incubação a 30 °C por 72h em tampão fosfato 100 mM pH 6,0 em presença e ausência de metanol 2%; e, por fim, após congelamento.

A pré-incubação foi feita em incubadora com agitação (150 rpm) a 30 °C por 72h em tampão fosfato 100 mM pH 6,0, visando a reprodução das condições de indução de *P. pastoris*. Isto permitiria verificar se a exposição de lisozima intestinal ao indutor metanol, bem como ao referido pH e à temperatura, durante um período prolongado de indução, interferiria em sua atividade enzimática.

Analogamente, a medida da atividade enzimática após o congelamento, bem como na presença de concentrações crescentes de metanol, permitiria verificar se estes interferem na atividade enzimática da enzima. Os dados deste experimento podem ser observados na tabela 5.

condição de ensaio	atividade (U/ml)	atividade perdida (%)
controle	176,8	-
PI a 30 °C + metanol 2%	131,7	25,5
congelamento	126,9	28,2

Tabela 5: Atividade de lisozima intestinal de *M. domestica* submetida a diferentes tratamentos.

Controle: extrato aquecido descrito por Lemos *et al.*, (1992); PI a 30 °C + metanol 2%: corresponde ao extrato aquecido descrito por Lemos *et al.*, (1992) pré-incubado a 30 °C, pH 6,0, em presença de metanol 2%; congelamento: corresponde ao extrato aquecido descrito por Lemos *et al.*, (1992) submetido a congelamento. Todos os ensaios foram realizados conforme descrito no item 2.2.12 de materiais de métodos.

Pode-se verificar que tanto a incubação em pH 6,0 a 30 °C na presença de metanol, quanto o congelamento da amostra, interferem na atividade enzimática provocando perdas na mesma. Cerca de 25% da atividade enzimática foi perdida

após a incubação em pH 6,0 a 30 °C na presença de metanol 2%. Após congelamento, 28% da atividade foi perdida.

Visto que o meio de cultura de *Pichia pastoris* transformadas contendo lisozima D recombinante foi congelado antes deste ser submetido à cromatografia de filtração em gel, estes dois fatores combinados poderiam justificar em parte a discrepância nos valores de atividade específica obtidos por Regel *et al.* (1998) para a lisozima intestinal de *D. melanogaster*, e neste presente trabalho, para a lisozima intestinal recombinante deste inseto.

3.2.4. Propriedades cinéticas da lisozima intestinal recombinante de *D. melanogaster*

Com o intuito de verificar o efeito do pH e da força iônica sobre a atividade da lisozima intestinal recombinante de *D. melanogaster*, esta foi submetida a ensaios em pHs que variavam de 2 a 8 e em forças iônicas distintas.

Na figura 24 pode-se observar a relação entre a força iônica do meio e o pH ótimo da enzima. Quando a força iônica do meio é 0,02, o pH ótimo da enzima se mantém entre 4,0 e 4,5; quando a força iônica do meio é 0,2, o pH ótimo se mantém entre 3,0 e 3,5. Foi verificado ainda que os valores de atividade máxima obtidos para esta enzima, são maiores em forças iônicas menores, conforme observado na figura 25.

Finalmente, notou-se que a força iônica influi na constante de Michaelis-Menten (K_m) da lisozima intestinal recombinante de *D. melanogaster*. Ensaio

Figura 24: Efeito do pH e da força iônica sobre a atividade da lisozima intestinal recombinante purificada a partir do meio MM^{LysD} . As forças iônicas utilizadas foram 0,02 (○) e 0,2 (●).

Figura 25: Efeito do pH e da força iônica sobre a atividade da lisozima intestinal recombinante purificada a partir do meio MM^{LysD} . As forças iônicas utilizadas foram 0,02 (○) e 0,2 (●).

realizados a pH 4,3, utilizando-se *M. lysodeikticus* como substrato, em diferentes forças iônicas, revelaram que o valor do K_m aumenta conforme a força iônica do meio torna-se maior, conforme se observa na figura 26.

