UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Recebido em 12/01/01
Ficheiro
1286458
25759

**ESTUDO SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES DE ALFA
AMILASE DE *Bacillus Stearothermophilus* E DE *Anopheles
merus* EM CÉLULAS DE BACTÉRIA, LEVEDURA E INSETO**

PEDRO JORGE CHIMOY EFFIO
TESE DE DOUTORADO

DR. MANUEL TROYANO PUEYO
ORIENTADOR

SÃO PAULO
2001

INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

20.251

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**ESTUDO SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES DE ALFA
AMILASE DE *Bacillus Stearothermophilus* E DE *Anopheles
merus* EM CÉLULAS DE BACTÉRIA, LEVEDURA E INSETO**

**PEDRO JORGE CHIMOY EFFIO
TESE DE DOUTORADO**

**DR. MANUEL TROYANO PUEYO
ORIENTADOR**

**SÃO PAULO
2001**

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005061

Ficha Catalográfica

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

Chimoy Effio, Pedro Jorge

C538e Estudo sobre a expressão dos genes de alfa amilase de
Bacillus stearothermophilus e de *Anopheles merus* em células
de bactéria, levedura e inseto / Pedro Jorge Chimoy Effio. -
- São Paulo, 2001.
150p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Troyano Pueyo, Manuel.

I. Biologia molecular I. T. II. Troyano Pueyo, Manuel,
orientador.

574.88 CDD

**“Estudos Sobre a Expressão dos Genes de
Alfa Amilase de *B. stearothermophilus* e de
A. merus em Células de Bactéria, Levedura e
Inseto”**

PEDRO JORGE CHIMOY EFFIO

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

Aprovado por:

Prof. Dr. MANUEL TROYANO PUEYO
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. WALTER RIBEIRO TERRA
IQ - USP

Profa. Dra. ALINE MARIA DA SILVA
IQ - USP

Prof. Dr. JOSÉ FRANCO DA SILVEIRA FILHO
UNIFESP

Profa. Dra. LUCILE MARIA FLOETER WINTER
ICB - USP

SÃO PAULO
05 DE ABRIL 2001.

À minha amada família, minha esposa Ana Maria e minhas filhas Katerin, Karolin e Ana Maria por aguardar com amor o meu retorno ao lar.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido concluído sem a colaboração de pessoas e entidades. Agradeço em especial a:

Prof. Dr. Manuel Troyano Pueyo pela orientação e amizade que tornaram possível a realização deste trabalho.

Dra. Mari C. Sogayar que me permitiu trabalhar em seu laboratório com o sistema Baculovírus-*Spodoptera* e obter vários resultados importantes.

Áurea V. Folgueras-Flatschart; Wagner R. Montor; Celso Romero e Marco Alegria pela ajuda desinteressada com que me brindaram e apoio permanente. Caros amigos muito obrigado. Aprendi muito com vocês.

A Cibele Rossani e a equipe de Pós-graduação pelo profissionalismo com que sempre me trataram.

Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra pelo seu incentivo e colaboração no desenvolvimento do trabalho experimental.

Prof^a. Dra. Suely Lopes Gomes pelo seu incentivo e compreensão.

Prof. Dr. Jürgen Hofemeister, Gatersleben-Alemanha, pela síntese de “primers” e por seus comentários sobre a glicosilação de proteínas heterólogas.

Prof^a. Dra. Fátima Grossi de Sá (CENARGEN-EMBRAPA) pela síntese de “primers” e o anticorpo para a alfa amilase de *Zabrotes subfasciatus*.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que, com sua bolsa, possibilitou minha estadia no IQ-USP e o desenvolvimento deste trabalho.

Fundação da Universidade de São Paulo (FUSP), que possibilitou meu retorno a São Paulo para a conclusão deste trabalho.

Aos professores do Instituto de Química, com quem sempre estamos aprendendo durante nossa formação.

RESUMO

O gene A1 da alfa amilase foi isolado de uma biblioteca genômica em lambda EMBL3, feita com DNA do díptero primitivo *Anopheles merus* (Díptera, Nematocera, Culicoidea). Ele foi parcialmente seqüenciado, caracterizado pelo padrão da clivagem das enzimas restritivas e clonado no plasmídeo pIBI24 por Pernasetti (1991). No presente trabalho relata-se sua expressão em: bactéria (*Escherichia coli* AD494), células de inseto (*Spodoptera frugiperda*) e em levedura (*Pichia pastoris*), tendo-se observado que somente nas células de *Spodoptera frugiperda* a enzima é expressa com atividade.

A expressão extracelular do gene A1 foi ensaiada em *E.coli* AD494 usando o vetor pRSETc. Para este fim a seqüência do gene contendo seu próprio peptídeo sinal, foi inserida em fase de leitura ("frame") nesse vetor. A expressão sem peptídeo sinal foi executada usando o vetor pAE2, uma construção derivada do pRSETc. Numa outra construção, o gene A1 foi inserido em fase de leitura após a seqüência do promotor e do peptídeo sinal do gene A2 (alfa amilase de *Bacillus stearothermophilus*) utilizando-se o vetor pIBI24-Bst. As células de *E.coli* AD494 transformadas com estas construções expressaram a enzima sem atividade. A amilase A1 não foi secretada nem com seu peptídeo sinal nem com o da amilase A2.

A expressão do gene A1 em levedura (*Pichia pastoris*) foi feita usando o vetor pPic9, que permite a expressão tanto intracelular quanto a secreção da proteína. O gene foi amplificado por PCR usando "primers forward" com o intuito de obter o gene com ou sem peptídeo sinal. O gene contendo o peptídeo sinal foi construído com diferentes seqüências tipo Kozak precedendo o códon ATG. Para a expressão extracelular usou-se o peptídeo sinal do fator alfa do pPic9. Os resultados mostraram que a enzima é expressa mas que permanece dentro da célula sem atividade.

As mesmas construções do gene A1 feitas para *Pichia* foram inseridas em Baculovírus para transfectar células de *Spodoptera frugiperda*. Neste sistema a amilase foi expressa com atividade principalmente no sobrenadante das culturas transformadas com construções usando o gene contendo o seu próprio peptídeo sinal assim com o peptídeo sinal da amilase de *Zabrotes subfasciatus*.

O gene da alfa amilase de *Bacillus stearothermophilus* foi expresso no sistema Baculovírus-*Spodoptera* e na levedura *Pichia*, usando o gene contendo o peptídeo sinal da amilase de *Z. subfasciatus*. A proteína foi secretada e tinha atividade em ambos os sistemas

SUMMARY

The alpha amylase A1 gene was isolated from a genomic library of lambda EMBL3 made with DNA from the primitive Diptera *Anopheles merus* (Diptera, Nematocera, Cuculicoidea). This gene was partially sequenced, characterized by standard restriction enzyme cleavage, and cloned into the pIBI24 plasmid by Pernasetti (1991). Here we present the expression of this gene in: bacteria (*Escherichia coli* AD494), insect cell (*Spodoptera frugiperda*) and yeast (*Pichia pastoris*). It was shown that only in *Spodoptera frugiperda* cells the protein display enzymatic activity.

The presence of the A1 product in the extracellular culture media was tested in *Escherichia coli* AD494 using the vector pRSETc. To this end, the gene sequence containing its own signal peptide was inserted in frame into the vector. Expression without a signal peptide was conducted using the pAE2 vector, a construct derived from pRSETc. In another construct, the A1 gene was inserted in frame after the promoter sequence and the signal peptide of the A2 gene (alpha amylase *Bacillus stearothermophilus*) using the pIBI24-Bst vector. Although the *E.coli* AD494 cells transformed with these constructs expressed the enzyme, no enzyme activity was detected. A1 was not secreted, either with its own signal peptide or with that of amylase A2.

Expression of the A1 gene in yeast (*Pichia pastoris*) was conducted using the pPic9 vector, which allows intracellular expression or secretion of this protein. The gene was amplified by PCR with forward primers, so as to amplify the gene sequence with or without the signal peptide. The gene containing the signal peptide was constructed with different Kozak sequences preceding the ATG codon. For extracellular expression, the signal peptide of the pPic9 alpha factor was used. The results showed that the enzyme is expressed, but remained within the cell and do not display activity.

The same constructs of the A1 gene made for *P. pastoris* were inserted in Baculovirus to infect *Spodoptera frugiperda* cells. In this system, the amylase was successfully expressed and display enzymatic activity, mainly in the extracellular supernatant, using constructs of the gene with own signal peptide or with the signal peptide for amylase of *Zabrotes subfasciatus*.

The gene A2 was expressed in the Baculovirus/*Spodoptera* system and the yeast *P. pastoris* using constructs containing the signal peptide of alpha amylase of *Z. subfasciatus*, the protein was secreted with activity.

Abreviaturas

Bd	bacmídeo
BMGY	meio biotina, mínimo, glicerol e extrato de levedura
BSA	albumina sérica bovina
Bv	baculovírus
ddNTP	5'-trifosfato de 2',3'-dideoxiribonucleosídeo.
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	5'-trifosfato de 2'-desoxirribonucléico
DO ₆₀₀	absorbância a 600 nm
EDTA	etilenodiaminotetra-acetato de sódio
IPTG	isopropiltio beta D galactopiranosídeo
Kb	kilobases
LB	meio de cultura Luria-Bertani
MD	meio mínimo dextrose
MM	meio mínimo metanol
MMA	meio mínimo metanol com amido
MOI	fator de multiplicidade de infecção do vírus
mRNA	RNA mensageiro
nm	nanômetros
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PM	peso molecular
RNA	ácido ribonucléico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFM	meio para cultura de células de inseto
Tris	tris(hidroximetil) amino metano
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil beta D galactopiranosídeo
YPD	meio com extrato de levedura, peptona e dextrose

ÍNDICE DE TEXTO

1	INTRODUÇÃO	1
2	MATERIAIS E MÉTODOS	8
2.1	Análise do gene da α -amilase de <i>Anopheles merus</i>	8
2.2	Clonagem e expressão da α -amilase de <i>Anopheles merus</i> em <i>E.coli</i>	10
2.2.1	Clonagem e expressão da α -amilase contendo o peptídeo sinal	10
2.2.1.1	Lise de <i>E.coli</i> e ensaios de atividade de α -amilase	14
2.2.2	Clonagem e expressão da α -amilase de <i>Anopheles merus</i> sem o peptídeo sinal	15
2.2.3	Clonagem e expressão da α -amilase de <i>Anopheles merus</i> ligada ao peptídeo sinal da α -amilase de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	18
2.2.4	Determinação da concentração de proteínas	27
2.3	Clonagem e expressão da α -amilase de <i>Anopheles merus</i> no sistema Baculovírus- <i>Spodoptera frugiperda</i>	27
2.3.1	Construções de BV, P, Y, KLG, A1SP, KA1, ZA1, Z1, A2 ^P _Z e K1A2	30
2.3.2	Transfecção de células Sf9 com bacmídeos contendo o gene de α -amilase de <i>Anopheles merus</i>	35
2.3.3	Colheita e armazenagem do baculovírus recombinante	35
2.3.4	Amplificação do baculovírus recombinante	35
2.3.5	Produção da α -amilase de <i>Anopheles merus</i> em células Sf9 infectadas com baculovírus recombinante	35
2.3.6	Deteção de atividade amilásica proveniente de células Sf9 infectadas com baculovírus recombinante	37
2.3.7	Análise dos produtos de hidrólise do amido pela α -amilase produzida em células Sf9 através de cromatografia de açúcares redutores	38
2.3.8	Deteção da atividade amilásica através de PAGE nativo-Amido azul	38
2.3.9	SDS-PAGE e western-blot	39
2.4	Clonagem e expressão da α -amilase de <i>Anopheles merus</i> em <i>Pichia pastoris</i>	39
3	RESULTADOS	47
3.1	Análise da sequência A1	47
3.2	Expressão em <i>Escherichia coli</i>	56
3.2.1	Construção do vetor pRSETc-A1	56
3.2.2	Construção do vetor pAE2-A1SP	56
3.2.3	Construção do vetor pIBI24-Bst-A1SP	56
3.2.4	Deteção de atividade amilásica	56
3.2.5	Análise SDS-PAGE e western-blot	62
3.3	Expressão no sistema Baculovírus- <i>Spodoptera</i>	67
3.3.1	Construção dos bacmídeos recombinantes	67
3.3.2	Infecção de células Sf9	67
3.3.3	Deteção de atividade amilásica nos sobrenadantes e sedimentos celulares de células Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes	80
3.3.4	Cromatografia ascendente em papel	80
3.3.5	Deteção em PAGE não denaturante de atividade amilásica	87
3.3.6	Análise em SDS-PAGE e western blot	87
3.4	Expressão em <i>Pichia pastoris</i>	94
3.4.1	Construção dos vetores	94
3.4.2	Preparação dos vetores recombinantes e transformação de células	

		vii
	competentes de <i>Pichia pastoris</i>	96
3.4.3	PCR de colônias de <i>Pichia pastoris</i> transformadas com os vetores recombinantes	96
3.4.4	Detecção de atividade amilásica	118
3.4.5	Teste de amostras de sobrenadante e sedimento celular de <i>Pichia pastoris</i> tendo integrado os genes BV, P, Y, KLG, A1SP, KA1, ZA1, A2 ^P _Z , e K1A2 em seu genoma	118
3.4.6	SDS-PAGE e western-blot com amostras de sedimento celular de culturas de <i>Pichia pastoris</i> contendo os BV, P, Y, KLG, A1SP, KA1, ZA1, A2 ^P _Z , e K1A2	118
4	DISCUSSÃO	124
5	CONCLUSÕES	138
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
7	CURRICULUM VITAE	150

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	7
Tabela 2	33
Tabela 3	33
Tabela 4	48
Tabela 5	49
Tabela 6	49
Tabela 7	50
Tabela 8	50
Tabela 9	50
Tabela 10	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	9
Figura 2	11
Figura 3	16
Figura 4	20
Figura 5	22
Figura 6	41
Figura 7	53
Figura 8	55
Figura 9	57
Figura 10	57
Figura 11	58
Figura 12	59
Figura 13	60
Figura 14	61
Figura 15	63
Figura 16	64
Figura 17	65
Figura 18	66
Figura 19	68
Figura 20	69
Figura 21	70
Figura 22	71

Figura 23	72
Figura 24	73
Figura 25	76
Figura 26	77
Figura 27	81
Figura 28	82
Figura 29	83
Figura 30	83
Figura 31	84
Figura 32	85
Figura 33	86
Figura 34	88
Figura 35	89
Figura 36	90
Figura 37	91
Figura 38	92
Figura 39	93
Figura 40	95
Figura 41	97
Figura 42	100
Figura 43	101
Figura 44	102
Figura 45	104
Figura 46	105
Figura 47	106
Figura 48	107
Figura 49	108
Figura 50	110
Figura 51	111
Figura 52	112
Figura 53	113
Figura 54	113
Figura 55	114
Figura 56	114
Figura 57	115
Figura 58	116
Figura 59	116
Figura 60	117
Figura 61	117
Figura 62	120
Figura 63	121
Figura 64	122
Figura 65	123

1. INTRODUÇÃO

As alfa amilases (EC 3.2.1.1) são enzimas amplamente distribuídas em animais, plantas e microrganismos. Elas hidrolisam as ligações internas glicosídicas α -1,4 de modo aleatório do amido, glicogênio e oligossacarídeos (Steup 1988), já as β -amilases (EC 3.2.1.2) e as glicoamilases (EC 3.2.1.1) atacam a ponta não redutora removendo sucessivas unidades de maltose e glicose respectivamente. As α -amilases foram agrupadas. A comparação de seqüências de aminoácidos das enzimas glucosidases e transglicosilases há permitido obter um esquema de classificação destas enzimas baseado na estrutura mas que na especificidade. As amilases há sido agrupadas em mais de 80 famílias. As α -amilases constituem a família 13 (Henrissat & Bairoch 1996).

O substrato, para essas enzimas, o amido, é um dos polímeros mais abundantes sobre na natureza. É uma fonte importante de energia para animais, plantas superiores, fungos e especialmente microrganismos. Apresenta uma estrutura bastante complexa (α -D glicoses unidas por ligações α 1,4 com pontos de ramificação α 1,6) e é metabolizado por um grupo de enzimas, comumente chamadas hidrolases de amido. As três amilases, α -amilase, β -amilase e glicoamilase são as enzimas melhor conhecidas que degradam o amido. Apesar de que suas funções estão estreitamente relacionadas, estas três enzimas são estruturalmente diferentes e provavelmente evoluíram separadamente (Janecek 1997).

O amido é composto por duas frações: amilose e amilopectina. A amilose é formada por cadeias lineares de glicose unidas por ligações α 1,4, enquanto a amilopectina apresenta ramificações da cadeia com ligações α 1,6. As α -amilases usam o mecanismo de retenção pelo qual o grupo hidroxila do produto resultante retém a configuração alfa (French 1975, Janecek 1997). Se os produtos finais da hidrólise do amido são principalmente glicose e maltose com poucos oligossacarídeos a α -amilase é dita sacarificante; se os principais produtos são oligossacarídeos e pouca glicose ou maltose a enzima é dita liqueficante (Pazur & Okada 1966; Robyt & French 1967).

Dependendo da origem, as α -amilases mostram uma ampla variedade de parâmetros cinéticos, pH ótimo e especificidade pelo substrato (Akazawa *et al.*, 1988; Knutson 1993; Bertoft *et al.*, 1984). As bases estruturais para esta variedade ainda não foram estabelecidas, mas elas constituem um foco de interesse em

investigação. Por exemplo, a estrutura dos subsítios, inferida a partir de dados cinéticos, dá idéia das diferenças nas características das α -amilases que devem produzir diferentes produtos como resultado da ligação do substrato ao sítio catalítico. (Matsui *et al.*, 1991; Ajandouz *et al.*, 1992).

Em geral as α -amilases têm uma identidade de aproximadamente 10%. Entretanto, algumas seqüências consenso já foram estabelecidas depois de comparar as seqüências de aminoácidos de α -amilases de microrganismos, animais e plantas. Foram estabelecidas quatro regiões conservadas (Nakajima *et al.*, 1986).. O esclarecimento do papel desempenhado por cada resíduo em regiões conservadas foi determinado tanto experimentalmente, por cristalografia de raios X e mutagênese sítio dirigida (Holm *et al.*, 1990; Vihinen *et al.*, 1990; Klein *et al.*, 1992; Nagashima *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1994; Mathupala *et al.*, 1993; Podkovyrov *et al.*, 1993; Sogard *et al.*, 1993; Sin *et al.*, 1994; Takase 1994; Takata *et al.*, 1994; Penninga *et al.*, 1995; Kuriki *et al.*, 1996; McCarter & Withers 1996; Oyama *et al.*, 1996), quanto teoricamente, através da modelagem molecular utilizando seqüências conhecidas (Svenson 1988; Kuriki & Imanaka 1989; MacGregor & Svenson 1989; Watanabe *et al.*, 1990; Jespersen *et al.*, 1993; Janse *et al.*, 1993; Braun *et al.*, 1996).

Estruturalmente a α -amilase pode ser dividida em três domínios A, B e C. O domínio A compreende o barril $(\alpha/\beta)_8$ de 8 folhas betas paralelas rodeadas por 8 alfa -hélices. Neste domínio os laços que ligam uma folha beta com uma alfa hélice contem aminoácidos que estão envolvidos na catálise. Aqui se encontra o sitio ativo da enzima formando uma fenda donde ingressa o substrato. Esta fenda compreende vários subsítios. O domínio B é uma seqüência de aminoácidos inserida entre as regiões α_3 e β_3 , é característico das α -amilases (Machius *et al.*, 1995) e pouco é conhecido sobre a sua função nas α -amilases (Janecek 1997). O domínio C é contiguo ao barril $(\alpha/\beta)_8$ contem folhas beta e parece que estabiliza o domínio catalítico (domínio A)

A comparação da estrutura terciária de três α -amilases diferentes: amilase de *Aspergillus* (Matsüura *et al.*, 1984), amilase de pâncreas de porco (Buisson *et al.*, 1987) e amilase de cevada (isoenzima AMY2, Kadziola *et al.*, 1994) mostrou que a estrutura protéica básica das α -amilases é conservada e classificada como um barril $(\beta/\alpha)_8$ (Jespersen *et al.*, 1993). Nesta categoria, estão incluídas enzimas como enolase, triose fosfato isomerase e piruvato quinase. Esta

similaridade indicaria que estas enzimas evoluíram de um mesmo gene ancestral por acumulação de mutações que não afetaram os aminoácidos envolvidos no sítio ativo e nos sítios para a ligação do substrato, cálcio e cloro (Farber & Petsko 1990). Pequenas mudanças na estrutura tridimensional poderiam ser as determinantes da variabilidade na atividade enzimática (Terashima *et al.*, 1996).

Em insetos somente α -amilases foram encontradas. Estas enzimas têm sido relativamente bem estudadas e várias já foram purificadas (Terra & Ferreira 1994). As amilases de insetos são usualmente ativadas por cloreto e dependem da presença de um íon cálcio para a estabilização da estrutura terciária (Terra & Ferreira 1994). Contudo, as α -amilases de Lepidóptera, por apresentar pHs ótimos bastante alcalinos, parecem não ligar o íon cloreto (Terra & Ferreira 1994). Os insetos utilizam extensivamente α -amilase e proteases no estágio larval e essas enzimas são muito importantes para sua sobrevivência. Isso faz com que essas enzimas sejam muito estudadas (Terra & Ferreira 1994). No estágio adulto, a importância da α -amilase para a sobrevivência do indivíduo não é tão clara, sobretudo quando se trata de insetos hematófagos que utilizam alimento no qual a capacidade $\alpha(1,4)$ hidrolítica pode ser dispensável. A hematofagia nos insetos que apresentam essas enzimas é aparentemente facultativa, o que significa que na ausência de fontes apropriadas eles devem utilizar amido. Qual seria então a relação existente entre a presença de α -amilases e a hematofagia ou, em última instância, entre α -amilases e a malária? Os primeiros mamíferos apareceram no mesozóico há aproximadamente 225 eons. Já os dípteros são anteriores. Por qual motivo esses insetos se tornaram hematófagos? Isto teria ocorrido simplesmente devido ao aparecimento de uma fonte alternativa (Ribeiro *et al.*, 2000). Imagina-se o que pode ter ocorrido com o ancestral dos culicídeos hematófagos foi uma pressão seletiva para que esses passassem a ocupar um habitat no qual as fontes de amido não estivessem contaminadas com inibidores de α -amilase de inseto, como os que existem em feijão, soja e outras leguminosas. A existência de inibidores de α -amilase em plantas já é bem conhecida. As α -amilases de *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum* e *Zabrotes subfasciatus* são inibidas por arcelinas e outras lectinas relacionadas, de feijão, leguminosa essa cujas sementes são predadas por esses insetos. Pois bem, os culicídeos teriam que dispersar-se à procura de fontes de amido não contendo inibidores. Isto poderia ter levado esses insetos a se tornarem

hematófagos. O *Aedes aegypti*, um culicídeo hematófago e transmissor do agente que provoca a febre amarela, apresenta em seu genoma duas seqüências relacionadas com α -amilases. Surpreendentemente elas possuem uma igualdade anormalmente baixa, aproximadamente 46%, isto porque depois da inversão cromossômica um dos genes possui quase a metade do outro gene. A inversão é um processo de atrofia ou melhora no desempenho da enzima? (Grossman *et al.*, 1997). Mas, independentemente da dieta, hábitos alimentícios implícitos, aceita-se que insetos pertencendo à mesma ordem têm o mesmo conteúdo de enzimas digestivas. Assim, um díptero hematófago tem as mesmas enzimas que um díptero fitófago, indicando que o conteúdo de enzimas está estabelecido filogeneticamente e não depende da dieta (Terra 1990).

As respostas às estas indagações pode dar pistas sobre os hábitos alimentares dessa importante família dos dípteros. Em *Anopheles merus* não há dados disponíveis sobre outros genes de α -amilase além do que foi estudado neste trabalho. Aparentemente esta é a única seqüência que codifica α -amilase neste inseto.

Assim, o estudo de sua expressão, do seu produto, do número de cópias e da organização genômica e, sobretudo, no que diz respeito as regiões flangeadoras situadas a montante de 5' (que poderiam exercer controle sobre o gene adjacente) são importantes para ajudar a responder a algumas das perguntas feitas acima. A expressão da α -amilase de *Anopheles merus* (A1) permitirá além disto, determinar as propriedades estruturais, cinéticas e inibidores desta enzima.

A malária é a doença mas importante no mundo. Ela é transmitida por vetores, entre os quais se inclui o inseto *A. merus* do complexo *gambiae*. Pelo volume de casos anuais, a malária é a principal causa de doença e morte (FCIEI 1994). Segundo a organização mundial da saúde (WHO) a cada ano morrem no mundo mais de um milhão de pessoas devido a malária, a maioria delas crianças (WHO 1990). Anualmente entre 300 e 500 milhões de pessoas apresentam o quadro clínico da doença, e 82% destes ocorrem na África. Nas regiões rurais da África tropical a malária é uma das principais causas de mortalidade infantil onde mata uma de cada vinte crianças antes dos 5 anos. Em geral estima-se que os numero reais são maiores do que os oficiais. Estima-se que 40% da população mundial, isto é 2400 milhões de pessoas, está exposta ao risco de contrair a malária (FCIEI 1994).

Os únicos vetores da malária são do gênero *Anopheles*, cujas espécies estão amplamente distribuídas na superfície terrestre. Conhecem-se aproximadamente 400 espécies, das quais 85 são consideradas como vetores de malária. Os vetores da malária são classificados como vetores primários ou principais (de ampla distribuição e responsáveis pela transmissão endêmica em grandes áreas) e vetores secundários, de menor importância, transmitem a doença de forma irregular e em área limitada (Fleming 1986, Harwood 1993, Service 1993). *Anopheles merus*, inseto díptero da família Culicidae, é um membro do complexo de espécies de *Anopheles gambiae* e é considerado como vetor secundário da África oriental (Service 1993). O grupo *Anopheles gambiae* consiste em pelo menos 6 espécies. *A. merus* e *A. melas* são as únicas espécies de água salgada do complexo, com *A. melas* na África Ocidental e *A. merus* na África Oriental. *Anopheles merus* tem importância na saúde pública uma vez que, junto com *Anopheles gambiae*, é responsável pelos casos de malária (Mnzava *et al.*, 1997; Kloke 1997). *A. merus* é um vetor de malária eficiente na costa Oriental de África, particularmente no Quênia e Uganda, embora a taxa de esporozoítos dentro *A. merus* é até um certo nível menor quando comparado com *A. gambiae* s.s (Dr. Samson Awolola-Nigerian Institute of Medical Research, Lagos, Nigéria - Comunicação pessoal). As espécies de *Anopheles* do complexo *gambiae* são morfologicamente muito parecidas e sua diferenciação e detecção é feita utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) usando “primers” para uma sequência específica do DNA do ribossomo (Cornel *et al.*, 1997; van Rensburg *et al.*, 1996).

A α -amilase é uma enzima chave na cadeia alimentícia de qualquer inseto que degrada o amido com o objetivo de obter glicose. Se *Anopheles merus* produz α -amilase ativa para degradar amido pode-se estudar o efeito de inibidores para controlar ao vetor principal, *Anopheles gambiae*

Objetivos

O primeiro objetivo desta tese foi de contribuir para o aumento da base de dados sobre os genes de α -amilase de insetos, expressando a α -amilase do inseto *Anopheles merus* em bactéria (*Escherichia coli*), em levedura (*Pichia pastoris*) e no sistema Baculovírus-*Spodoptera*. As únicas α -amilases recombinantes de insetos expressas com atividade foram a de *Zabrotes subfasciatus* (Grossi de Sá & Chrispeels 1997) e *Diabrotica virgifera virgifera* (Titarenko & Chrispeels 2000). Recentemente, a α -amilase de *Zabrotes subfasciatus* foi expressa em *Pichia pastoris* (Grossi de Sá - Comunicação pessoal). Na Tabela 1 indica as α -amilases expressas em *E.coli* e *Pichia pastoris*.

O segundo objetivo desta tese foi expressar A2 foi para ampliar a base de dados sobre a expressão de esta enzima, de origem procariótica, em sistemas eucarióticos, neste caso no sistema Baculovírus-*Spodoptera* e *Pichia pastoris*.

Tabela 1. α -Amilases expressas em *E.coli* e *Pichia pastoris*

Especie	Referência
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	Koivula <i>et al.</i> (1993)
<i>Bacillus circulans</i>	Kim <i>et al.</i> (1990)
<i>Bacillus coagulans</i>	Cornelis <i>et al.</i> (1982)
<i>Bacillus sp XAL601</i>	Lee <i>et al.</i> (1994)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Silva 1989, Tsukagoshi <i>et al.</i> (1984)
<i>Bacillus subtilis</i>	Zhu & Wu (1992)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Verhasselt <i>et al.</i> (1989)
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	Melasniemi & Paloheimo (1989)
<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	Haekel & Bahl (1989), Bahl <i>et al.</i> (1991)
<i>Dictyoglomus thermophylum</i>	Horinouchi <i>et al.</i> (1988)
<i>Halomonas elongata</i>	Frilingos <i>et al.</i> (2000)
<i>Micrococcus sp</i>	Kimura & Horikoshi (1990)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Laderman <i>et al.</i> (1993); Dong <i>et al.</i> (1997)
	Jorgensen <i>et al.</i> (1997)
<i>Streptococcus bovis</i>	Clark <i>et al.</i> (1992)
<i>Streptomyces griseus</i>	Vigal <i>et al.</i> (1994)
<i>Streptomyces higroscopicus</i>	Hoshiko <i>et al.</i> (1987)
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	Bahri & Ward (1990)
<i>Thermococcus hidrotherma</i>	Leveque <i>et al.</i> (2000)
<i>Xanthomonas campestris</i>	Hu <i>et al.</i> (1992); Abe <i>et al.</i> (1996)
<i>Pichia pastoris</i>	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Paifer <i>et al.</i> (1984); Tull <i>et al.</i> (2001)
<i>Homo sapiens (pâncreas)</i>	Ryberg <i>et al.</i> (1999)
<i>Hordeum vulgare</i>	Juge <i>et al.</i> (1996)
<i>Oryza sativa</i>	Kumagai <i>et al.</i> (2000)

2.0 Materiais e Métodos

2.1. Análise do gene da α -amilase de *Anopheles merus*

O gene α -amilase de *Anopheles merus* (Amy1=A1) é um fragmento de 1.7kb obtido por Pernasetti (1991) de uma biblioteca genômica preparada por Frank H. Collins (Center for Infectious Disease, Atlanta, Geórgia, USA) em fago λ EMBL3. Um fago recombinante contendo o gene de α -amilases foi isolado com auxílio de uma sonda correspondente a um fragmento de Pvu 0.6 Kb do gene da α -amilase de *D. melanogaster* (Boer & Hickey, 1986). O DNA de *A. merus* foi clivado com a enzima de restrição *Hind* III, obtendo-se um fragmento de 1.7Kb que contém o gene Amy1. Este foi clonado no plasmídeo pIBI24 (International Biotechnologies Inc) e parcialmente seqüenciado. A comparação da seqüência obtida com outras seqüências de α -amilase permitiu a Pernasetti (1991) dizer que o fragmento correspondia ao gene codificante para a α -amilase do mosquito *A. merus*. A seqüência de um fragmento de 3.1Kb de *A. merus* contendo o gene da α -amilase foi depositada por Foster *et al.*, 1993 no Genbank (AMERAMY U01210). O fragmento AMERAMY é clivado pela enzima *Hind* III nos nucleotídeos AAGCTT 1215 e 2922, gerando dois subfragmentos ; um 1220 e outro de 1707 bp (Amy1=A1). O último contém a seqüência codificadora para a amilase, contudo sem códon de iniciação. Este é um fato importante para a expressão do gene.

Um esquema que compara a seqüência AMERAMY com A1 é mostrado na Fig.1.

Inicialmente fizemos estudos para prever as características da α -amilase deduzida a partir do gene A1. À extremidade 5' da seqüência de A1 acrescentaram-se os nucleotídeos ATGA e a seqüência obtida foi processada no programa Clone 4 (Clone Manager, 1993) para prever se a proteína seria traduzida corretamente. A seguir, o resultado da tradução foi comparado com o da α -amilase depositada por Foster *et al.*, 1993 no "Genbank"(NCBI). A similaridade da α -amilase de *Anopheles merus* com α -amilases de insetos de outras espécies foi estabelecida usando o programa Clustal W (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Stoesser *et al.*, 1997). Baseados na identidade dessa enzima com outras depositadas no "Genbank" foi possível identificar regiões conservadas e determinar o número de resíduos entre as regiões conservadas.

A sequência de nucleotídeos de AMERAMY foi processada no servidor http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html (Waibel *et al.*, 1989) para estabelecer a sequência promotora.

Para determinar a sequência do peptídeo sinal de A1, 56 aminoácidos da extremidade amino foram processados no servidor <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (Nielsen *et al.*, 1997). Também foi feita a previsão do peptídeo sinal das α -amilases de outros insetos e estabeleceu-se a similaridade entre estes peptídeos sinais com o auxílio do programa Clustal W.

A previsão de glicosilação de A1 foi feita submetendo a sequência da proteína ao servidor <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> (Hansen *et al.*, 1998).

A previsão da estrutura secundária de A1 foi feita no servidor http://www.embl-heidelberg.de/cgi/predator_serv.pl (Eisenhaber *et al.*, 1995).

2.2. Clonagem e expressão da α -amilase de *Anopheles merus* em *E. coli*

2.2.1. Clonagem e expressão da α -amilase contendo o peptídeo sinal

Neste experimento usamos o plasmídeo pRSETc e a bactéria *E. coli* AD494. Os plasmídeos pRSET são uma série de três plasmídeos (A,B,C) derivados do vetor pUC (Invitrogen Co) usados para clonar e superexpressar genes nas hospedeiras *E. coli* B121(DE3)plys, JM109(DE3)plys e AD494(DE3)plys. A presença do Promotor T7 permite altos níveis de expressão. Além disso, os genes são adicionados em sentido de leitura a uma sequência que codifica um peptídeo de fusão que consiste de um códon de iniciação ATG, uma sequência de seis histidinas (chamada "His Tag") que permite ligar a proteína a um metal usado para purificar a enzima (Fig.2), uma sequência estabilizadora, o epitopo Anti-X PressTM e a sequência de reconhecimento de clivagem da enteroquinase para remover a proteína de fusão. Os genes a serem inseridos devem conter extremidades compatíveis com os pontos de clivagem do sítio da clonagem ("molecular cloning site") (pRSET Manual da Invitrogen Co).

A inserção do gene Amy1 no vetor pRSET foi simulada no programa Clone 4. O gene A1, apresentando extremidades *Hind* III, insere-se em sentido de leitura (em "frame") no plasmídeo pRSETc (a estratégia geral é mostrada no Esquema 1): Os produtos da digestão ^{Hind} III pRSETc ^{Hind} III (0,25 μ g) + ^{Hind} III A1 ^{Hind} III (0,5 μ g) foram ligados com a enzima T4-DNA ligase. O produto desta ligação (2 μ l) foi usado para

Esquema 1. Expressão de A1 em *E.coli*

Vetores : pRSETc (Invitrogen)

pAE2 (Biotecnologia-Butantã)

Bacteria : *E.coli* AD494 ▲ *ara⁻* *leu7697* ▲ *lacX74*

▲ *malF3* ▲ *phoAPvull* *phoR*

F[lacI⁺(lacI)pro] *trxB::Kan(DE3)* *pLysS*

pRSETc^{Hind III} + A1^{Hind III} = pRSETc-A1

Transformação de *E.coli* DH5 alfa,
plaqueamento em agar LB+Amp

Detecção rápida de pRSETc-A1

Confirmação da orientação do inserto :
Clivagem com *Nhe I*, Seqüenciamento

Transformação de *E.coli* AD494
Plaqueamento em ágar LBA-amido azul

- Detecção de atividade amilase - halo Incolor
- Teste DNS, PAGE-SDS : Sobrenadante -Pellets
- Cromatografia para açúcares redutores - Prata
- Western-Blot

transformar células competentes de *E. coli* HB101 (Mandel & Higa 1970). Uma hora após a transformação, as células foram plaqueadas em agar LB-Ampicilina (100 µg/ml) e incubadas a 37°C. Depois de 16 horas, tomaram-se ao acaso colônias para detectar o plasmídeo pRSETc contendo o inserto A1 (Beuken *et al.*, 1998). Usou-se como controle pRSETc. Os plasmídeos que mostraram uma banda maior que o controle foram selecionados. A seguir os plasmídeos selecionados foram clivados com a enzima *Nhe* I para conhecer a orientação do inserto com relação ao promotor T7. Plasmídeos apresentando bandas de 137 e 4518 pb seriam os que apresentam o inserto em orientação correta. Para confirmar a orientação fez-se o seqüenciamento do plasmídeo pRSETc-A1 usando-se o "primer" T7 (na orientação "forward")

Para o seqüenciamento do DNA utilizou-se o método de terminação de cadeia BIG-DYE (Sanger *et al.*, 1977) com dideoxinucleotídeos num seqüenciador automático ABI PRISM (Perkin Elmer) usando um "Ready Reaction Kit" (Perkin-Elmer). Um total de 400 ng do DNA plasmidial foram purificados com a resina SephaglassTM da Pharmacia e usados como molde na reação de seqüenciamento feita com Taq DNA polimerase, dNTPs e ddNTPs ABI Prism Big Dye Terminator. Estes determinam o fim da elongação das cadeias de DNA sintetizadas pela Taq DNA polimerase e ao mesmo tempo conferem uma marcação fluorescente. Depois dos ciclos térmicos, os produtos de amplificação são separados em gel de seqüenciamento de DNA de 36 cm de comprimento (4.25% acril:bis-acrilamida, na proporção de 19:1, 1x TBE e 7M Uréia) os quais foram montados segundo especificação do fabricante do sistema ABI PRISM (Perkin-Elmer). O aparelho é ligado a um sistema de detecção que consiste de uma fonte de laser e detector de fluorescência, situados na parte inferior do gel de seqüenciamento. Cada ddNTP ("BIG-DYE") emite uma fluorescência específica que é captada pelo detector e este, por sua vez, envia a informação a um computador que automaticamente registra a posição do nucleotídeo no eletroforetograma. A corrida teve uma duração média de 7 horas.