3.2.5. Lisozimas de *D. melanogaster* e *A. darlingi*: considerações finais

Embora a lisozima recombinante de *D. melanogaster* tenha atividade específica menor que a selvagem, conforme comentado anteriormente, as suas propriedades são idênticas às da lisozima isolada do próprio inseto. Assim, a enzima em questão caracteriza-se por apresentar atividade ótima em pHs ácidos e ser afetada pela força iônica do meio de maneira muito significativa. O pH ótimo da enzima varia de 4,5 em meio de força iônica 0,02, para 3,5, quando a força iônica é aumentada para 0,2.

Estes resultados são semelhantes àqueles encontrados por Regel *et al.* (1998), para a lisozima intestinal selvagem de *D. melanogaster*, onde o pH ótimo da enzima varia de 4,7 para 2,7, quando a força iônica do meio varia de 0,02 para 0,2. O K_m da enzima recombinante também aumenta com o aumento da força iônica de forma similar a relatada anteriormente por Regel *et al.* (1998).

A interdependência do pH ótimo da enzima e a força iônica do meio pode ser explicada pela estrutura polianiônica da parede celular bacteriana que, devido ao campo eletrostático negativo produzido, é capaz de influir sobre as propriedades físico-químicas do meio onde a reação catalítica ocorre, decrescendo o pH local entre

Figura 26: Efeito da força iônica sobre a constante de Michaelis-Menten (K_m) da lisozima intestinal recombinante purificada a partir do meio MM^{LysD} . As forças iônicas utilizadas foram 0,02; 0,04; 0,06; 0,1 e 0,2. Os valores de K_m foram determinados conforme descrito em Materiais e Métodos, item 2.2.15.

a enzima e o substrato. Em forças iônicas baixas, um grande campo eletrostático negativo é produzido, tornando o pH local bem menor que o pH da solução em que irá ocorrer a reação catalítica. Assim a diferença entre os dois pHs será muito alta, sendo aí observada a atividade lítica máxima da lisozima. Já em meios de forças iônicas elevadas, observa-se um decréscimo do potencial eletrostático e o pH local assemelha-se ao pH do meio de reação, tornando a diferença entre os pHs muito pequena (Maurel & Douzou, 1976).

Esta teoria também explica o fato da atividade de lisozima decair com o aumento da força iônica. Como elevadas concentrações salinas diminuem o campo eletrostático formado pelas paredes das bactérias, ocorre uma menor atração entre a lisozima (de carga positiva) e o referido substrato (de carga negativa), o que resulta na diminuição de afinidade e conseqüentemente, na redução da atividade máxima da lisozima.

A diminuição de afinidade pode ser medida pela variação na constante de Michaelis-Menten. Com o incremento da força iônica, o K_m também é elevado, conforme o observado neste estudo para a lisozima D recombinante, bem como para a lisozima D selvagem (Regel *et al.*, 1998).

Os dados obtidos quanto ao efeito do pH e da força iônica, bem como, sobre a atividade da enzima recombinante estudada neste trabalho, são concordantes com aqueles obtidos por Regel *et al.* (1998), sendo portanto viável a utilização da lisozima intestinal recombinante para a obtenção de grandes quantidades desta lisozima intestinal para estudos de cristalização, embora a possibilidade de existirem moléculas inativas junto com as ativas seja motivo de preocupação.

Apesar dos resultados negativos sobre a expressão de lisozima salivar de *A. darlingi* em *P. pastoris*, este organismo parece ser a melhor opção para expressão de lisozimas devido, não só aos excelentes resultados obtidos na expressão de Lys D, bem como aos altos níveis de síntese de proteínas relatados na literatura para este organismo (Mine *et al.*, 1999; Oka *Et al.*, 1999; Goda *et al.*, 2000), quando comparados com os de *E. coli*. Somado a estes fatores está o fato da cadeia polipeptídica expressa ser secretada para o meio extracelular, aumentando assim a probabilidade da enzima ser expressa com atividade, visto que não há relatos de formação de corpos de inclusão neste meio de cultura.

Um outro aspecto vantajoso seria a purificação das enzimas recombinantes. Como o meio de cultura contendo enzima recombinante consiste em um material com quantidade apreciável da molécula de interesse e poucos elementos contaminantes, a purificação tende a ser facilitada em relação a purificação da mesma proteína a partir de extratos brutos, como por exemplo, homogeneizados de tubos digestivos.

No futuro, o estudo de lisozimas intestinais poderá ser ampliado a partir de dados de expressão de lisozimas, tanto intestinais como salivares, de outros insetos. A expressão destas enzimas em *P. pastoris* poderá abrir caminhos para estudos de mutação sítio-dirigida, os quais poderiam fornecer dados significativos à cerca da importância de Ser na posição 104. Isto possibilitaria a verificação da hipótese proposta por Regel *et al* (1998) de que a evolução de uma lisozima, para funcionar em meio ácido - tanto em vertebrados como insetos - implica na presença de um resíduo de serina na posição 104, bem como na diminuição do número de aminoácidos básicos.

4. RESUMO

Insetos abrangem o maior número de espécies descritas, estando distribuídos por praticamente todos os nichos ecológicos. O tubo digestivo destes animais consiste na principal interface entre estes e o meio externo. Assim, o estudo das enzimas digestivas, ou proteínas relacionadas ao processo digestivo em insetos, faz-se fundamental para a tentativa de desenvolver novos métodos de controle que ajam via canal alimentar, como o uso de plantas transgênicas para controlar insetos fitófagos (Felton & Gatehouse, 1996).

Diptera superiores são os únicos animais, além dos vertebrados, que apresentam uma região ácida em seu intestino médio (Vonk & Western, 1984). Assim, o estudo da digestão ácida nestes organismos permite-nos examinar em detalhe este interessante paralelismo evolutivo (muito revelador se incluir também aspectos moleculares).

Para realização deste estudo foram escolhidas duas enzimas relacionadas com a digestão ácida em Diptera: uma aspártico-proteinase de *Musca domestica*, semelhante à catepsina D, e uma lisozima digestiva de *Drosophila melanogaster*.

Para purificar a aspártico-proteinase intestinal de *M. domestica*, ventrículos anterior e médio de larvas deste inseto foram homegeneizados e centrifugados, sendo o sobrenadante resultante utilizado como fonte de enzima. A combinação de uma cromatografia em coluna de troca iônica seguida de uma filtração em gel

mostrou-se como a melhor para a obtenção da aspártico-proteinase intestinal de larvas de *M. domestica* totalmente purificada.

Clones de lisozima de *D. melanogaster* (LysD) e de *A. darlingi* (Lysdar) foram utilizados na construção de vetores de expressão a seguir usados na transformação de *E. coli* linhagem Origami™ B (DE3) e *P. Pastoris* GS115 (*his4*).

As bactérias transformadas com vetor pT7-dar (que continha o gene Lysdar), quando induzidas por IPTG, foram capazes de expressar uma proteína, cujo peso molecular em gel de SDS-PAGE é de cerca de 14 kDa, como o esperado. A lisozima hipotética foi encontrada em corpos de inclusão, que solubilizados por SDS 3% resultaram em proteína inativa.

Colônias de *P. pastoris* transformadas com o vetor pPIC-9-D (contendo o gene LysD) foram submetidas a reação em cadeia com DNA polimerase. Aquelas que geraram produtos de PCR de tamanho coerente com o de uma lisozima foram cultivadas e posteriormente, induzidas por metanol.