Células competentes de *E. coli* AD494 (DE3) *plys* foram transformadas (Mandel & Higa 1970) com a construção pRSETc-A1 (com A1 em "frame") e as células transformadas espalhadas em três placas de agar LB-Ampicilina (100 µg/ml)-Amido azul (2%). As colônias que expressaram a amilase ativa foram detectadas por gerar

um halo incolor limitado por um círculo azul que corresponde à maior difusão dos produtos de hidrólise (Silva 1989).

Para descartar a possibilidade de que a amilase não estivesse sendo secretada pela bactéria, semeou-se *E.coli* AD494(DE3)p_{lys} contendo o plasmídeo pRSETc-A1, em 5ml de meio LB-Ampicilina (100 µg/ml). Incubou-se a 37°C/250 rpm até DO₆₀₀ = 0,5, quando 2 ml da cultura foram recuperados. Destes, 1 ml foi centrifugado a 10000xg durante 1 min à 4°C e ressuspensão em 100 µl de tampão de amostra para SDS-PAGE (5x concentrado) e estocado a 4°C. O volume restante foi centrifugado nas mesmas condições e ressuspensão em 100 µl de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0 contendo 1mM CaCl₂ + 20 mM NaCl + 1 mM PMSF para avaliar a atividade de amilase. Este foi considerado o controle não induzido. Do meio de cultura restante tomaram-se 2 ml e acrescentaram-se 2 µl de 1 M de IPTG e incubou-se por 4 horas/37°C/250 rpm. A seguir, 1 ml foi recuperado, centrifugado, tratado para PAGE, como acima, ressuspensão em 100 µl de tampão de amostra para SDS-PAGE(5x) e guardado a 4°C. O volume restante foi centrifugado e ressuspensão em 100 µl de tampão fosfato de potássio para avaliar a atividade de amilase, como já descrito.

As amostras ressuspensas em 100µl de tampão de amostra para SDS-PAGE, controle não induzido (sem IPTG) e aquela tratada com IPTG foram fervidas por 10 min, centrifugadas a 13000rpm por 10 min e aplicadas (30 µl) em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%). A eletroforese foi feita em duplicata. Terminada a corrida um gel foi corado com coomassie blue e a seguir com prata e o outro preparado para western-blot. As eletroforeses e os processos de revelação foram executados segundo Sambrook *et al.*,1989 e o Manual do QIAGEN (QIA expressionist, 1997). Para a execução do western-blot seguiram-se as indicações do fabricante do ECL Kit (PHARMACIA Sc). Nessa técnica foi usado o anticorpo anti-amylase (diluído 10000 vezes) de *Zabrotes subfasciatus* cedido gentilmente pela Prof^a.Fátima Grossi de Sá (CENARGEN-EMBRAPA Brasília, DF).

2.2.1.1 Lise de *E.coli* e ensaios de atividade de α-amilase

As bactérias ressuspensas em tampão fosfato foram lisadas usando pérolas de vidro (previamente lavadas com HCl 1N e esterilizadas na autoclave), segundo Hoffman & Winston (1987) com as seguintes modificações: agitar em vortex em um

total de 5 min com pulsos de 1 minuto após os quais as amostras eram colocadas em gelo e centrifugadas a 13000xg durante 20 min à 4°C. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um tubo eppendorf novo estéril. A atividade amilásica foi avaliada pela formação de açúcares redutores: 20µl do sobrenadante foram acrescentados a 480 µl de uma solução de amido 0,5% e incubados a 37°C por 12 horas. Como controle utilizou-se o sobrenadante de uma cultura de *E.coli* HB101 contendo o plasmídeo pIBI24-A2 que expressa a α -amilase de *Bacillus stearothermophilus*. A formação de açúcares redutores foi detectada misturando 50 µl da reação com 500 µl do reagente DNS (Dinitro salicilato em meio alcalino), segundo Kawata *et al.*,1998. O hidrolisado restante foi seco na estufa a 60°C, ressuspenso com 25 µl de água milli-Q e guardado para a análise cromatográfica dos produtos de hidrólise. A reação DNS é positiva quando a solução ensaiada torna-se de cor marrom. Usou-se como padrão positivo uma solução de maltose (10 µg/µl) e como padrão negativo água milli-Q. A atividade amilásica também foi avaliada usando como substrato uma solução de malto-oligossacarídeos 0,5% (C4-C10/SIGMA Chem Co M3639). Finalmente foi feita a cromatografia dos produtos da hidrólise do amido, segundo Trevelyan *et al.*(1950), Robyt & French (1963) e Silva (1989). A fase móvel foi uma mistura de isopropanol:ac. acético:água (7:1:2).

2.2.2. Clonagem e expressão da amilase de *A.merus* sem o peptídeo sinal

Outro ensaio para expressar A1 sem o peptídeo sinal, consistiu em inserir o gene no plasmídeo pAE2. O plasmídeo pAE2 foi cedido gentilmente pelo Prof. Paulo Lee Ho (Instituto Butantã). Este vetor é o pRSET modificado para deixar no pRSET somente a cauda de polihistidina e o MCS como é mostrado na Fig.3:

O gene A1 sem peptídeo sinal foi obtido por PCR empregando os seguintes "primers"

"Forward"

A1SP *Xho* I *Bam*HI A1 sem peptideo sinal →

5'TATCCG CTCGAG GGATCC [CACGATCCCCACTTTGTCCGCGGC-3'

"Reverse"

A1-R *Xho* I *Hind* III *Eco*R I A1

5'CCG CTCGAG AAGCTT GAATTC[TCACACCCGGCCATCAGACCTCATTCG-3'

pAE2

Promotor T7

-----AATACGACTCACTATA
 GGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG
RBS

Cauda 6X-His **XhoI** **BamH I** **Xho I** **Bgl II** **PstI**

ATATACATATGCATCATCATCATCATCTCTCGAGGGATCCGACCTCGAGATCTG
L E G S D L E I

BstBI

PvuII **KpnI** **NcoI** **EcoR I** **Hind III**

CAGCTGGTACCATGGAATTCGAAGCTTGATCCGGCTGCTAACAAA-----
 C S W T H G I R S L I R L L T

pA2-A1SP

Promotor T7

-----AATACGACTCACTATA
 GGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG
RBS

Cauda 6X-His **BamH I** **A1SP**

ATATACATATGCATCATCATCATCATCTCTCGAGGGATCCACGATCCCCACT
L E G S H D P H

TTGTCCGCGGCCACAGCACG-----
 F V R G H S T

Fig.3 Clonagem de A1SP em pAE2

O plasmídeo pAE2 foi clivado com as enzimas *BamH I*(B) e *EcoR I*(E) gerando-se o plasmídeo linear pAE2^{B/E}. O gene A1SP clonado no plasmídeo pET32 foi clivado com as mesmas enzimas, A1SP^{B/E}. A ligação de pAE2^{B/E} com A1SP^{B/E} originou o plasmídeo recombinante pAE2-A1SP. Este plasmídeo tem o promotor T7(o qual é induzido com IPTG) e a sequência RBS que permite a ligação do ribossomo ao mRNA. Após do ATG de iniciação aparece uma cauda de 6X-His e, em seguida, uma sequência de sítios de clivagem para inserir em sentido de leitura o gene de interesse. Em nosso caso foi inserido o gene da α -amilase de *Anopheles merus* sem seu peptídeo sinal (A1SP).

A PCR foi executada segundo as especificações do fabricante (GIBCO-BRL). A mistura da reação para um volume de 200 μ l foi o seguinte :

Tampão Tris-HCl	20mM
KCl	50mM
dNTP (mistura)	0.2 mM cada um
MgCl ₂	1.5mM
Primer A1SP	0.5 μ M
Primer A1-R	0.5 μ M
pIBI24-Amy1	0.1 μ g
Taq DNA Pol	1 μ l (= 5 unidades)
agua milli-Q	p/volumen final 200 μ l

Os tubos foram levados a um termociclador modelo PTC-100, MJ Research, Inc. para a amplificação como se indica :

Desnaturação	95°C 45 segs	} 28 ciclos
Alinhamento	55°C 30 segs	
Extensão	72°C 2 min	
Extensão final	72°C 8 min	

Os T_m dos primers são :

A1SP-F	70,20°C
A1-R	67,70°C

O produto de PCR (chamado A1SP, 2 μ l) foi avaliado em gel de agarose 0,8% donde a banda de ~1500 pb deveria corresponder ao gene A1 sem peptídeo sinal. A seguir, o produto da reação foi precipitado com 0.7 vol. de isopropanol e 200mM NaCl e lavado (2X) com etanol 80% gelado. O precipitado seco foi redissolvido em 20 μ l de água milli-Q. A quantificação a 260nm foi realizada no espectrofotômetro Beckman DU-3400 (Sambrook *et al.*, 1989) e mostrou que a amplificação forneceu 6,3 μ g de DNA. Para inserir o fragmento no plasmídeo pAE2, 0,5 μ g do produto de PCR e 0,25 μ g do plasmídeo pAE2 foram clivados, num volume de 10 μ l, com as enzimas *Bam*H I(B) e *Eco*R I(E) por 12 horas. Os produtos da clivagem foram separados num gel de agarose 0,8% e as bandas correspondentes ao plasmídeo pAE2^{B/E} e ao gene A1 foram recuperadas do gel usando SephaglassTM da Pharmacia. Esses produtos foram ligados usando T4-DNA ligase, segundo as indicações do fabricante (PROMEGA). O produto da ligação foi usado para transformar células de *E.coli* DH5 α (40 μ l) por eletroporação nas seguintes condições (Trevors *et al.*, 1992): as cubetas (2mm) contendo as bactérias e 2 μ l da

Esquema 2. Expressão de A1 sem peptídeo sinal

Fig.4 Fragmento Bst : Promotor e Peptídeo Sinal da α -amilase de *Bacillus stearothermophilus*

A α -amilase de *Bacillus stearothermophilus* (A2) é uma enzima que foi expressa em *E.coli* por Silva (1989). A ligação em sentido de leitura de uma proteína ao peptídeo sinal de A2 permite a secreção da proteína para o meio extracelular. Usando os "primers" Bst-F e Bst-R amplificou-se o fragmento Bst que contém o promotor, a sequência RBS, o códon de iniciação (GTG) e o peptídeo sinal de A2. Este fragmento foi inserido no plasmídeo pIBI-24 (ver materiais e métodos e Fig.5) para obter o plasmídeo recombinante pIBI-24-Bst. O sítio de clivagem do peptídeo sinal (assinalado pela seta) foi obtido depois de submeter 50 aminoácidos da extremidade amino terminal de A2 ao servidor www.cbs.dtu.dk/service/signal P/(Nielsen *et al.*, 1997)

Extensão final 72°C 8 min

A T_m dos Primers são :

Bst-F 51,23°C

Bst-R 68,27°C

O produto do PCR Bst-F/R (265bp) foi avaliado, precipitado e redissolvido como já descrito.

Uma micrograma do fragmento Bst-F/R e do plasmídeo pBI24 (0,25 ug) foram digeridos separadamente, em um volume de 10 µl. Primeiramente o fragmento foi digerido com a enzima *Sac* I que lineariza pBI24 e, em seguida com a enzima *Eco*R I. Após a clivagem os fragmentos foram separados por eletroforese, recuperados como já descrito e ligados num volume de reação de 20 µl. Esta mistura de ligação foi usada para transformar por eletroporação células competentes de *E.coli* DH5α. As bactérias foram espalhadas em placas de agar LB ampicilina (100 µg/ml) contendo X-Gal (20mg/ml) e IPTG(200mg/ml). As colônias contendo o plasmídeo recombinante pBI24-Bst foram detectadas pela sua coloração branca e por PCR. Para confirmar se estas bactérias continham o plasmídeo recombinante, uma colônia branca foi tomada ao acaso e usada para extração de plasmídeo, o qual foi digerido com as enzimas *Sac* I e *Eco*R I. O padrão de eletroforese esperado mostra um fragmento de 2878bp correspondente ao pBI24 e um de 255bp correspondente ao inserto Bst F/R. Para inserir o gene A1 sem peptídeo sinal no vetor pBI24-Bst o vetor foi clivado com as enzimas *Xho* I(X) e *Hind* III(H), onde o produto obtido foi chamado de pBI24-Bst^{X/H}. A seguir, 1 µg do gene A1 sem peptídeo sinal (A1SP) obtido por PCR, foi digerido com a enzima *Hind* III, seguido pela digestão com *Xho* I. Após a clivagem, o produto (A1SP^{X/H}) foi separado por eletroforese e a banda de 1545bp recuperada. Os fragmentos pBI24-Bst^{X/H} e A1SP^{X/H} foram ligados com a enzima T4 DNA ligase como descrito, obtendo-se o plasmídeo pBI24-Bst-A1SP que tem a sequência da α-amilase de *A. merus* com o promotor e peptídeo sinal da amilase de *B. stearothermophilus*. Células competentes de *E.coli* DH5 transformadas por eletroporação com o produto desta ligação foram espalhadas em placas de agar LB contendo amido azul e ampicilina. Estas foram incubadas a 37°C/16 H. As colônias capazes de secretar amilase foram detectadas pelo halo incolor formado ao seu redor. Para comprovar

Fig.5A Construção do Plasmídeo pIBI24-Bst-A1

O plasmídeo pIBI24 foi clivado com as enzimas *EcoR* I e *Sac* I para gerar pIBI24^{E/S}

Fig.5B Construção do Plasmídeo pBI24-Bst-A1

O fragmento Bst (contendo o promotor e peptídeo sinal do gene da amilase de *Bacillus stearthermophilus*), obtido por PCR, foi clivado com as enzimas *EcoR* I e *Sac* I e ligado ao plasmídeo pBI24^{E/S} para obter pBI24-Bst

Fig.5C Construção do Plasmídeo pIBI24-Bst-A1

O pIBI24-Bst foi clivado com as enzimas *Xho* I - *Hind* III para gerar pIBI24-Bst^{X/H}. A1SP (A1 sem peptídeo sinal - obtido por PCR) foi clivado com as mesmas enzimas de restrição para gerar A1SP^{X/H} e, em seguida ligado a pIBI24-Bst^{X/H} para obter o vetor pIBI24-Bst-A1SP, que contém o gene A1 com o promotor e peptídeo sinal do gene A2 (amilase de *B. stearothermophilus*).

Esquema 3. Expressão de A1 usando o Promotor e Peptídeo Sinal da Amilase de *Bacillus stearothermophilus*

se as colônias foram transformadas com o plasmídeo pIBI24-Bst-A1SP, tomaram-se ao acaso 6 colônias para detectar por PCR qual de elas tinham o plasmídeo. Nesse PCR empregamos os “primers” Bst-F e A1R. As condições no termociclador foram as mesmas empregadas para a amplificação do fragmento Bst-F/R. Além disto, o plasmídeo pIBI24-Bst-A1SP obtido foi analisado por restrição com as enzimas *Xho* I -*Hind* III e *Eco*R I + *Xho* I + *Hind* III, a qual deve mostrar os fragmentos inseridos. A sequência teórica da construção do pIBI24-Bst-A1SP é mostrada na Fig. 5, e a estratégia geral para a construção do plasmídeo no Esquema 3 .

Para determinar se a amilase A1 é produzida com atividade, cultivou-se a colônia contendo o plasmídeo pIBI24-Bst-A1SP em 5 ml de meio LB-Ampicilina a 37°C sob agitação constante a 250 rpm durante 16 horas. A cultura foi centrifugada a 10000 xg durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi filtrado com membrana Millipore 0,22µm (MILLEX-GS), precipitado com sulfato de amônio 80% a 4°C e centrifugado a 10000xg durante 20min a 4°C. O sedimento obtido (S) foi seco à temperatura ambiente, redissolvido em 200 µl de água milli-Q e dialisado 24 horas contra 1 litro de tampão fosfato de potássio 100 mM a 4°C (trocado a cada 8 horas). O dialisado foi recuperado, centrifugado a 13000xg durante 20 min a 4°C e o sobrenadante transferido para um tubo eppendorf novo e estéril o qual foi conservado a -20°C. O sedimento bacteriano foi redissolvido com 500µl de tampão fosfato de potássio 100 mM (contendo PMSF 1 mM) e a ele, acrescentou-se o equivalente a 0,5 vol. de pérolas de vidro. A ruptura das células foi efetuada como já se descreveu e os fragmentos celulares remanescentes foram removidos por centrifugação a 13000xg durante 20 min a 4°C. O sobrenadante (P) foi estocado a -20°C. Para esclarecer se a proteína era secretada e se era ativa, analisaram-se S e P pelos métodos SDS-PAGE e western-blot. Para isto, 40µl de cada amostra eram misturados com 20 µl de tampão de amostra (3x concentrado). Desta mistura 30 µl eram aplicados a cada um de dois géis de poliacrilamida a 10%. Terminada a corrida, um gel era corado com coomassie blue e a seguir com prata e as proteínas do outro transferidas a membrana de nitrocelulose (Schleicher & Schuell 0,45 µm) para análise por western blot. Finalmente foi feito o teste de hidrólise do amido 0,5% em tubos “eppendorf” 1,5 ml com a seguinte mistura

480µl do amido + 20µl de sobrenadante (S)

480µl do amido + 20µl de sedimento bacteriano (P)

480µl do amido + 20µl de água milli-Q

Os tubos foram incubados a 37°C durante 12 horas, após as quais 50 µl de cada reação foram separados, adicionaram-se 500 µl do reagente DNS e a mistura incubada a 95°C durante 10 min. A mudança de cor para marrom indicaria presença de açúcares redutores, os produtos da atividade da amilase.