P. pastoris é capaz de secretar a lisozima induzida. Assim, alíquotas do meio de indução foram utilizadas em ensaios enzimáticos para a detecção da atividade da lisozima intestinal de *D. melanogaster*. A lisozima é expressa em *P. pastoris* em grande quantidade (12 mg/L) e com atividade preservada.

Foi verificado que há uma íntima relação entre a força iônica do meio e o pH ótimo da lisozima intestinal recombinante de *D. melanogaster*. O pH ótimo é deslocado para valores mais ácidos quando em forças iônicas maiores. Em contrapartida, os valores de atividade obtidos para a lisozima D recombinante de *D. melanogaster* decrescem com o aumento da força iônica do meio.

Foi verificado ainda que a força iônica influi na constante de Michaelis-Menten (K_m) da lisozima intestinal recombinante de *D. melanogaster*: o valor do K_m aumenta conforme a força iônica do meio torna-se maior. Estes dados estão de acordo com os observados por Regel *et al*, 1998, para a lisozima intestinal isolada de larvas de *D. melanogaster*.

5. ABSTRACT

Insects are the most numerous of living beings and are found in almost all habitats. The midgut of these animals is the main interface between them and their environment. Thus, the study of digestive enzymes or of other proteins related to the insect digestive process is putatively useful for the development of new insect control strategies.

Houseflies (higher Diptera) are the only animals, besides vertebrates, that present an acidic region in the midgut (Vonk & Western, 1984). Due to that, a detailed analysis of the acidic digestion in these insects may disclose molecular evolutionary parallels between those animals.

Two enzymes were chosen along the aims discussed: a *Musca domestica* aspartic-proteinase, similar to cathepsin D and a digestive lysozyme from *Drosophila melanogaster*.

To purify the cathepsin D-like proteinase from *M. domestica* larvae, larval foreguts and midguts were homogenized, centrifuged, and the resulting supernatant was used as an enzyme source. Ion-exchange chromatography followed by a gel filtration of enzyme extract resulted in a homogeneous preparation of the enzyme.

Clones of lysozyme from *D. melanogaster* (LysD) and *A. darlingi* (Lysdar) were used in the construction of expression vectors, which were used to transform *E. coli* cells (Origami™ B(DE3)) and *P. pastoris* GS115 (*his4*).

Bacteria transformed with pT7-dar (the expression vector which contained the gene Lysdar), when induced by IPTG, expressed a protein with a molecular weight of 14 kDa, as expected for lysozyme. This protein was found in inclusion bodies that were solubilized in 3% SDS resulting in a protein with no activity.

After choosing at random *P. pastoris* colonies transformed with the expression vector pPIC9-D (containing the gene LysD), they were submitted to a PCR. The colonies with 366pb products were grown and induced by methanol.

P. pastoris was engineered to excrete the expressed proteins. In accordance to that, about 12 mg of lysozyme were recovered from each liter of culture medium.

Recombinant *D. melanogaster* lysozyme D was more active at acid pH values, when present in media with physiological ionic strengths, and its K_m value increased with the ionic strength of media. This is agreement with data obtained with lysozyme D isolated from *D. melanogaster* midgut. The results support the assertion that this enzyme may be used in crystallographic and site mutagenesis studies to reveal the molecular basis of its catalytic properties.

6. REFERÊNCIAS

- Adinolfi, M. (1981) Ontogeny of complement, lysozyme and lactoferrin in man. In *Immunological Aspects of Infection in Fetus and Newborn* (Edited by Lambert, H. P. & Wood, C. B. S.), pp. 19-47. Academic Press, London.
- Applebaum, S. W. (1985) Biochemistry of digestion. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Edited by Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I.) Vol. 4, pp. 279 - 311. Pergamon Press, New York.
- Barrett, A. J. (1977) Cathepsin D and other carboxyl proteinases. In *Proteinases in mammalian cells & tissues* (Edited by Barrett A. J.), pp. 207 - 248. North Holland, Amsterdam.
- Biggar, W. D. & Sturgess, J. M. (1977) Role of lysozyme in the microbicidal activity of rat alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 16, 974 - 982.
- Blum H., Beier H. & Gross H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93 - 99.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein - dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248 - 254.
- Cho W. L., Dhadialla T. S. & Raikhel, A. S. (1990) Purification and characterization of a lysosomal aspartic protease with cathepsin D activity from the mosquito. *Insect Biochem.* 2, 165-176.

- Jaffre S., Kylsten P., Samakovlis C. & Hultmark D. (1994) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*. An expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Mol. Gen. Genet.* 242, 152 - 162.
- Dash, C., Phadtare, S., Deshpande, V. & Rao, M. (2001) Structural and mechanism insight into the inhibition of aspartic proteases by a slow-tight binding inhibitor from an extremophilic *Bacillus* sp.: correlation of the kinetic parameters with the inhibitor induced conformational changes. *Biochemistry* 40, 11525 – 11532.
- Dobson D. E., Prager E. M. & Wilson A. C. (1984) Stomach lysozymes of ruminants. I. Distribution and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 259, 11. 607 - 11. 616.
- Espinoza - Fuentes F. P. & Terra W. R. (1987) Physiological adaptations for digesting bacteria. Water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut. *Insect Biochem.* 17, 809 - 817.
- Felton G. W. & Gatehouse J. A. (1996) Antinutritive plant defense mechanism. In *Biology of the Insect Midgut* (Ed. By Lehane M. J. & Billingsley P. F.), pp. 373 - 416. Chapman & Hall, London.
- Foltmann, B. (1981) Gastric proteinases - structure, function, evolution and mechanism of action. *Essays in Biochem.* 17, 52 - 84.
- Fruton J. S. (1976) The mechanism of the catalytic action of pepsin and related acid proteinases. *Adv. Enzym.*, 44, 1 - 36.
- Garesse R., Castell J. V., Vallejo C. G & Marco R. (1979) A fluorescamine - based sensitive method for the assay of proteinases, capable of detecting the initial cleavage steps of a protein. *Eur. J. Biochem.* 99, 253 - 259.

- Gildberg, A. (1988) Aspartic proteinase in fishes and aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B, 425 - 435.
- Goda, S., Takano, K., Yamagata, Y., Katakura, Y & Yutani, K. (2000) Effect of extra N-terminal residues on the stability and folding of human lysozyme expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Engineering*. Vol. 13, 4, 299 – 307.
- Gulnik, S. V., Suvorov, L. I., Majer, P., Collins, J., Kane, B. P., Johnson, D. G., Erickson, J. W. (1997) Design of sensitive fluorogenic substrates for human cathepsin D. *FEBS Lett.* 413, 379 - 384.
- Higgins, D. R. & Cregg, J. M. (1998) Methods in Molecular Biology vol 103. *In Pichia Protocols*. Human Press.
- Houseman, J. G. (1978) A thio - activated digestive proteinase from adults of *Rhodnius prolixus*. *Can. J. Zool.* 56, 1140 - 1143.
- Houseman, J. G. & Downe, A. E. R. (1980) Endoproteinase activity in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae). *Insect Biochem.* 10, 363 - 366.
- Hultmark D. (1996) Insect lysozymes. In *Lysozymes: Model Enzymes Biochemistry and Biology* (Edited by Jollès P.), pp. 87 - 102. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Imoto, T., Okasaki, K., Koga, H. & Yamada, H. (1987) Specificity of rat liver cathepsin D. *J. Biochem. Tokyo*, 101, 575 - 580.
- Ito Y, Nakamura M., Hotani T. & Imoto T. (1995) Insect lysozyme from house fly (*Musca domestica*) larvae: possible digestive function based on sequence and enzymatic properties. *J. Biochem. Tokyo*, 118, 546 - 551.