2.2.4. Determinação da concentração de proteínas.

A determinação da concentração de proteínas presente no sobrenadante ou no sedimento celular das amostras ensaiadas foi feita usando o método de Bradford (1976) ou o descrito por Smith *et al.* (1985) e modificado por Morton & Evans (1992), usando uma curva padrão de ovoalbumina. A quantidade de proteína expressa é obtida subtraindo da quantidade de proteínas calculadas para amostra contendo o vetor recombinante, a quantidade de proteínas calculadas para amostra controle (vetor sem inserto).

A determinação da concentração da proteína de uma banda no gel de poliacrilamida, corado com azul de coomassie ou prata, foi feita utilizando o "software" do "Image Master System" (Pharmacia). Primeiramente, determina-se a concentração da proteína aplicada na eletroforese por um dos métodos acima indicados, a seguir o programa do aparelho distribui essa concentração entre as bandas presentes no gel em função da intensidade das mesmas.

2.3. Clonagem e expressão da α -amilase de *A. merus* no Sistema Baculovirus - *Spodoptera frugiperda*

O vírus da polihidrose nuclear de *Autographa californica*, baculovírus, infecta diferentes insetos (Luckow 1991, O'Reilly *et al.*, 1992). Ele infecta a célula e começa a replicar-se após aproximadamente de 6 horas. Nas 20-48 horas seguintes a transcrição dos genes precoces cessa, mas os genes da polihedrina e p10 são transcritos em altos níveis. A polihedrina é essencial para a propagação do vírus quando infecta o inseto, enquanto que em cultura, a polihedrina não é necessária para a transfeção de células. No genoma do baculovírus o gene da polihedrina foi modificado geneticamente e substituindo-se a sequência codificante deixando apenas a região promotora e uma sequência "multiple cloning sites"(MCS). A

proteína a ser expressa pelo sistema baculovírus-*Spodoptera* é inserida em sentido de leitura ("frame") na região do MCS. O forte promotor da polihedrina dirige a transcrição da proteína heteróloga, sendo que esta pode constituir até 30% da proteína celular total (O'Reilly *et al.*,1992). A proteína inserida com peptídeo sinal em princípio deve ser secretada (O'Reilly *et al.*,1992). Modificações posteriores foram feitas para inserir uma cauda de seis histidinas (6X His-Tag) na proteína heteróloga para permitir sua purificação da proteína numa resina contendo níquel (Richardson 1995). A metodologia para expressão de genes no sistema Baculovírus-*Spodoptera* é mostrada no seguinte esquema (Manual Bac-toBac GIBCO,1996):

A expressão da α -amylase de *Anopheles merus* (A1) foi executada usando o sistema Bac-to-Bac da GIBCO. Um esquema da estratégia utilizada para expressar BV (A1 com seu peptídeo sinal, mas sem sequência tipo Kozak) e as demais construções está mostrada no Esquema 4. A proteína foi expressa com seu próprio peptídeo sinal (construções BV, P,Y), ou com os peptídeos sinais de amilases que já foram expressas: do inseto *Zabrotes subfasciatus* (ZA1), da bactéria *Bacillus stearothermophilus* (KA1), e da ave *Gallus gallus* (KLG) (Tabela 2). Também foi ensaiada a expressão de A1 sem peptídeo sinal (A1SP). As diferentes construções contendo o gene A1 foram clonadas no plasmídeo pFastBac1 para expressão extra

Esquema 4. Expressão de A1 no Sistema Baculovírus - *Spodoptera*

celular com exceção de A1SP foi clonada no plasmídeo pFastBac HTb para expressão intracelular. Estas construções têm diferentes seqüências de transcrição tipo Kozak precedendo o códon ATG. Um resumo é apresentado na Tabela 2.

Como controle usou-se o gene da amilase do inseto *Zabrotes subfasciatus* (Z1).

2.3.1 Construções de BV, P, Y, KLG, A1SP, KA1, ZA1, Z, A2^P_Z e K1A2

Estas construções foram obtidas por PCR, com os seguintes “primers” e moldes :

BV

BV-F*

5'-TCG GGATCC ATG AAA CTT TTA GTG CGC CTA GCA CCG-3'

A1-R**

5'- CCG CTCGAG AAGCTT GAATTC TCACACCCGGCCATCAGACCTCAT-3'

Molde*** : pIBI24-A1

P

P-F*

5'- CGC GGATCC AAACC ATGAAACTTTTA-3'

A1-R**

Molde : pIBI24-A1

Y

Y-F*

5'- CGC GGATCC AAAA ATGAAACTTTTA-3'

A1-R**

Molde*** : pIBI24-A1

KLK

KLK-F*

5'CGCGGATCCAAACCATGCAAGTCCTTCTCCTCCTCTCAGCTGTCTGGGCTTTGC
TGGGCACAGCACGATCCCCACTTTGTCCGC-3'

A1-R**

Molde*** : pIBI24-A1

A1SP

Ver Esquema 2, pg.19

KA1

KA2-F*

5'- CG GGATCC AAACC ATGCTAACGTTTCACCGCATC-3'

A1-R**

Molde*** : pIBI24-Bst-A1SP

ZA1

ZA1-F*

5'TCGGGATCCATGAAGTTAGGAGTAGTGCAGTTGATCCTCGGTTTGGCCGTGG
GGTTCACCCAGCACGATCCCCACTTTGTCCGC-3'

A1-R**

Molde*** : pIBI24-A1

Z1

Z1-F*

5'-CGC GGATCC AAACG ATGAAGTTAGGAGTAGTGC-3'

Z-R**

5'-CCG CTCGAG AAGCTTGCGGCCGCTTACAGTTTGGAAGTGAG-3'

Molde*** : PCR-Z

 $A2^P_Z$ $A2^P_Z$ -F*5'CGCGGATCCAAACCATGAAGTTAGGAGTAGTGCAGTTGATCCTCGGTTTGGC
CGTGGGGTTACCCAGCACGCCAAGGCTGCCGCACCG -3'

A2-R**

5'-CCG CTCGAG AAGCTT TCAAGGCCATGCCACC-3'

Molde*** : pIBI24-A2

K1A2

K1A2-F*

5'-CG GGATCCACC ATGCTAACGTTTCACCG-3'

A2-R**

Molde*** : pIBI24-A2

O volume final da mistura da reação de PCR, salvo especificação diferente, era de 200 μ l.

* Primers F "Forward"

** Primers R "Reverse"

*** Molde

Para ajustar as condições do termociclador tomou-se em consideração a T_m de cada "primer" que é apresentada na Tabela 3.

As misturas para os PCR de BV, P, KLG, KA1, ZA1, Z1, A2^P_Z, K1A2 foram levados ao termociclador ajustado para as seguintes condições :

Desnaturação	95°C 45 segs	} 28 ciclos
Extensão	72°C 2 min	
Alinhamento	55°C 30 segs	
Incubação final	72°C 8 min	

Para Y as condições foram as seguintes :

Desnaturação	95°C 45 seg	} 28 ciclos
Extensão	72°C 2 min	
Alinhamento	48°C 30 segs	
Extensão final	72°C 8 min	

Terminado o PCR, 2 μ l do produto eram avaliados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. O restante da mistura da reação foi precipitado e redissolvido em 20 μ l de água milli-Q como já descrito. Tomaram-se 5 μ l (~2 μ g) de cada um para tratamento com as enzimas *Bam*H I e *Hind* III num volume final de 20 μ l. As construções A2^P_Z e K1A2 foram clivadas primeiro com *Hind* III e depois com *Bam*H I diluída 1/10 durante 5 min para evitar a clivagem interna em A2 que tem um sítio *Bam*H I. Depois da clivagem os fragmentos com extremidades *Bam*H I e *Hind* III (B/H) eram separados num gel de agarose 0,8% e recuperados com a resina Sephaglass (PHARMACIA). Finalmente, cada um foi quantificado por espectrofotometria a 260nm ou por gel de agarose ou por comparação com o padrão de 1Kb (GIBCO). Paralelamente, 1 μ g do plasmídeo pFastBac1 foi clivado com as mesmas enzimas. Após a clivagem, 10 vol de água milli-Q foi acrescentado à amostra e essa precipitada com isopropanol. O precipitado obtido foi ressuspensão em 20 μ l de água milli-Q. A seguir cada um dos fragmentos recuperados foi ligado ao plasmídeo pFastBac1^{B/H}. Células competentes *E. coli* DH5 α foram transformadas com o produto da ligação por eletroporação, como descrito anteriormente.

Tabela 2. Peptídeos sinais e Sequências tipo Kozak usados para expressar A1, Z1 e A2

Construção	Peptídeo Sinal de:	Sequência tipo Kozak
BV	<i>Anopheles merus</i>	Nenhuma
P	<i>Anopheles merus</i>	AAACCATGA
Y	<i>Anopheles merus</i>	AAAAAATGA
KLK	<i>Gallus gallus</i>	AAACCATGA
KA1	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	AAACCATGA
ZA1	<i>Zabrotes subfasciatus</i>	Nenhuma
Z1	<i>Zabrotes subfasciatus</i>	Nenhuma
A2 ^P _Z	<i>Zabrotes subfasciatus</i>	AAACCATGA
K1A2	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	CCACCATGA

Tabela. 3 Sítios da Clivagem e Tm dos “Primers” F e R

“Primer”	Tamanho(bp)	Sítios de Restrição	Tm (°C)
BV-F	36	<i>BamH</i> I	62,80
P-F	26	<i>BamH</i> I	61,00
Y-F	25	<i>BamH</i> I	47,66
KLK-F	83	<i>BamH</i> I	75,97
A1SP-F	42	<i>Xho</i> I, <i>BamH</i> I	70,20
ZA1-F	84	<i>BamH</i> I	75,24
KA2-F	34	<i>BamH</i> I	61,37
Z1-F	33	<i>BamH</i> I	60,56
A2 ^P _Z -F	89	<i>BamH</i> I	77,19
K1A2-F	28	<i>BamH</i> I	59,15
A1-R	45	<i>Xho</i> I, <i>Hind</i> III, <i>EcoR</i> I	67,7
A2-R	31	<i>Xho</i> I, <i>Hind</i> III	63,17
Z-R	41	<i>Xho</i> I, <i>Hind</i> III	67,44

Imediatamente depois do pulso elétrico acrescentaram-se 200 µl de meio LB e incubou-se a bactéria a 37°C por uma hora. A seguir as células foram espalhadas em placas de agar LB Ampicilina (50µg/ml) e Gentamicina (7µg/ml) que foram incubadas a 37°C durante 16 horas. Tomaram-se ao acaso 6 a 13 colônias crescidas para detectar por PCR (Gussow & Clackson 1989) ou pelo método de detecção rápida (Beuken *et al.*, 1998) as que continham os plasmídeos recombinantes pFastBac1-BV, pFastBac1-P, pFastBac1-Y, pFastBac1-KLG, pFastBac1-KA1, pFastBac1-ZA1, pFastBac1-Z1, pFastBac1-A2PZ e pFastBac1-K1A2.

O fragmento A1SP, obtido a partir do plasmídeo pAE2-A1SP, e o plasmídeo pFastBac-HTb foram clivados com as enzimas *Bam*H I e *Hind* III. Após a clivagem, os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos foram recuperados com resina Sephaglass (PHARMACIA). Eles foram chamados A1SP^{B/H} e pFastBac-HTb^{B/H} e foram ligados com T4-DNA ligase. A transformação da bactéria com esse plasmídeo foi feita como descrito acima para as outras construções.

Os plasmídeos das colônias foram extraídos com o intuito de confirmar a presença do inserto pela clivagem com as enzimas *Bam*H I e *Hind* III. Os plasmídeos recombinantes foram usados para transformar células competentes de *E. coli* DH10 Bac que eram espalhadas em placas de agar LB contendo Kanamicina (50 µg/ml), Gentamicina (7µg/ml), Tetraciclina (10 µg/ml) e X-Gal/IPTG, para obter os bacmídeos recombinantes Bd-BV, Bd-P, Bd-Y, Bd-KLG, Bd-KA1, Bd-ZA1, Bd-Z1, Bd-A2P_Z, Bd-K1A2. A bactéria *E. coli* DH10 Bac contém o bacmídeo e o plasmídeo Helper (plasmídeo que codifica para uma transposase que transfere o gene recombinante do pFastBac1 ao bacmídeo). Colônias contendo essas construções eram reconhecidas pela cor branca e a presença do inserto verificada por PCR. Além disto, para eliminar o bacmídeo não recombinante, as colônias foram replicadas três vezes em meio LB-Kanamicina-Gentamicina-Tetraciclina X-Gal/IPTG.

Os bacmídeos recombinantes foram extraídos das bactérias pelo método de Birboim & Doly (1979) eliminando a agitação para evitar a quebra mecânica do bacmídeo. O bacmídeo controle (sem inserto) foi extraído de *E. coli* DH10 Bac.

O passo seguinte consistiu em expressar a amilase nas células de *Spodoptera frugiperda* Sf9 segundo as indicações do Kit Bac-to-Bac (GIBCO).

2.3.2. Transfecção de células Sf9 com bacmídeos contendo o gene da α -amilase de *A. merus*: foram cultivadas, em placas P35, 9×10^5 células Sf9, que estavam em fase “mid-log”, em 2 ml de meio Sf-900 II (SFM) contendo 50 U/ml de penicilina e 50 μ g/ml de estreptomicina. As placas foram incubadas a 27°C por 1 hora para permitir a adesão das células à placa. O meio foi aspirado, as células lavadas (2X) com 2 ml de SFM sem antibióticos e, a elas foi acrescentado 1 ml de SFM sem antibióticos contendo 5 μ l da preparação do bacmídeo recombinante e 6 μ l de cellfectin, um detergente que permeabiliza a célula e é fornecido com o kit. As células foram incubadas a 27°C por 5 horas. O meio foi removido, acrescentou-se 2 ml de meio SFM com antibióticos e incubou-se a 27°C por 48 -72 Horas. Como controle negativo foi usado o bacmídeo sem inserto e como controle positivo o bacmídeo Bd-Z1.

Não foi observado nenhum efeito citopático neste etapa.

2.3.3. Colheita e armazenagem do baculovírus recombinante. Coletaram-se 2 ml da cultura num tubo estéril com tampa. Esse meio foi centrifugado a 500xg durante 5 min em uma centrífuga HIMAC HITACHI. O sobrenadante contendo o baculovírus foi transferido a um tubo estéril e armazenado na geladeira a 4°C, constituindo o estoque de baculovírus ($\sim 2-4 \times 10^5$ pfu/ml)

2.3.4. Amplificação do baculovírus recombinante. Uma cultura de 1×10^6 células Sf9, crescidas durante 24 horas, em 4,5 ml de meio SFM com antibióticos, foi infectada com 10 μ l do estoque de baculovírus ($\sim 0,01$ pfu/célula) e incubada a 27°C por 48 horas. Não se observou efeito citopático.

Foi coletado 1,5 ml do meio de cultura que, por sua vez, foi centrifugado a 500xg durante 5 min. O sobrenadante contendo o baculovírus constituiu o estoque amplificado.

2.3.5. Produção da α -amilase de *A. merus* em células Sf9 infectadas com baculovírus recombinante. Uma cultura de 1×10^6 de células Sf9, crescidas durante 24 horas foi infectada com 500 μ l do estoque amplificado (~ 10 pfu/célula) e incubada a 27°C durante 96 horas ou até observar 90-100% de efeito citopático. O efeito citopático foi registrado com um microscópio NIKON (de fase invertida). A

Protocolo para Infectar Células Sf9 com Baculovírus Recombinante

Transfecção das Células Sf9 (Em placas P35)

9X10⁵ células + 5 µl de miniprep-Bacmídeo + 6 µl cellfectin

27°C-72 horas [Não se observa efeito citopático]

Obtenção do estoque de baculovírus recombinante :

2-4x10⁵pfu/ml

Amplificação [MOI : ~0,01pfu/célula]

1X10⁶ células + 10 µl do estoque

27°C-48 horas [Não se observa efeito citopático]

Obtenção do estoque amplificado 2-4X10⁷ pfu/ml

PCR p/confirmar a presença do baculovírus recombinante

Produção [MOI : 10 pfu/célula]

1x10⁶ células crescidas 24 horas + 500 µl do estoque amplificado 27°C-96 horas ou até observar 90-100% de efeito citopático.

Coletar 1,5 ml e centrifugar, ressuspender o sedimento celular em 300 µl de Tris-SDS (contendo 1 mM PMSF) e guardar o sobrenadante em geladeira.

Analisar qualitativamente :

DNS

SDS - PAGE 10% (Coloração Azul de Coomassie, Prata)

PAGE não denaturante p/Atividade Amilase no Gel Amido Azul

Western-Blot.

cultura total foi coletada e centrifugada a 500xg durante 5min. O sobrenadante foi mantido a -20°C e o sedimento tratado com tampão de lise segundo Grossi de Sá & Chrispeels (1997).

Para confirmar que o baculovírus infectante era recombinante, foi feita PCR dos baculovírus coletados na etapa de amplificação, usando os “primers” de cada construção. Para isto, tomaram-se 100 µl do sobrenadante da amplificação obtidos da centrifugação a 13000xg durante 5 min. O sedimento foi acrescido de 25 µl de tampão contendo Proteinase K (~10 µg). O material ressuspenso foi incubado a 60°C durante 1 hora e, em seguida aquecido a 95°C por 20 min sendo imediatamente esfriado a 4°C. Na reação de PCR, foram usados 2µl do material resultante como molde. A mistura da reação e as condições do termociclador foram as mesmas usadas na construção dos insertos. Os produtos do PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, e comparados com o PCR controle da construção sem inserto.

2.3.6. Detecção de atividade amilásica proveniente de células Sf9 infectadas com baculovírus recombinante. Nos sobrenadantes e nos sedimentos da etapa de produção da cultura foi feita a detecção da atividade amilásica (48 e 96 h) utilizando-se 480µl de amido 0,5% em tampão fosfato de potássio 100mM + 1 mM CaCl_2 + 20mM NaCl, ao qual adicionavam-se 20 µl de amostra. A mistura de reação foi incubada a 37°C por 12 horas. Amido com 20 µl de água milli-Q e a amostra do baculovírus sem inserto foram usados como controle negativo. O controle positivo foi o correspondente à cultura infectada com o baculovírus recombinante Bv-Z1. Os produtos da hidrólise foram detectados com o reagente DNS segundo Kawata *et al.*, 1998. Para tal, 50 µl de amostra + 500 µl de DNS, foram misturados e aquecidos a 90°C durante 10 min. Os açúcares redutores mudam a coloração do reagente de amarelo para marrom. A hidrólise do amido também foi testada com lugol segundo Silva (1989). Assim 10 µl de amostra + 200 µl de lugol em HCl 0,05N foram misturados e a atividade amilásica detectada pela ausência de cor, pois o amido não hidrolisado não fornece coloração azul.

O restante da amostra (~420 µl, chamado AHR) foi seco a 65°C e redissolvido em 25µl de água milli-Q para análise cromatográfica de açúcares redutores.

A atividade amilásica foi também detectada em placa de amido da seguinte forma: 50 ml de amido azul tamponado (2% de amido azul em tampão fosfato de potássio 100mM pH 6,0 + 1 mM CaCl_2 + 20mM NaCl + 2% de ágar) foram aquecidos lentamente e com agitação até a fervura, obtendo-se uma solução azul intensa diáfana que foi vertida sobre uma placa retangular. Antes da gelificação moldes para a formação de pequenos poços com capacidade 20 μl foram colocados sobre o agar. Esfriada a placa, aplicavam-se 20 μl de cada amostra aos poços. As placas foram incubadas a 37°C durante 12 - 24 horas. A atividade de amilase foi detectada pela formação de um halo incolor limitado por um círculo azul intenso ao redor dos poços.

2.3.7. Análise dos produtos de hidrolise do amido pela α -amilase produzida em células Sf9 através de cromatografia de açúcares redutores. Para obter o padrão cromatográfico dos produtos de hidrolise do amido da amilase A1 realizou-se uma cromatografia ascendente em papel das amostras que apresentaram atividade nos testes do DNS ou/e de lugol. Foram aplicados de 0,2 μl a 1 μl do AHR. Como controle negativo foi ensaiada a atividade sobre o amido com a amostra de cultura Sf9 infectada com baculovírus sem inserto. O controle positivo foi obtido do ensaio da atividade sobre o amido pela amostra da cultura Sf9 infectada com Bv-Z1. As cromatografias duraram de 2-4 horas foram reveladas com prata, segundo Trevelyan *et al.*, 1950, Robyt & French (1963) e Silva (1989) onde foi feita uma modificação na fase móvel que passou a ser composta de isopropanol: ac. acético: água (7:1:2)

2.3.8. Detecção da atividade α -amilásica através de PAGE nativo-Amido Azul. As proteínas (20 μl de cada amostra) dos sobrenadantes e sedimentos das culturas Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes e com baculovírus sem inserto foram separadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida não denaturante. O gel não continha SDS e as amostras não foram fervidas. Terminada a eletroforese o gel era lavado 3x de 30 min com água milli-Q e colocado em um molde ao qual se adicionou amido azul tamponado a 40°C. A atividade amilase foi detectada pela descoloração do amido azul formando bandas limitadas pelos produtos da hidrólise, de cor azul intenso.

2.3.9. SDS-PAGE e Western-Blot. As proteínas dos sobrenadantes e sedimentos de culturas, infectadas com baculovírus recombinantes ou com baculovírus sem inserto foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (PAGE) corado com azul de coomassie e com prata (Kit Silver Stain Plus da BioRad). Foram aplicados 20 μ l (~20 μ g do sedimento e ~10 μ g do sobrenadante) de cada amostra juntamente com 10 μ l de tampão de amostra 3X concentrado.

Para detectar expressão da amilase A1, proteínas dos sobrenadantes e os sedimentos das culturas infectadas com baculovírus recombinantes foram transferidas do gel SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose usando um Transblot SD (Semi Dry Transfer Cell). Essa membrana foi usada para análise western-blot, sendo este efetuado como descrito anteriormente.

2.4. Clonagem e expressão da α -amilase de *A. merus* em *Pichia pastoris*

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica, capaz de metabolizar o metanol como a única fonte de carbono. O primeiro passo no metabolismo do metanol é a sua oxidação com O₂ pela enzima álcool oxidase (AOX) a formaldeído. Além do formaldeído esta reação produz peróxido de hidrogênio. Para evitar a toxicidade do peróxido de hidrogênio a reação ocorre numa organela especializada chamada peroxissoma, organela essa que seqüestra substâncias tóxicas. AOX tem pouca afinidade pelo O₂ e *Pichia pastoris* compensa esta deficiência produzindo grande quantidade da enzima. A levedura tem dois genes que codificam para álcool oxidase, AOX1 e AOX2. O gene AOX1 é o responsável pela atividade da AOX na célula (Higgins & Cregg, 1998). A expressão de AOX1 está fortemente controlada e induzida por metanol, de forma que ela corresponde a quase ~30% da proteína solúvel total de células crescendo em metanol como única fonte de carbono. Vetores contendo o promotor do gene AOX1 foram feitos para permitir a transcrição eficiente de genes de interesse (Ellis *et al.*, 1985; Koutz *et al.*, 1989). Apesar de AOX2 ser 97% idêntica a AOX1, o crescimento em metanol de mutantes defectivas em AOX1 é muito lento. Isto permite o isolamento de mutantes Mut^S (aox1) (Cregg *et al.* 1989; Koutz *et al.* 1989). A expressão do gene AOX1 é regulada a nível da transcrição e ocorre por um mecanismo de repressão/desrepressão e um mecanismo de indução. A glicose reprime a transcrição mesmo na presença de metanol. Por este razão recomenda-se crescimento em glicerol, que inibe o efeito

da glicose e deve-se acrescentar metanol para induzir a expressão do gene (Koutz *et al.* 1989). Diferentes plasmídeos foram desenvolvidos para usar o promotor de AOX1 na expressão intra ou extracelular de genes codificando proteínas heterólogas. Todos os vetores de expressão em *Pichia pastoris* têm a seguintes partes: (Higgins & Cregg 1998) (Fig.6)

- a) Um fragmento (~1000 pb) contendo o promotor de AOX1 que permite a expressão induzida por metanol em níveis altos.
- b) Uma sequência de DNA que codifica um peptídeo sinal, que permite secretar a proteína heteróloga.
- c) Múltiplos sítios para clonagem de genes, que permite inserir o gene a ser expresso.
- d) Sequências de terminação do gene AOX1 (~260 pb).
- e) Sequência His4(2,4 Kb), que codifica a enzima histidinol deshidrogenase, usada para complementar cepas de *Pichia his4*, permite selecionar as células de *Pichia* recombinantes.
- f) Sequência de integração (~650 pb) que permite a integração no genoma de *Pichia*, colocada imediatamente depois do códon de terminação de AOX1.
- g) Amp, gene de resistência a ampicilina; ColE1, origem de replicação de *E.coli*. Estes genes permitem a seleção, replicação e manutenção do plasmídeo em *E.coli*.
- h) Origem de replicação do fago f1 (458 bp), que permite a geração de DNA de fita simples para mutagenese.
- i) Sítios únicos de clivagem *Not* I, *Bgl* II, *Sac* I, *Sal* I, *Stu* I, que permitem a linearização do vetor para uma eficiente integração no genoma de *Pichia*.

O fundamento da expressão baseia-se em que o plasmídeo recombinante contendo o gene His4 quando usado para transformar *Pichia pastoris his4* é imediatamente integrado no genoma por mecanismo de recombinação homologa a nível do gene AOX1 ou do gene his4. Se o gene é integrado no gene AOX1 são gerados recombinantes His4 Mut^S. Se a integração ocorre no gene his4 os recombinantes serão His4 Mut⁺. Após a transformação, as células são espalhadas em meio MD (mínimo dextrose) onde crescerão somente as cepas His4 Mut^S ou His4 Mut⁺. A indução com metanol é feita em meio MM (mínimo metanol) e a análise da

Fig.6. Esquema geral de um plasmídeo para transformar *Pichia pastoris*

Esquema 5. Expressão de A1 em *Pichia pastoris*

Vetor : Pic9 (Invitrogen)

Pichia pastoris SMD1168 pep4^Δhis4 Mut⁺His⁻ Protease⁻

expressão do gene inserido é feita por SDS-PAGE, por testes de atividade, Western-blot ou por Southern blot.

Ampla informação sobre a expressão de proteínas em *Pichia pastoris* encontra-se em Ausbel *et al.* (1994), Cregg & Higgins (1995), Romanos (1995), Sreekrishna & Kroop (1996), Sreekrishna *et al.* (1997), Higgins & Cregg (1998) e Gellissen (2000).

Um esquema geral da expressão da amilase de *A. merus* em *Pichia pastoris* usando o vetor pPic9 é mostrada no Esquema 5. No presente trabalho usou-se o vetor pPic9 que tem a seqüência que codifica o peptídeo sinal do fator alfa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* colocado depois da seqüência do promotor AOX1 com o objetivo de facilitar a secreção da proteína heteróloga. Para a expressão de proteínas com seus próprios peptídeos sinais foi necessário remover este fragmento com as enzimas *BamH* I - *EcoR* I gerando o vetor linearizado pPic9^{B/E}. As construções inseridas foram as mesmas obtidas por PCR para a expressão pelo sistema Baculovírus - *Spodoptera* (exceto que foram clivadas com as enzimas *BamH* I - *EcoR* I para serem ligadas ao vetor linearizado pPic9^{B/E}. Células competentes *E.coli* DH5α foram transformadas com os produtos das ligações e, por PCR foram selecionadas as colônias contendo os plasmídeos recombinantes pPic9-BV, pPic9-P, pPic9-Y, pPic9-KLG, pPic9A2^P_Z.

A construção A1SP foi inserida em "frame" no vetor pPic9 da seguinte maneira : clivaram-se 2 µg do plasmídeo pAE2-A1SP (Esquema 2) com as enzimas *BamH* I - *Hind* III. Os produtos liberados, pAE2 e A1SP, foram separados por eletroforese em gel agarose 0,8%. Recuperou-se o fragmento A1SP^{B/H} que foi ligado ao vetor pET32 clivado com as mesmas enzimas (pET32^{B/H}). A clivagem *BamH* I - *Hind* III do vetor pET32 eliminou os sítios de clonagem *EcoR* I, *Sac* I e *Sal* I. O sítio *BamH* I de A1SP no vetor pET32-A1SP está situado depois dos sítios *Nco* I, *EcoR* V e o sítio *Hind* III antes dos sítios *Not* I, *Eag* I, *Ava* I, *Xho* I. Clivou-se o vetor pET32-A1SP com as enzimas *EcoR* V e *EcoR* I levando à liberação dos fragmentos pET32^{EcoR V-EcoR I} (pET32^{EV/EI}) e A1SP^{EcoR V-EcoR I} (A1SP^{EV/EI}). O fragmento A1SP^{EV/EI} foi recuperado após separação por eletroforese em gel de agarose 0,8% e ligado ao vetor pPic9 linearizado com as enzimas *SnaB* I - *EcoR* I, pPic9^{SnaB I/EI} (as enzimas *EcoR* V e *SnaB* I geram extremidades cegas.). Células competentes de *E.coli* DH5α foram

transformadas com o produto desta ligação. As colônias transformadas contendo o vetor pPic9-A1SP foram detectadas por PCR.

A construção KA1 (o gene A1 com peptídeo sinal da amilase de *Bacillus stearothermophilus*) foi clivada com a enzima *EcoR* I e, em seguida, incubada brevemente com a enzima *BamH* I (diluída 10X) por 5 min. A reação foi terminada a 4°C e pela adição de 200 µl de água milli-Q + 25 µl de NaCl 2M e 500 µl de isopropanol. O precipitado foi recuperado por centrifugação a 13000xg durante 10 min, lavado 2X com etanol 80% e redissolvido em 10 µl de água milli-Q. O fragmento KA1^{B/E} foi ligado ao vetor pPic9^{B/E}. Células competentes de *E.coli* DH5α foram transformadas com o produto deste ligação.

A construção ZA1 foi clivada com as enzimas *BamH* I - *Xho* I e, depois da clivagem, separadas por eletroforese em gel de agarose. Recuperou-se o fragmento ZA1^{B/X} o qual foi ligado ao vetor pPic9^{B/X}. Com o produto da ligação transformaram-se células competentes *E.coli* DH5α.

As construções K1A2 e A2^P_Z foram clivadas, em um volume de 20 µl, com a enzima *Xho* I e, em seguida clivadas com *BamH* I (diluída 10X) durante 5 min como já descrito. As construções clivadas K1A2^{B/X} e A2^P_Z^{B/X} foram ligadas ao vetor pPic9^{B/X} e com o produto das ligações transformaram-se células competentes de *E.coli* DH5α.

As colônias hospedando os plasmídeos recombinantes pPic9KA1, pPic9-ZA1, pPic9-K1A2 e pPic9-A2^P_Z foram identificadas por PCR ou pela detecção rápida como já descrito. A natureza dos recombinantes foi confirmada por padrão da clivagem.

Os vetores recombinantes (20 µg de cada um) pPic9-BV, pPic9-P, pPic9-Y, pPic9-KLG, pPic9-A1SP, pPic9-KA1, pPic9-ZA1, pPic9-K1A2, e pPic9-A2^P_Z foram clivados com a enzima *Bgl* II (10 U), num volume de 50 µl e precipitados com 175 µl de água milli-Q + 250 µl de isopropanol + 25 µl de NaCl 2M. Os precipitados recuperados por centrifugação como já descrito, foram dissolvidos em 10 µl de água milli-Q. Com este DNA (5µl) transformou-se por eletroporação (25 µF, 200 Ω, 1500V, 4,-5 mS) células competentes de *Pichia pastoris* SMD1168-his4 recém preparadas (Higgins & Cregg 1998). Como controle negativo foram transformadas células competentes com pPic9. Imediatamente após o pulso elétrico, acrescentou-se 1 ml de sorbitol 1M gelado e as células foram espalhadas em 4 placas de agar MD (250

μl por cada placa), as quais foram incubadas a 30°C até crescimento das colônias recombinantes. Essas colônias eram repicadas em placas de Agar BMGY (meio mínimo glicerol) e incubadas a 30°C durante 1-3 dias após os quais eram transferidos para meio MM-Amido azul (meio mínimo amido azul) para detectar as colônias que secretavam a amilase.

Para as colônias transformadas que não mostraram atividade amilásica, foi feito PCR para confirmar a integração dos insertos no genoma. O PCR foi feito com os mesmos “primers” usados na construção dos insertos. Em alguns casos foram usados os “primers” AOX-F e AOX-R, os quais são específicos para comprovar que o gene foi integrado ao genoma de *Pichia*. Além disto selecionaram-se algumas colônias transformadas contendo inserto integrado para induzir a síntese da amilase, segundo Juge *et al.*, (1996). As colônias foram cultivadas em 4 ml de meio BMGY (meio mínimo glicerol extrato de levedura, em frascos de 20 ml), incubadas a 30°C/250 rpm /2 dias, transferidas para tubos estéreis de 14 ml e centrifugadas a 2000 rpm/5 min. As células foram lavadas, recuperadas por centrifugação, ressuspensas em 4 ml de meio BMMY, e incubadas a 30°C/250 rpm/96h. A cultura de pPic9-K1A2 foi monitorada para avaliar o tempo de expressão da amilase. Para isto, tomaram-se alíquotas de 50 μl depois de 0, 6, 12, 24, 48, 72 horas. Estas eram centrifugadas a 13000xg durante 5 min e 20 μl do sobrenadante eram avaliados em placas de agar amido azul.

Depois de 96 horas as culturas foram coletadas e centrifugadas a 10000xg durante 20 min. O precipitado foi suspenso em 1ml de água milli-Q. Uma alíquota de 100 μl foi centrifugada a 10000xg durante 5min, o precipitado ressuspenso com 60 μl de água milli-Q + 30 μl de tampão de amostra (3X concentrado) para análise de proteínas por SDS-PAGE. A suspensão foi levada a 95°C/10min. Os 900 μl restantes foram centrifugados e as células ressuspensas em 500 μl de tampão fosfato de potássio 100mM pH 6,0 (contendo 1mM CaCl₂ + 20 mM NaCl + 1 mM PMSF + SDS 0,5%) e lisadas como se descreveu para *E.coli*. O sobrenadante, foi precipitado com 3 volumes de acetona gelada, mantido a -20°C durante 6 horas e centrifugado a 10000xg durante 20 min. O precipitado foi seco à temperatura ambiente, redissolvido em 250 μl de água milli-Q, e conservado a -20°C.

Foram feitos os mesmos testes executados para as proteínas dos sedimentos e sobrenadantes das culturas Sf9 infectadas com baculovírus.

3. RESULTADOS

3.1 Análise da sequência A1

O resultado do processamento da sequência de nucleotídeos da α -amilase de *Anopheles merus* (A1) no programa Clone 4 mostrou uma proteína cuja sequência é a mesma da proteína fornecida por Foster *et al* (1993). A identidade desta sequência com as α -amilases de insetos e outras espécies mostra que A1 tem 98% de identidade com amilase de *Anopheles gambiae* e 51-59%, 49-51%, 47%, 11%, 24% e 8-23% de identidade com α -amilases de insetos, mamíferos, aves, plantas, fungos e bactérias, respectivamente (Tabela 4).

A comparação das sequências de aminoácidos entre as α -amilases revela regiões conservadas entre essas proteínas que são mostradas na Tabela 5. A α -amilase de *Anopheles merus* tem as quatro regiões características das α -amilases. As quatro regiões conservadas da α -amilase A1 são 100% idênticas as correspondentes da α -amilase de *Anopheles gambiae*.

O número de resíduos entre as regiões conservadas de α -amilases de insetos e de diferentes espécies revelou (Tabelas 6,7) que o número de resíduos entre as regiões II - III e III - IV varia pouco, enquanto que entre as regiões I - II a variação é notável para as α -amilases das espécies de *Bacillus*. Trocas de aminoácidos ocorrendo entre as regiões I e II não devem estar relacionadas com a atividade da enzima.

A tradução conceitual da sequência genômica da α -amilase A1 é mostrada na Fig. 7. As características principais de este produto são: a) A sequência do peptídeo sinal prevista para α -amilase A1 com um 89,20% de certeza é MKLLVRLAPILLALTGRPVA AQH sugerindo que a proteína é secretada. b) a proteína madura consiste de 492 resíduos começando com glutamine na extremidade amino indicando que o peptídeo poderia estar em contato com a secreção digestiva (Strobl *et al.*, 1997). c) 54.8 kDa, o peso molecular calculado para a proteína madura não modificada. d) a sequência correspondente ao promotor poderia ser CCCATCAACT com 97% de probabilidade.