- Jollès P. & Jollès J. (1984) What's new in lysozyme research? *Molec. Cell Biochem.* 63, 165 - 189.
- Knight, C. C. & Barrett, A. J. (1976) Interaction of human cathepsin D with the inhibitor pepstatin. *Biochem. J.* 155, 117 - 125.
- Koganesawa, N., Aizawa, T., Masaki, K., Matsuura, A., Nimori, T., Bando, H., Kawano, K., Nitta, K. (2001) Construction of an expression system of insect lysozyme lacking thermal stability: the effect of secretion of signal sequence on level of expression in the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Engineering.* Vol. 14, # 9, 705 - 710.
- Krystal, G., MacDonald, C., Munt, B., Ashwell, S. (1985) A method for quantitating nanogram amounts of soluble protein using the principle of silver binding. *Analytical Biochemistry.* 148, 451 - 460.
- Kylsten P., Kimbrell D. A., Daffre S., Samakovlis C. & Hultmark D. (1992) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands. *Molec. Gen. Genet.* 232, 335 - 343.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 690 - 685.
- Lemos F. J. A. & Terra W. R. (1991a) Properties and intracellular distribution of a cathepsin D - like active at the acid region of *Musca domestica* midgut. *Insect Biochem.*, 21, 457 - 465.
- Lemos F. J. A. & Terra W. R. (1991b) Digestion of bacteria and the role of midgut lysozyme in some insect larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100B, 265 - 268.

- Lemos F. J. A., Ribeiro A. F. & Terra W. R. (1993) A bacteria – digesting midgut - lysozyme from *Musca domestica* (Diptera) larvae. Purification, properties and secretory mechanism. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23, 533 - 541.
- Maurel, P. & Douzou, P. (1976) Catalytic implications of eletrostatic potentials: the lytic activity of lysozyme as a model. *J. Mol.Biol.* 102, 253 - 264.
- McHenery, J. C, Allen, J. A. & Birbeck, T. H. (1986) Distribution of lysozyme - like activity in 30 bivalve species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B, 581 - 584.
- Miller, G. L. & Golder, R. H. (1950) Buffers of pH 2 to 12 use in eletroforesis. *Arch. Biochem.* 29, 420-423.
- Mine, S., Ueda, T., Hashimoto, Y., Tanaka, Y. & Imoto, T. (1999) High-level expresión of uniformly ¹⁵N-labeled hen lysozyme in *Pichia pastoris* and identification of the site in hen lysozyme where phosphate ion binds using NMR measurements. *FEBS Letters.* 448, 33 – 37.
- Moreira - Ferro, C. K., Daffre, S., James, A. A. (1998) A lysozyme in the salivary glands of the malaria vector *Anopheles darlingi*. *Insect Molecular Biology.* 7(3), 257 - 264.
- Morton R. E. & Evans T. A. (1992) Modifications of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. *Anal. Biochem.* 204, 332 - 334.
- Oka, C., Tanaka, M., Muraki, M., Harata, K., Suzuki, K. & Jigami, Y. (1999) Human lysozyme secretion increased by alpha-factor pro-sequence in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (11), 1977 – 1983.