Na Tabela 8 são dados os peptídeos sinais previstos para as α -amilases (obtidas do Genbank) de insetos. Para expressar a α -amilase de uma espécie com o peptídeo sinal de outra deve-se considerar a identidade entre estes peptídeos sinais. Na Tabela 9, se resume a identidade entre os peptídeos sinais das α -amilases de

Tabela 4. Comparação da α -amilase de *Anopheles merus* com α -amilases de diferentes organismos

Especie	% Identidade
Insetos	
Dipteros	
<i>Anopheles gambiae</i>	98
<i>Drosophila melanogaster</i> , <i>D.pseudoobscura</i> , <i>D.ananasae</i> , <i>D.erecta</i> , <i>D.mauritiana</i> , <i>D.lini</i> , <i>D.orena</i> <i>D.simulans</i> , <i>D. sechellia</i> , e <i>D. teissieri</i>	61
<i>Culex tarsalis</i>	59
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	55
<i>Aedes aegypti</i>	51
Coleopteros	45
<i>Tenebrio molitor</i>	59
<i>Tribolium castaneum</i>	57
<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	55
<i>Phaedon cochleariae</i>	54
Hymenopteros	
<i>Apis mellifera</i>	55
Aracnideos	
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	45
<i>Euroglyphus maynei</i>	43
Decapode	
<i>Penaeus vannamei</i>	51
Mamíferos	
<i>Sus scrofa</i> (pâncreas)	47
<i>Homo sapiens</i> (pâncreas)	47
Aves	
<i>Gallus gallus</i>	47
Fungos	
<i>Aspergillus oryzae</i>	14
Bactérias	
<i>Xanthomonas campestris</i>	19
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	12
<i>Pirococcus woesei</i>	11

Tabela.5 Comparação das Regiões Conservadas de α -amilases de insetos e outros organismos.

α -amilase de:	Região conservada			
	I	II	III	IV
<i>Acanthocelles</i>	DLVVNH	GFRVDAAKH	EVID	FVDNHD
<i>Aedes aegypti</i> (Amy I)	DVVVNH	GFRMDACKH	EVID	FVDNHD
<i>Aedes aegypti</i> (Amy II)	DIVINH	GFRVDAVKH	EVID	FVDNHD
<i>Anopheles gambiae</i>	DIIINH	GFRVDAAKH	EVID	FVDNHD
<i>Anopheles merus</i>	DIIINH	GFRVDAAKH	EVID	FVDNHD
<i>Apis mellifera</i>	DVIMNH	GFRVDAAKH	EVID	FVDNHD
<i>Aspergillus oryzae</i>	DVVANH	GLRIDTVKH	EVLD	FVENHD
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	DVVFDH	GFRLDVVKH	EYWS	FVDNHD
<i>Culex tarsalis</i>	DIVINH	GFRVDAVKH	EVID	FVDNHD
<i>Cus cus</i> (pâncreas)	DAVINH	GFRIDASKH	EVID	FVDNHD
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	DIVLNH	GFRSDASTH	ETIY	MIDHSD
<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	DVVFNH	GFRVDAAKH	EVID	FIDNHD
<i>Drosophila melanogaster</i>	DVVFNH	GFRVDAAKH	EVID	FVDNHD
<i>Euroglyphus maynei</i>	DIVLNH	GFRSDASTH	ETIY	MIDHSD
<i>Gallus gallus</i>	DAVVNH	GFRIDAAKH	EVID	FVDNHD
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	DVVVNH	GFRIDAAKH	EVID	FVENHD
<i>Phaedon cochleriae</i>	DAVFNH	GFRVDAAKH	EVID	FIDNHD
<i>Tenebrio molitor</i>	DAVINH	GFRVDAAKH	EVID	FVDNHD
<i>Tribolium castaneum</i>	DTVINH	GFRVDAAKH	EVID	FIDNHD
<i>Zabrotes subfasciatus</i>	DVVFNH	GFRVDAAKH	EVID	FIDNHD

Tabela 6 Número de resíduos entre as regiões conservadas das α -amilases de insetos.

	I - II	II-III	III-IV
<i>Aedes aegypti</i> (Amy I)	85	32	59
<i>Aedes aegypti</i> (Amy II)	79	32	56
<i>Anopheles merus</i>	85	32	56
<i>Apis mellifera</i>	83	32	56
<i>Culex tarsalis</i>	82	32	56
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	89	31	56
<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	81	29	56
<i>Drosophila melanogaster</i> (d/p)	82	32	56
<i>Euroglyphus maynei</i>	89	31	56
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	85	32	56
<i>Phaedon cochleareae</i>	81	32	56
<i>Tenebrio molitor</i>	81	32	56
<i>Tribolium castaneum</i> (Amy I/II)	81	32	56
<i>Zabrotes subfasciatus</i>	81	31	56

Tabela. 7 Número de resíduos entre as regiões conservadas das α -amilases de diferentes organismos

	I - II	II-III	III-IV
<i>Aspergillus oryzae</i> (TAKA)	79	19	58
<i>Bacillus licheniformis</i>	120	24	57
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	122	24	57
<i>Phaseolus vulgaris</i>	82	37	56
<i>Mus musculus</i> (camundongo)	88	31	58
<i>Xanthomonas campestris</i>	85	30	69

Tabela.8 Previsão de Peptídeos Sinais para α -amilases de insetos

Inseto	Seqüência Prevista	Probalidade
<i>Aedes aegypti</i> -Amy I	MKQLLVILYSALVVTNAQL	90,0%
<i>Aedes aegypti</i> -Amy II	MKILASFLAVAFATLVSAQF	95,0%
<i>Anopheles gambiae</i>	MKLLVRLAPILLALTGRPVAQAH	89,2%
<i>Anopheles merus</i>	MKLLVRLAPILLALTGRPVAQAH	89,2%
<i>Apis mellifera</i>	MMPAIVLLLALLTLAAGEI	96,1%
<i>Culex tarsalis</i>	FAVTFVTAALLLAVATGQF	94,4%
<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	MKIVILFCALSVTVSSVIGQK	80,9%
<i>Drosophyla melanogaster</i> (Amy d/p)	MFLAKSIVCLALLAVVNAQF	93,2%
<i>Euroglyphus maynei</i>	MLPKIYLKLITVLFISLFVQNNVHCKY	79,2%
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	MKFLIGFGVLLLVAVAAQY	95,4%
<i>Phaedon cochleariae</i>	MFLTSLVILCSLAALSLGQK	90,0%
<i>Tribolium castaneum</i> (Amy I/II)	MQFKPILVLCCLATLALGQK	88,5%
<i>Zabrotes subfasciatus</i>	MKLGWVQLILGLAVGFT	85,5%

Tabela. 9 Comparação entre os peptídeos sinais de insetos

α -amilases homologas	% Identidade
<i>Lutzomyia longipalpis</i> - <i>Aedes aegyptis</i> (Amy II)	40
<i>Acanthocelles</i> - <i>Culex tarsalis</i>	36
<i>Acanthocelles</i> - <i>Tribolium castaneum</i>	
<i>Aedes aegyptis</i> (Amy I) - <i>Diabrotica virgifera</i>	
<i>Anopheles merus</i> - <i>Bacillus stearothermophilus</i>	
<i>Apis mellifera</i> - <i>Tribolium castaneum</i>	
<i>Apis mellifera</i> - <i>Drosophila melanogaster</i>	
<i>Drosophila melanogaster</i> - <i>Culex tarsalis</i>	
<i>Lutzomyia longipalpis</i> - <i>Culex tarsalis</i>	
<i>Acanthocelles</i> - <i>Phaedon cochleariae</i>	30
<i>Acanthocelles</i> - <i>Aedes aegyptis</i>	
<i>Aedes aegyptis</i> - <i>Zabrotes subfasciatus</i>	
<i>Lutzomyia longipalpis</i> - <i>Anopheles merus</i>	
<i>Lutzomyia longipalpis</i> - <i>Drosophila melanogaster</i>	

insetos. Esta tabela mostra que a identidade entre peptídeos sinais de organismos muito próximos ou distantes não apresenta variações extremas, situando-se entre 30 e 40%.

A probabilidade de que alguma sequência dos 56 aminoácidos da extremidade amino das α -amilases dos insetos *Dermatophagoides pteronyssis* e *Tenebrio molitor* fornecidas ao programa de previsão fosse o peptídeo sinal foi 0 %. A comparação dos 25 aminoácidos da extremidade amino das α -amilases destes insetos mostrou uma identidade de 40%.

<i>Dermatophagoides pteronyssis</i>	KYHNPHFIGNRSVITHLMEWKYDDI
<i>Tenebrio molitor</i>	QKDANFASGRNSIVHLFEWKWNDIA

A comparação da sequência de aminoácidos de A1 com outras α -amilases revelou que um ácido glutâmico (E) e dois ácidos asparticos (D) os quais estão conservados na família α -amilase (Janecek 1997) estão reconhecidamente envolvidos na catálise no sítio ativo das α -amilases de porco (Qian *et al.*, 1994) e *Tenebrio molitor* (Strobl *et al.*, 1998). Estes aminoácidos são encontrados em A1 como D215, D318 e E252. Comparação com dados prévios (Strobl *et al.*, 1998) outros aminoácidos poderiam estar em sítios de ligação de cloreto⁺¹ (R213, N316, R351) e cálcio⁺² (N124, R176, D185, H219) (Fig. 7)

É importante saber se há glicosilação e quais são os seu(s) sítio(s) quando se quer expressar um gene em sistemas heterólogos. A atividade do produto pode depender dessa modificação. Na análise de sequência (Fig.7) podemos observar que a existência de quatro aminoácidos que podem sofrer O-glicosilação. A previsão com ~96% de probabilidade é que a α -amilase A1 seja O-glicosilada nos resíduos Ser141Thr142. A1 carece da sequência consenso Asn-X-Thr/Ser que normalmente é N-glicosilada. A previsão de O-glicosilação para as α -amilases de outros insetos é dada na Tabela 10.

Na Fig.8 mostra-se a previsão para a estrutura secundária de A1 ressaltando as 8 α -hélices e as 8 folhas- β pregueadas que caracterizam o barril(α/β)₈.

O resumo desta informação é que o fragmento A1 (1,7 Kb) poderia codificar uma α -amilase depois de acrescentar os resíduos ATGA na extremidade 5', esta proteína tem ~96% de probabilidade de ser glicosilada nos resíduos Ser141 Thr142 compreendidos numa região de dobramento sem estrutura secundária definida. O

Tabela.10 Previsão de Sítios de Glicosilação para α -amilases de Insetos

α -amilase de:	Aminoácido	Probabilidade (%)
<i>Acanthocelles</i>	Thr422	92,12
<i>Aedes aegypti</i> (Amy 1)	Thr90	84,45
	Ser23	75,63
	Ser93	73,06
	Ser149	69,06
	Ser703	71,20
	Thr64	71,30
<i>Aedes aegypti</i> (Amy 2)	Thr138	86,32
<i>Anopheles merus</i>	Thr142	94,14
	Thr359	74,57
	Ser141	96,33
<i>Apis mellifera</i>	Nenhum	
<i>Culex</i>	Thr63	97,96
	Thr138	77,00
	Ser460	73,06
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	nenhum	
<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	Thr427	93,66
<i>Drosophila melanogaster</i> Amy-distal	Thr130	98,09
	Thr358	59,83
	Ser129	97,53
	Ser135	99,85
	Ser457	79,19
	Thr131	97,65
<i>Drosophila melanogaster</i> Amy proximal	Thr359	59,83
	Ser130	81,06
	Ser136	99,9
	Ser458	79,19
<i>Euroglyphus maynei</i>	Nenhum	
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Ser357	94,95
<i>Phaedon cochleariae</i>	Ser136,	78,50
	Thr355	95,83
<i>Tenebrio molitor</i>	Nenhum	
<i>Tribolium castaneum</i> (Amy I, II)	Nenhum	
<i>Zabrotes subfasciatus</i>	Thr424	83,24

Promotor																				
1058	TAACGTTGAACGATAAAACAATCGCCCAACCAACATTGCTTTCCCATCAACTGATTGGTGGCAGAGCTATAAAATGAATGCAATCCGCACCTATTAGTCCAGT																			
1165	GCCCACTGTGGGGTTGTGCTTAAATTTGGTGTCTTCCCTTTTGAAAA ATG AAG CTT TTA GTG CGC CTA GCA CCG ATC																			
1242	CTG	CTG	CTA	GCC	CTA	ACC	GGT	CGC	CCG	GTA	GCC	GCT	CAG	CAC	GAT	CCC	CAC	TTT	GTC	CGC
11	L	L	L	A	L	T	G	R	P	V	A	A	Q	H	D	T	H	F	V	R
1303	GGC	CAC	AGC	ACG	ATC	GTG	CAT	CTG	TTC	GAG	TGG	AAA	TGG	AGC	GAC	ATT	GCG	GAC	GAG	TGT
31	G	H	S	T	I	V	H	L	F	E	W	K	W	S	D	I	A	D	E	C
1363	GAG	CGC	TTC	CTG	GGG	CCC	AAA	GGG	TAC	GGC	GGT	GTG	CAG	CTG	TCT	CCA	GTG	AAC	GAG	AAC
51	E	R	F	L	G	P	K	G	Y	G	V	Q	L	S	P	V	N	E	N	
1421	ATC	GTC	ATT	CGA	CTG	GCC	GAT	GGA	TCT	CGG	CCG	TGG	TGG	GAA	CGG	TAT	CAG	CCA	ATT	TCC
71	I	V	I	R	L	A	D	G	S	R	P	W	W	E	R	Y	Q	P	I	S
1483	TTC	AAG	CTG	GAC	ACG	CGA	TGG	GGC	TGG	GAG	GCT	GAG	TTT	GCG	GAC	ATG	TGG	CGG	CGC	TGC
91	F	K	L	D	T	R	S	G	S	E	A	E	F	A	D	M	S	R	R	C
1543	AAT	GCG	GCC	GGC	GTG	OGT	CTG	TAC	GTG	GAC	ATC	ATC	ATC	AAC	CAC	ATG	GGA	GCG	ACG	CAA
111	N	A	A	G	V	R	L	Y	V	D	I	I	N	H	M	G	A	T	Q	
1603	CCC	GTC	GAG	CCA	GCG	ATC	GGT	ACG	GGA	AGT	TCC	ACG	GCC	ATT	CCC	TCC	GAC	CGT	CAG	TCC
131	P	V	E	P	A	I	G	T	G	S	S	T	A	I	P	S	D	R	Q	F
1663	CCG	GCG	GTA	CCG	TTC	GGA	TGG	CCC	GAC	TTT	AAC	CCA	CCG	TGT	GCC	ATC	AAC	GAT	TGG	GGC
151	P	A	V	P	F	G	W	P	D	F	N	P	P	C	A	I	N	D	W	G
1723	AAT	GCG	GAG	CAG	ATC	CGG	AAC	TGT	GAG	CTG	GTG	GGG	CTG	CAC	GAT	CTG	AAC	CAG	GCG	GTG
171	N	A	E	Q	I	R	N	C	E	L	V	G	L	H	D	L	N	Q	A	V
1783	CCG	TGG	GTG	CGT	GAC	CGT	GTC	GTT	GAC	TTC	CTG	AAC	CAT	CTG	ATC	GAG	CTC	GGA	GTG	GCC
191	P	W	V	R	D	R	W	W	D	F	N	H	L	I	E	G	L	T	V	A
1843	GGA	TTC	CGC	GTG	GAT	GCG	GCC	AAA	CAC	ATG	TGG	CCC	GCC	GAT	CTG	GCG	GTG	ATC	TTC	GGA
211	G	F	R	V	D	A	A	K	H	M	W	P	A	D	L	A	V	I	F	G
1903	CGG	CTC	AA	AA	CTC	AAC	ACT	GCG	TAC	GGG	TTT	GCG	CCG	GGA	TGG	CGC	GCA	TTC	CTC	GCG
231	R	L	N	N	L	N	T	A	Y	G	F	A	P	G	S	R	A	F	L	A
1963	CAG	GAA	GTC	ATC	GAT	ATG	GGG	GCG	CAC	GAA	GTG	GTT	CGC	AAG	TTT	GAG	TAC	ACG	TTC	CTC
251	Q	E	V	I	D	M	G	A	H	E	V	V	R	Q	F	E	Y	T	F	L
2023	GCG	ACA	GTG	ACG	GAG	TTT	ATG	TTC	TCG	CAC	TAT	CTT	GGT	OGT	GCC	TTC	GGT	GGA	AAT	GAC
271	G	T	V	T	E	F	M	F	S	H	I	L	G	R	A	F	G	G	D	
2083	GGG	CTC	CGC	TGG	CTG	TCG	AAC	TTT	GGC	GAA	GCG	TGG	GGC	CTG	GCG	TCC	CGC	GAT	GCG	
291	A	L	R	W	L	S	N	F	G	E	A	W	G	L	L	A	S	R	D	A
2143	TTC	GTG	TTC	GTG	GAC	AAT	CAC	GAC	AAT	CAG	CGC	GGT	AAC	TAT	GGT	ATT	CTC	ACG	TAT	AAA
311	F	V	F	V	D	N	H	D	N	Q	R	G	N	Y	G	I	L	T	Y	K
2203	CAG	CCC	AAA	CCG	TAC	AAG	ATG	GCC	ACC	GCG	TTT	GCG	GCC	GCG	TAT	CCG	TAC	GGC	CAG	CTG
331	Q	P	K	P	Y	K	M	A	T	A	F	A	A	Y	P	Y	G	G	L	
2263	OGC	ATC	ATG	AGC	TOG	TTC	GCG	TTC	ACC	GAC	TTT	GAC	CAG	GGC	CCG	CCG	TCC	GAT	GCG	CAG
351	R	I	M	S	S	F	A	F	I	D	F	D	Q	G	P	P	S	D	A	Q
2323	GGC	AAC	CTG	CTG	TOG	CCC	ATC	ATC	AAT	CCG	GAC	AAG	ACG	TGC	GGC	GGC	GGC	TGG	GTG	TGC
371	G	N	L	L	S	P	I	I	N	P	D	K	T	C	G	G	G	W	V	C
2383	GAG	CAC	CGG	TGG	CGC	CAG	ATG	TAC	AGC	ATC	CAC	TTC	CGC	AAC	CIT	GCC	TGG	GGT	AVG	
391	E	H	R	W	R	Q	M	Y	S	M	I	H	F	R	N	L	A	W	G	T
2443	CCG	CTG	CAG	CAC	TGG	TGG	GAC	AAT	GGC	AAC	AAC	CAG	ATC	GCG	TTT	GCC	CGC	GGG	AAC	GTC
411	P	L	Q	H	W	D	N	G	N	C	N	Q	I	A	F	A	R	G	N	V
2503	GGC	TTT	GTG	GCG	TTC	AAC	AAC	GAA	CCG	TTC	N	ATG	AAC	GTG	ATC	TTG	CAG	ACG	GGG	CTG
431	G	F	V	A	F	N	E	P	F	D	M	N	V	Y	L	Q	T	G	L	
2563	CCG	GCC	GAT	ATC	TAC	TGT	GAT	GTG	ATT	TCG	GGT	GCT	CGC	GAG	GGC	GAA	ACG	TGC	ACC	GGG
451	P	A	G	I	Y	C	D	V	I	S	G	A	R	E	G	T	C	T	G	
2623	CTG	CAG	GTG	ATT	GTA	GAG	CCG	AAC	GGG	TTC	GCT	TOG	ATT	TCT	ATC	CGA	GCC	AAC	GCG	GAG
471	L	Q	V	I	V	E	P	N	G	F	A	S	I	S	I	R	A	N	AGG	E
2683	GAC	GGT	GTG	ATT	GCG	ATC	CAC	AGT	N	GAG	GTA	AGT	GTG	TGT	GTG	TGT	TGC	ATG	AGG	TCT
491	D	G	V	I	A	I	H	S	E	V	S	V	C	V	C	C	R	M	R	S
2743	GAT	GGC	CGG	GTG	TGA	AAT	CGA	ATC	TAA	CTA	AAC	CAC	TTT	TTT	CAC	GCT	TCT	CCA	ATT	ATC
511	D	G	R	V	FIM															

Fig.7 Sequência de nucleotídeos e sequência de aminoácidos derivados do fragmento A1.

A seta indica o sítio provável da clivagem do peptídeo da amilase de *Anopheles merus* (A1). As caixas abertas indicam os resíduos conservados do sítio ativo, as caixas sombreadas são resíduos envolvidos na ligação do substrato. A sequência CCCATCAACT corresponde ao promotor. Os resíduos sublinhados os resíduos prováveis de serem glicosilados. Os resíduos para ligação de Ca^{+2} em azul e para ligação do Cl^{-1} em verde. Em rosa a sequência conservada na extremidade C terminal (ver Discussão). Ressaltasse em marrão a sequência própria da α -amilase de *A. merus*. Finalmente, os resíduos em vermelho correspondem as regiões conservadas.

Fig.8 Previsão de Estrutura Secundária para a Amilase A1

peptídeo sinal tem 36% de identidade com o peptídeo sinal de *Bacillus stearothermophilus* e 15% com o de *Zabrotes subfasciatus*.

3.2. Expressão em *Escherichia coli*

3.2.1 Construção do vetor pRSETc-A1: O gene A1 com seu peptídeo sinal foi inserido em fase de leitura no plasmídeo pRSETc. Na Fig. 9 pode-se observar que somente uma colônia transformada continha o plasmídeo recombinante pRSETc-A1. A clivagem de pRSETc-A1 com a enzima *Nhe* I liberou os fragmentos esperados de 4518 e 137 pb (Fig.10), que resultariam da inserção do gene A1 em fase de leitura com o promotor T7. O seqüenciamento confirma que a seqüência A1 foi inserida em fase de leitura no plasmídeo pRSETc (Fig.11).

3.2.2 Construção do vetor pAE2-A1SP: o gene A1, sem o peptídeo sinal e chamado de A1SP foi inserido em fase de leitura depois da cauda 6X-His no plasmídeo pAE2. A clivagem de pAE2-A1SP com *Bam*H I e *Eco*R I liberou o gene A1SP (Fig. 12), e sua orientação foi confirmada por seqüenciamento (Fig.13) do vetor pAE2-A1SP usando o “primer” T7.

3.2.3 Construção do vetor pIBI24-Bst-A1SP: o vetor pIBI24-Bst-A1SP foi construído conforme mostrado na Fig.14. A seqüência do promotor e peptídeo sinal da α -amilase de *Bacillus stearothermophilus* foi amplificada por PCR e clivada com as enzimas *Eco*R I - *Sac* I (Fig.14 A, B) e inserida no plasmídeo pIBI24 (linearizado com as mesmas enzimas) para obter o vetor pIBI24-Bst (Fig.14 C, D). Este foi linearizado com as enzimas *Xho* I - *Hind* III e ligado ao fragmento A1SP^{XH} obtido da clivagem com as mesmas enzimas do vetor pAE2-A1SP. A clivagem com as enzimas *Xho* I - *Hind* III e *Eco*R I - *Xho* I - *Hind* III do DNA plasmidial obtido da colônia 5 (Fig.14 E) transformada com o produto da ligação pIBI24-Bst^{XH} + A1SP^{XH}, mostrou os fragmentos pIBI24 (2809 bp), A1SP (1494 bp) e Bst (245 bp) conforme se esperava.

3.2.4 Detecção de Atividade amilásica. Os testes com DNS para detectar açúcares redutores e com lugol para detectar amido hidrolisado foram feitos para o sobrenadante e sedimento das bactérias transformadas com o plasmídeos pRSETc-A1 e pAE2-A1SP. O resultado foram negativos para as amostras do sobrenadante e positivo para as amostras do sedimento. Entretanto, também foi observada atividade amilásica com DNS e lugol na bactéria transformada com o vetor sem inserto. Os testes de DNS e de lugol para as amostras obtidas da bactéria transformada com o

Fig.9 Detecção rápida do plasmídeo pRSETc contendo o inserto A1

M) Plasmídeo pRSETc sem inserto, **1-23)** Plasmídeos obtidos (segundo Beuken *et al.*, 1998) de bactérias após da transformação de *E.coli* DH5 alfa com o produto da ligação pRSETc^{Hind III}+A1^{Hind III}. A seta assinala que somente o plasmídeo da fenda 15 corresponde ao recombinante pRSETc-A1

Fig.10 Orientação do Inserto A1 com relação ao Promotor T7 dentro do plasmídeo pRSETc-A1

O plasmídeo da fenda 15 (Fig.9) foi clivado com a enzima *Nhe* I produzindo dois fragmentos um de 137pb e um outro de 4518pb. Na raia 3 está mostrado que o plasmídeo da fenda 15 (Fig.9) tem o inserto A1 no mesmo sentido que o promotor T7.

M) Padrão de pesos moleculares, Lambda *Hind* III

- 1) pRSETc-A1 sem clivagem
- 2) pRSETc-A1 clivado com *Hind* III
- 3) pRSETc-A1 clivado com *Nhe* I
- 4) pRSETc clivado com *Hind* III

A seta indica o fragmento de 137pb

Fig.11 Cromatograma do Sequenciamento do Vektor pRSETc-A1

O sítio do clonagem de A1 foi em *Hind* III AAGC TT

Fig.12 Construção de pAE2-A1SP

A) O gene A1SP foi amplificado por PCR, B) O plasmídeo pAE2 e o gene A1SP foram clivados com as enzimas *Bam*H I e *Eco*R I. C) Os fragmentos A1SPB/E e pAE2B/E, produtos da hidrólise, foram separados em gel de agarose 0,8%, recuperados do gel e em seguida ligados. Com o produto desta ligação, transformaram-se células competentes de *E.coli* AD494. D) Detecção das colônias que contêm o plasmídeo pAE2-A1SP. A seta assinala as treze colônias que contém o plasmídeo

Fig.13 Cromatograma do Seqüenciamento do pAE2-A1SP

A clonagem de A1SP foi feita no sítio *Bam*H I - *Eco*R I do vetor pAE2

Fig.14 Construção do vetor pIBI-Bst-A1

Para a construção do plasmídeo pIBI24-Bst-A1SP, foram executadas as seguintes etapas **A)** obteve-se por PCR o fragmento Bst contendo a sequência do promotor e peptídeo sinal do gene A2 (alfa amilase de *Bacillus stearothermophilus*), **B)** este fragmento foi clivado com as enzimas *EcoR* I e *Sac* I e inserido no plasmídeo pIBI24 também clivado com as mesmas enzimas. Com o produto desta ligação, transformaram-se células competentes de *E.coli* DH5-alfa, **C)** as colônias transformadas, contendo o fragmento Bst (assinalado pelas setas), foram detectadas por PCR e **D)** os plasmídeos obtidos destas colônias, depois da clivagem com as enzimas *EcoR* I e *Sac* I, mostraram um padrão de bandas indicando que o pIBI tem o inserto Bst. O plasmídeo pIBI24-Bst clivado com as enzimas *Xho* I e *Hind* III, foi ligado ao gene A1SP que havia sido clivado com as mesmas enzimas. Com o produto desta ligação, transformaram-se células competentes de *E.coli* DH5-alfa, **E)** as colônias transformadas contendo o plasmídeo pIBI24-Bst-A1SP(4548bp) foram detectadas por PCR usando os "primers" Bst-F e A1R como descrito em materiais e métodos. De uma colônia escolhida ao acaso (assinalada pela seta) foi extraído o plasmídeo que foi clivado com as enzimas *EcoR* I e *Hind* III. As bandas resultantes foram comparadas **F)** com o padrão da clivagem deste plasmídeo com as enzimas *Xho* I (X), *EcoR* I (E) + *Hind* III, e *EcoR* I + *Xho* I + *Hind* III mostraram que a clivagem *Xho* I + *Hind* III libera os fragmentos pIBI24 (3054bp) + Bst-A1SP (1494 bp), e a clivagem *EcoR* I + *Xho* I + *Hind* III libera os fragmentos pIBI24 (2809 bp) + A1SP(1488bp) + Bst(245bp). Este resultado confirma que o plasmídeo contido na colônia 5 corresponde à construção pIBI24-Bst-A1SP(4548bp). **M)** Padrão de pesos moleculares de DNA (GIBCO).

vetor pBI24-Bst-A1SP foram negativos, tanto para os de sobrenadantes quanto para os sedimentos.

A cromatografia ascendente em papel (Fig.15) do hidrolisado de amido, obtido com as amostras dos sedimentos das bactérias contendo os plasmídeos pRSETc, pAE2, pRSETc-A1, pAE2-A1SP e da bactéria não transformada mostrou que a bactéria hospedeira produz uma enzima que degrada amido. Com este resultado não se pode estabelecer se a bactéria transformada com os plasmídeos pRSETc-A1 e pAE2-A1SP produz α -amilase.

A detecção da atividade amilásica no sistema PAGE não denaturante - Gel amido azul (Fig.16) dos sedimentos obtidos de bactérias contendo os plasmídeos pRSETc-A1 e pAE2-A1SP e dos sobrenadantes e sedimentos celulares obtidos das bactérias contendo os plasmídeos pBI24-Bst-A1SP e pBI24-A2, revelou que as bactérias transformadas com os plasmídeos pRSETc e pAE2 têm atividade amilásica igual à dos controles positivos. Sendo eles, o sobrenadante de culturas de bactérias contendo o plasmídeo pBI24-A2, A2^P_Z secretada pela levedura *Pichia pastoris* ou a α -amilase de *Tenebrio molitor*. Os sobrenadantes e sedimentos celulares foram analisadas por SDS-PAGE e western-blot.

A α -amilase de *Bacillus stearothermophilus* foi secretada em quantidade de $8,11 \pm 0,196$ mg/L.

3.2.5 A Análise SDS-PAGE e Western-Blot (Figs. 17, 18) O SDS-PAGE não mostrou diferenças significativas entre os controles negativos e as amostras. As amostras das bactérias transformadas com os plasmídeos pRSETc e pAE2 revelaram a indução de uma proteína de aproximadamente 52 KDa que não foi reconhecido com o anticorpo para α -amilase de *Zabrotes subfasciatus*. O western-blot mostrou também que uma proteína de aproximadamente 62 KDa, produzida pelas bactérias transformadas com os vetores pRSETc-A1 e pAE2-A1SP, reagiu com o anticorpo. Os sedimentos das bactérias contendo o plasmídeo pBI24-Bst-A1SP também apresentaram a banda que reage com o anticorpo. O mesmo não aconteceu com o sobrenadante. Os sedimentos e sobrenadantes de bactérias transformadas com o vetor pBI24-H94 mostraram uma notável reação para esse anticorpo. H94 é uma construção quimérica contendo 907pb de A2 (contendo o promotor, peptídeo sinal e a região conservada I da α -amilase de *Bacillus stearothermophilus*) e 1117 pb de A1 (contendo as regiões conservadas II, III e IV da

Fig.15 Cromatogramas da hidrólise de Amido 0,5% com A) extratos de proteínas obtidos de *E.coli* AD494 transformadas com os plasmídeos pAE2, pRSETc, pRSETc-A1 e AE2-A1SP, B) Alfa Amilase de *Bacillus stearothermophilus* obtida de sobrenadante de cultura da bactéria *E.coli* HB101 contendo o plasmídeo pIBI24-A2

Fig.16 Detecção de atividade amilásica em gel de amido azul dos extratos celulares e sobrenadantes de *E.coli* AD494 transformadas com os plasmídeos pRSETc, pRSETc-A1, pAE2, pAE2-A1SP, pIBI24, pIBI2424-A1SP, pIBI24-A2, pIBI-24 Bst-A1SP e pIBI24-H94

1) Amilase de *Tenebrio molitor*. Extratos celulares de *E.coli* contendo os plasmídeos: 2) pRSETc, 3) pRSETc-A1, 4) pAE2, 5) pAE2-A1SP. Extratos celulares(EC) e sobrenadante(S) do meio de *E.coli* contendo os plasmídeos: 6) pIBI-24(S), 7) pIBI-24(EC), 8) pIBI-24-A2*(S), 9) pIBI-24-A2*(EC), 10) pIBI-24-Bst-A1SP*(S), 11) pIBI-24-Bst-A1SP*(EC), 12) pIBI-24-H94*(S), 13) pIBI-24-H94*(EC) e 14) A2^{P_Z} amilase de *B. stearothermophilus* expressa com o peptídeo sinal da amilase de *Zabrotes subfasciatus*.

A1 α -amilase de *Anopheles merus*, A1SP A1 sem seu peptídeo sinal, A2 α -amilase de *B. stearothermophilus*, H94 um híbrido entre A1 e A2.

* indica que a bactéria foi aquecida para liberar a enzima.

A atividade de amilase é reconhecida pela cor de azul intenso ao redor da banda enzimática

Fig.17 SDS-PAGE das Proteínas dos Sedimentos celulares e sobrenadantes de Bactérias *E. coli* AD494 e DH5-alfa transformadas com plasmídeos contendo os genes da amilase de *Anopheles merus* ou da amilase de *Bacillus stearothermophilus*

PM) Padrão de pesos moleculares, 1) amilase de *Tenebrio molitor*, 2) amilase de *B. stearothermophilus* expressa com o peptídeo sinal de *Zabrotes subfasciatus*. Extratos celulares de *E. coli* contendo os plasmídeos: 3) pAE2-A1SP, 4) pAE2, 5) pRSETc-A1, 6) pRSETc.

Sobrenadantes e extratos celulares de *E. coli* AD494 contendo os plasmídeos 7) pIBI24-A2*, 8) pIBI24-H94, 9) pIBI24-Bst-A1**, 10) pIBI-24-Bst-A1*, 11) pIBI24-Bst-A1, 12) pIBI24; de 7)-12) os sobrenadantes e de 13)-18) os extratos celulares.

*Indica que a bactéria foi aquecida para liberar a enzima do espaço periplásmico.

**Amostra proveniente de *E. coli* DH5 α e aquecida.

A1 = A amilase de *Anopheles merus* com seu peptídeo sinal,

A1SP = A1 sem peptídeo sinal

A2 = A amilase de *Bacillus stearothermophilus*

H94 = Amilase químera entre *B. stearothermophilus* e *A. merus*

Fig.18 Western-Blot dos extratos celulares e sobrenadantes de bactérias *E.coli* AD494 e DH5 alfa transformadas com plasmídeos contendo os genes de amilase de *Anopheles merus* ou da amilase de *Bacillus stearothermophilus*

PM) Padrão de pesos moleculares, 1) amilase de *Tenebrio molitor*, 2) amilase de *B. stearothermophilus* expressa em *Pichia pastoris* com o peptídeo sinal de *Zabrotes subfasciatus*. Extratos celulares de *E. coli* contendo os plasmídeos: 3) pAE2-A1SP, 4) pAE2, 5) pRSETc-A1, 6) pRSETc. Sobrenadantes e extratos celulares de *E.coli* AD494 contendo os plasmídeos 7) pIBI24-A2*, 8) pIBI24-H94, 9) pIBI24-Bst-A1**, 10) pIBI-24-Bst-A1*, 11) pIBI24-Bst-A1, 12) pIBI24; de 7)-12) os sobrenadantes e de 13)-18) os extratos celulares.

•Indica que a bactéria foi aquecida para liberar a enzima do espaço periplásmico.

**Amostra proveniente de *E.coli* DH5 α e aquecida

A seta indica a banda correspondente a alfa amilase

α -amilase de *Anopheles merus*). Este resultado indica que o epitopo antigênico não está na extremidade amino. Estes resultados mostram que em *E. coli* a α -amilase A1 é sintetizada mas sem atividade e que a proteína produzida na bactéria contendo o vetor pIBI24-Bst-A1SP não foi secretada.

3.3 Expressão no Sistema Baculovirus-Spodoptera

3.3.1 Construção dos bacmídeos recombinantes: A construção dos bacmídeos recombinantes Bd-BV, Bd-P, Bd-Y, Bd-KLG, Bd-A1SP, Bd-ZA1, Bd-KA1, Bd-Z1, Bd-A2^P_Z e Bd-K1A2 inicia-se com a amplificação do gene de interesse. Os produtos de PCR BV, P, Y, KLG (Fig.19), A1SP (Fig.20), ZA1, KA1, K1A2 (Fig.24) e A2^P_Z (Fig.25) foram clivados (BV^{B/H}, P^{B/H}, Y^{B/H}, KLG^{B/H}, KA1^{B/H}, ZA1^{B/H}, K1A2^{B/H} e A2^P_Z^{B/H}) e ligados ao vetor pFastBac^{B/H}. Para a construção de A1SP, A1SP^{B/H} foi ligado ao vetor pFastBac-HTb^{B/H} (usado para expressão intracelular de A1 sem peptídeo sinal). As colônias transformadas com os vetores recombinantes: pFastBac1-BV (Fig. 21), pFastBac1-P, pFastBac1-Y (Fig. 22), pFastBac-KLG (Fig. 23), pFastBac HTb-A1SP (Fig. 20), pFastBac1-ZA1 e pFastBac1-KA1 (Fig. 24 D, E), pFastBac1-A2P_Z (Fig. 25), pFastBac1-Z1 e pFastBac1-K1A2 (Fig.24 F, G) foram detectadas por PCR. A clivagem por *Bam*H I - *Hind* III dos DNAs plasmidiais obtidos destas colônias confirmou que as colônias continham vetores recombinantes (Fig.20 D, 21 B, 22 B, 23 B, 24 E-G). Os vetores pFastBac recombinantes foram usados para transformar células competentes de *E. coli* DH10 Bac onde o gene de interesse é transposto por uma transposase (sintetizada por um plasmídeo Helper) do pFastBac para o bacmídeo. Essa transposição permite a obtenção dos bacmídeos recombinantes Bd-BV (FIG.21 c), Bd-P e Bd-Y (Fig.22 C), Bd-KLG (Fig. 23 C), Bd-A1SP (Fig.20 E) e Bd-A2^P_Z (Fig. 25 E). As reações de PCR de Bd-ZA1, Bd-KA1, Bd-Z1, e Bd-K1A2 não foram registradas fotograficamente uma vez que foram obtidas poucas colônias transformadas.