- Oliveira, A. (2002) Estudo de especificidade da catepsina D humana. Dissertação [Mestrado]. Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.
- Pendola, S. & Greenberg, B. (1975) Substrate - specific analysis of proteolytic enzymes in the larval midgut of *Calliphora vicina*. *Ann. Ent. Soc. Amer.* 68, 341 - 345.
- Pillai S. & Zull J. E. (1985) Effects of ATP, vanadate and molybdate on catepsin D - catalyzed proteolysis. *J. Biol. Chem.*, 260, 8384 - 8389.
- Pimenta, D. C., Oliveira, A., Juliano, M. A., Juliano, L. (2002) Substrate specificity of human cathepsin D using internally quenched fluorescent peptides derived from reactive site loop of kallistatin. *Biochim. Biophys. Acta* 1544, 113 - 122.
- Prieur D. J. (1986) Tissue specific deficiency of lysozyme in ruminants. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B, 349 - 353.
- Rajagapolan, T. G., Stein, W. H. & Moore, S. (1966) The inactivation of pepsin by diazoacetyl - norleucine methyl ester. *J. Biol. Chem.* 241, 4295 - 4297.
- Regel R., Mantioli S. R. & Terra W. R. (1998) Molecular adaptation of *Drosophila melanogaster* lysozymes to a digestive function. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 28, 309 - 319.
- Ribeiro, A. F., Ferreira, C. & Terra, W. R. (1990) Morphological basis of insect digestion. In *Animal Nutrition and Transport Process* (Edited by Mellinger, J.). Vol. 1, pp. 96 - 105. Karger, Basel.

- Rich, D. H. & Sun, E. T. O. (1980) Mechanim of inhibition of pepsin by pepstatin - effect of inhibitor structure on dissociation constant and time-dependent inhibition. *Biochem. Pharmacol.* 29, 2205 – 2212.
- Rossignol, P. A. & Lueders, A. M. (1985) Bacteriolytic factor in the salivary glands of *Aedes aegypti*. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B, 819 - 822.
- Rupert, E. E. & Barnes, R. D. (1984) Insects. In *Invertebrate Zoology* (Edited by Rupert, E. E. & Barnes, R. D.), cap. 16, pp. 825 - 862. Saunders College Publishing, Philadelphia.
- Sapolsky, A. I. & Woessner, J. F., Jr. (1972) Multiple forms of cathepsin D from bovine uterus. *J. Biol. Chem.* 247, 2069 – 2076.
- Scarborough, P. E., Guruprasad, K., Topham, C., Richo, G. R., Conner, G. E., Blundell, T. L., Dunn, B. M. (1993) Exploration of subsite binding specificity of human cathepsin D through kinetics and rule - based molecular modeling. *Protein Sci.* 2, 264 - 276.
- Scarborough, P. E., Dunn, B. M. (1994) Redesign of the specificity of human cathepsin D:
The dominant role of position 287 in S₂ subsite. *Protein Eng.* 7, 495 - 502
- 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. & Klenk D. C. (1985) Measurements of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76 - 85.
- Stewart C. B., Schilling J. W. & Wilson A. C. (1987) Adaptative evolution in the stomach lysozymes of foregut fermenters. *Nature, Lond.* 330, 401 - 404.

- Takahashi T. & Tang J. (1981) Cathepsin D from porcine and bovine spleen. *Meth. Enzym.*, 80, 565 - 581.
- Twining S. S. (1984) Fluorescein isothiocyanate - labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.* 143, 30 - 34.
- Terra W. R. (1988) Physiology and biochemistry of insect digestive digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 21,675 - 734.
- Terra W. R., Espinoza - Fuentes F. P., Ribeiro, A. F. & Ferreira, C. (1988) The larval midgut of the housefly (*Musca domestica*): ultrastructure, fluid fluxes and ion secretion in relation to the organization of digestion. *J. Insect Physiol.* 34,463 - 472.
- Terra W. R. & Ferreira C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B, 1 - 62.
- van Noort, J. M. & Van der Drift, A. C. (1989)The selectivity of cathepsin D suggests an involvement of the enzyme in the generation of T - cell epitopes. *J. Biol. Chem.* 264, 14159 - 14164.
- Voet, D., Voet, J. G. & Pratt, C. W. (2000) Lisozima. In *Fundamentos de Bioquímica* (trad. Neto, A. G. F. et al.), Cap. 11, pp. 300 – 307. Artes Médicas Sul, Porto Alegre.
- Vonk H. J. & Western J. R. H. (1984) Comparative Biochemistry and Physiology of Enzymatic Digestion. Academic Press, New York.