3.3.2 Infecção de células Sf9: Das células Sf9 transfectadas com estes bacmídeos recombinantes obteve-se, como indicado em materiais e métodos, um estoque dos baculovírus recombinantes de 10 pfu/célula ($\uparrow$ MOI) que foram usados para infectar células crescidas por 24 horas. Para detectar atividade amilásica as células foram coletadas entre 48-96 horas, quando o efeito citopático foi evidente (Figs.26 A - D). O efeito citopático é observado quando as células tornam-se maiores, menos

PCR de BV, P, Y e KLG

Fig.19 PCR do gene A1 com ATG precedido de diferentes seqüências Kozak

A) O gene A1 foi amplificado por PCR usando "primers" contendo as seqüências Kozak ACC("primers" P, KLG), AAA ("primer" Y) e sem Kozak GGATCC ("primers" BV). Usou-se como molde o gene A1 contido no plasmídeo pBI24-A1. As condições de PCR em geral foram as indicadas pelo fabricante do kit (GIBCO-BRL):

Mistura de reação:

Tampão Tris-HCl	20mM
KCl	50mM
dNTP (mistura)	0.2 mM cada um
MgCl ₂	1.5mM
"Primer Forward"*	0.5M
"Primer A1-R"	0.5M
pBI24-Amy1	0.1 ug
Taq DNA Pol	1 (= 5 unidades)
água milli-Q	p/ volume final 200 µl

Condições do termociclador

95°C	45 segs	Denaturação do DNA	} 28 ciclos
55°C	45 segs	Alinhamento ^{&}	
72°C	2 min	Extensão	
72°C	8 min	Extensão final	

* Os "primers Forward" foram

BV 5'-TCGGGATCCATGAACTTTTAGTGCGCCTAGCACCG-3'

P 5'-CGCGGATCCAAACCATGAACTTTTA-3'

Y 5'-CGCGGATCCAAAAATGAACTTTTA-3'

KLG

5'-CGCGGATCCAAACCATGCAAGTCCTTCTCCTCCAGCTGTCTGGGCTTTGCTGGGCACAGCACGATCCC
CACTTTGTCCGC-3'

B) Depois da avaliação do PCR os produtos foram clivados com as enzimas *Bam*H I e *Hind* III para ser inseridas no vetor pFastBac^{B/H}

[&]A temperatura de alinhamento para Y foi 48 °C

Fig.20 Construção de Bd-A1SP

Para a expressão intracelular da amilase de *Anopheles merus* ligou-se o fragmento A1SP, obtido por PCR **A)** e clivado com as enzimas *Bam*H I e *Hind* III, com o plasmídeo pFastBac HTb também clivado com as mesmas enzimas **B)**. Com o produto desta ligação transformaram-se células competentes de *E.coli* DH5 alfa, onde somente uma colônia **C)** transformada tinha o vetor pFastBac HTb-A1SP. Isto foi confirmado **D)** por clivagem do plasmídeo com as enzimas *Bam*H I e *Hind* III. Células competentes de *E.coli* DH10 Bac foram transformadas com este plasmídeo. As colônias transformadas contendo o bacmídeo recombinante Bd-A1SP foram reconhecidas pela cor branca e por PCR (**E**). A seta indica as colônias contendo o bacmídeo com inserto A1SP. No bacmídeo sem inserto (Bd) não se observou nenhuma banda correspondente a A1SP.

Fig.21 Construção do bacmídeo recombinante Bd-BV

O plasmídeo pFastBac1, clivado com as enzimas *Bam*H I e *Hind*, III foi recuperado do gel de agarose (0,8%) e ligado ao produto de PCR, BV também clivado com as mesmas enzimas. Células competentes de *E.coli* DH5 alfa foram transformadas com o produto desta ligação A) As colônias hospedando ao gene recombinante pFastBac-BV (assinaladas com ?) foram detectadas rapidamente segundo Beuken *et al.* (1998). B) O padrão da clivagem dos plasmídeos obtidos das colônias 1 e 3 confirmou que trata-se de pFastBac1-BV. Com este plasmídeo transformaram-se células competentes *E.coli* DH10 contendo o bacmídeo (Bd). C) As colônias contendo o bacmídeo recombinante Bd-BV foram detectadas pela cor branca e confirmadas por PCR. Escolheram-se 2-3 colônias das quais se extraíram o Bd-BV para transfectar células Sf9.

Esta metodologia foi usada para a construção dos bacmídeos Bd-P, Bd-Y, e Bd-KLG.

A seta assinala as colônias contendo o Bd com o inserto Bv

PCR de colônias transformadas com os Plasmídeos
pFastBac1(P) e pFastBac1(Y)

Clivagem Bam HI/Hind III
dos Plasmídeos
pFastBac1(P) e pFastBac1(Y)

Detecção por PCR de colônias com Bd(P) e Bd(Y).

Fig.22 Construção dos bacmídeos recombinantes Bd-P e Bd-Y.

A metodologia está descrita na Fig.21

Detecção rápida de pFastBac1(KLG)

As setas indicam as colônias das quais foram extraídos plasmídeos pFastBac1-KLG

Clivagem de pFastBac1-KLG^{B/H} mostrando que o gene KLG foi inserido no pFastBac1

Detecção por PCR de colônias brancas com Bd-KLG

Fig.23 Construção do bacmídeo recombinante Bd-KLG

A metodologia está descrita na Fig.21

Fig.24 Construção dos vetores pFastBac1-KA1, pFastBac1-ZA1, pFastBac1-Z1 e pFastBac1-K1A2

A) Os genes KA1 e ZA1 foram obtidos por PCR usando como molde o plasmídeo pBI24-A1. Para o gene Z1 usou-se o PCR-Zb e para o gene K1A2 o molde pBI24-A2.

B) A seguir os genes amplificados foram clivados com as enzimas *BamH* I e *Hind* III. K1A2 foi tratado por 5 min com *BamH* I diluída (10X). Após a clivagem recuperaram-se as bandas KA1^{B/H}, ZA1^{B/H}, Z1^{B/H} e K1A2^{B/H}.

C) Estas foram ligadas ao plasmídeo linearizado pFastBac1^{B/H}. Com o produto desta ligação transformaram-se por eletroporação células competentes de *E.coli* DH5 alfa. As células transformadas contendo os plasmídeos recombinantes pFastBac1-KA1, pFastBac1-ZA1, pFastBac1-Z1 e pFastBac1-K1A2 (nas seguintes páginas Figs.24 D, E1, F1, G1) foram detectados por PCR (usando os mesmos "primers" empregados em sua construção) ou por detecção rápida (segundo a Beuken *et al.* 1998). Destas colônias extraíram-se plasmídeos que foram clivados com as enzimas de restrição *BamH* I e *Hind* III para comprovar a presença do gene inserido (nas seguintes páginas Fig.24 E2, F2 e G2).

Com os plasmídeos pFastBac1-KA1, pFastBac1-ZA1, pFastBac1-Z1 e pFastBac1-K1A2 transformaram-se células competentes *E.coli* DH 10 Bac para obter os bacmídeos recombinantes Bd-KA1, Bd-ZA1, Bd-Z1 e Bd-K1A2 com os quais transfectaram-se células Sf9.

Fig.24-D Detecção do pFastBac1-KA1

As setas assinalam as colônias contendo o plasmídeo pFastBac1-KA1

Fig.24-E Detecção do pFastBac1-ZA1

As setas assinalam as colônias contendo o plasmídeo pFastBac1-ZA1

Os plasmídeos pFastBac1-ZA1 extraídos das colônias 4,8,9,13 foram clivados Com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Hind* III (B/H)

Fig.24-F Detecção do vetor pFastBac1 - Z1

Fig.24-G Detecção do vetor pFastBac1 - K1A2

Fig.25 Construção do bacmideo Bd-A2P_Z

O gene A2P_Z foi obtido por PCR com os “primers” A2P_Z e A2R como descrito em materiais e métodos. O gene amplificado **A)** foi clivado **B)** com a enzima *Hind III* por 6 h e brevemente com *BamH I* (diluída 10X). Em seguida, foi ligado **C)** ao vetor pFastBac1^{B/H}. Depois procedeu-se como explicado para a construção do Bd-BV. **D)** As colônias contendo o plasmídeo pFastBac1-A2P_Z foram detectadas por PCR. **E)** As colônias brancas de *E.coli* DH10 Bac, transformadas com o plasmídeo pFastBac1-A2P_Z e recombinadas de forma a dar Bd-A2P_Z, foram detectadas por PCR. Os quadros em destaque indicam os fragmentos recuperados. A seta indica as colônias contendo o bacmideo Bd-A2P_Z.

Sf9 - 96 Horas

A

Sf9 c/Bacmídeo Infecção-96 Horas

B

Fig.26 Efeitos citopáticos em células Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes Bd-P e Bd-Y

- A. Células Sf9 não infectadas.
- B. Células Sf9 infectadas com Báculo vírus não recombinado
- C. Células Sf9 infectadas com Bv-P
- D. Células Sf9 infectadas com Bv-Y

Sf9-P4 Infecção 96 Horas

C

Sf-P7 Infecção 96 Horas

SF-Y4 Infecção 96 Horas

D

SF-Y7 Infecção 96 Horas

densas e perdem a capacidade de aderência. As células de culturas Sf9 não transfectadas mostram um crescimento normal em monocamada.

Durante este período foi comprovado por PCR (Folgueras-Flatschart *et al.*, 2000) que os baculovírus coletados continham as construções recombinantes mostradas na Fig. 27.

3.3.3 Detecção de atividade amilásica nos sobrenadantes e sedimentos celulares de culturas Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes

A atividade amilásica foi detectada nos sobrenadantes e sedimentos celulares como descrito em materiais e métodos. O teste de DNS de amido hidrolisado com as amostras de sobrenadante e sedimento celular de culturas Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes Bv-BV, Bv-P, Bv-Y, Bv-KLG, Bv-A1SP, Bv-KA1, Bv-ZA1, Bv-Z1, Bv-A2^P_Z e Bv-K1A2 somente foi positivo para as amostras procedentes das culturas infectadas com Bv-Z1, Bv-A2^P_Z e Bv-K1A2. Entretanto o teste de lugol revelou que as amostras de Bv-BV e Bv-ZA1 (construções que contem a α -amilase de *A. merus*) degradavam o amido até formação de dextrinas (Fig. 28). O teste realizado por 24 horas deu o mesmo resultado (Fig. 29), indicando que a α -amilase de *Zabrotes subfasciatus*, produzida por células Sf9 infectadas com Bv-Z1, degrada o amido até produtos que contêm um número de glicose que não dão complexo colorido com I₃⁻ (Bailey & Whelan 1961). A detecção em placa de amido azul mostra que a amilase produzida pelas amostras BV1 e ZA1 descora fracamente ao amido azul (Fig. 30). A atividade α -amilase foi detectada no sobrenadante das culturas de células Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes contendo o gene α -amilase de *Anopheles merus* (construções Bv-BV e Bv-ZA1) (Fig. 31).

Para determinar a quantidade da α -amilase produzida pelo sistema baculovírus-*Spodoptera* foi determinada a quantidade de proteína nas culturas infectadas com baculovírus recombinante e baculovírus sem inserto. A diferença entre estas medidas corresponde à proteína recombinante: Bv $7,54 \pm 0,081 \mu\text{g/ml}$, ZA1 $8,47 \pm 0,105 \mu\text{g/ml}$, Z1 $18,76 \pm 0,276 \mu\text{g/ml}$, A2^P_Z $12,17 \pm 0,100 \mu\text{g/ml}$ e K1A2 $11,34 \pm 0,053 \mu\text{g/ml}$. A dedução

3.3.4 Cromatografia ascendente em papel. O cromatograma dos produtos de amido hidrolisado pela amilase das amostras BV1 e ZA1 (Fig. 32) demonstra que o padrão da clivagem corresponde a uma α -amilase, que produz oligossacarídeos, pouca glicose e quase nenhuma maltose. O padrão de hidrólise de Z1 mostra que o

Fig.27 PCR de baculovirus recombinantes

Após 96 horas da transfecção das células Sf9 com os bacmídeos recombinantes Bd-BV, Bd-P, Bd-Y, Bd-KLG, Bd-A1SP e Bd-A2^P_Z, retirou-se uma aliquota da cultura para obter os baculovírus. A seguir, usando os mesmos “primers” usados na construção, foram detectados por PCR os baculovírus recombinantes **A)** Bv-BV, **B)** Bv-P e Bv-Y, **C)** Bv-A1SP, **D)** Bv-KLG e **E)** Bv-A2^P_Z

Fig.28 Teste de Lugol de hidrolisados de amido com os sobrenadantes e sedimento celular de culturas Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes Bv-BV, Bv-P, Bv-Y, Bv-KLG, Bv-A1SP, Bv-KA1, Bv-ZA1, Bv-K1A2 e Bv-Z1.

1) Sf9 48 Hs	26) Y-6 48 Hs	51) BV-1 96 Hs
2) Sf9 96 Hs	27) Y-6 96 Hs	52) BV-1 96 Hs
3) Sf9-Bd 48 Hs	28) Y-7 48 Hs	53) BV-2 48 Hs
4) Sf9-Bd 48 Hs	29) Y-7 96 Hs	54) BV-2 96 Hs
5) Sf9-Bd 96 Hs	30) Y-7 96 Hs	55) BV-4 96 Hs
6) Sf9-Bd 96 Hs	31) KLG-4 48 Hs	56) P-4 48 Hs
7) A1SP-3 48 Hs	32) KLG-4 96 Hs	57) P-4 96 Hs
8) A1SP-3 96 Hs	33) KLG-6 48 Hs	58) P-7 48 Hs
9) BV-1 48 Hs	34) KLG-6 96 Hs	59) P-7 96 Hs
10) BV-1 96 Hs	35) KLG-6 96 Hs	60) Y-4 48 Hs
11) BV-1 96 Hs	36) ZA1 96 Hs	61) Y-4 96 Hs
12) BV-2 48 Hs	37) K1A2 48 Hs	62) Y-6 48 Hs
13) BV-2 96 Hs	38) K1A2 96 Hs	63) Y-6 96 Hs
14) BV-2 96 Hs	39) Z1 96 Hs	64) Y-7 48 Hs
15) BV-2 96 Hs	40) água mQ	65) Y-7 96 Hs
16) BV-4 48 Hs	41) Sf9 48 Hs	66) KLG-4 48 Hs
17) BV-4 48 Hs	42) Sf9 96 Hs	67) KLG-4 96 Hs
18) P-4 48 Hs	43) Sf9 96 Hs	68) KLG-6 96 Hs
19) P-4 96 Hs	44) Sf9-Bd 48 Hs	69) ZA1 96 Hs
20) P-4 96 Hs	45) Sf9-Bd 48 Hs	70) água mQ
21) P-7 48 Hs	46) Sf9-Bd 96 Hs	71) K1A2 48 Hs
22) P-7 96 Hs	47) Sf9-Bd 96 Hs	72) K1A2 96 Hs
23) P-7 96 Hs	48) Sf9 48 Hs	73) Z1 96 Hs
24) Y-4 96 Hs	49) A1SP-3 48 Hs	
25) Y-4 96 Hs	50) BV-1 48 Hs	

Culturas Infectadas com ↑ MOI, coletadas as 48 ou 96 Hs

O asterisco assinala que BV-1 e ZA1 degradam o amido fracamente dando uma reação apresentando um produto com cor púrpura típica de dextrinas

Fig.29 Teste de Lugol de hidrolisados de amido com os sobrenadantes das culturas de células Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes Bv-BV 1 e Bv-ZA1.

As amostras BV-1 e ZA1 que degradaram o amido fracamente (Fig.28), foram novamente ensaiadas por 24 horas a 37°C, obtendo-se o mesmo resultado.

Fig.30 Teste em placa de amido azul com sobrenadantes de culturas Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes Bv-BV, Bv-P, Bv-Y, Bv-KLG, Bv-A1SP, Bv-KA1, Bv-ZA1, Bv-K1A2 e Bv-Z1

1) Sf9	13) KLG-4
2) Sf9 -Bd	14) KA1
3) A1SP	15) K1A2 _k
➤ 4) BV-1	16) Sf9
5) BV-2	17) K1A2
6) BV-4	18) Z1
7) P-4	19) K1A2
8) P-7	20) K1A2 _{Hc}
9) Y-4	21) água mQ
10) Y-6	22) A2 ^P _Z (BacV)
11) Y-7	
➤ 12) ZA1	

Todas culturas Sf9 ↑ MOI, coletadas as 96 Hs

Aplicaram-se 20 µl de sobrenadante. As setas assinalam as amostras que hidrolisam o amido azul fracamente.

K e Hc construções quimeras entre a amilase de *A. merus* e *B. stearothermophilus*

Fig.31 Expressão da amilase de *Anopheles merus* sobre amido azul de amostras de sobrenadantes e sedimentos celulares de culturas de células Sf9 infectadas com baculovírus recombinante Bv-BV e Bv-ZA1

As placas foram preparadas como explicado em materiais e métodos. O volume total de sobrenadante da cultura foi precipitado com 3 volumes de acetona, incubado a $-20^{\circ}\text{C}/6$ h e centrifugado a $10000 \times g$ durante 20 min. O pellet foi seco e redissolvido em 10% do volume inicial.

O sedimento celular total foi lisado com $300 \mu\text{l}$ de tampão de lise para inseto, preparado segundo Grossi de Sá & Chrispeels (1997) exceto pela incubação a $-20^{\circ}\text{C}/12$ h. Em seguida, foi agitado a frio com pérolas de vidro e centrifugado a $13000 \times g$ durante 20 min. O sobrenadante foi precipitado com acetona como indicado acima e o sedimento celular redissolvido em $250 \mu\text{l}$ de tampão fosfato de potássio.

Aplicaram-se $50 \mu\text{l}$ de cada amostra nos moldes.

Sf9) culturas de células não infectadas, **Sf9-Selvg)** culturas infectadas com o baculovírus sem inserto, **Sf9-BV)** e **Sf9-ZA1)** culturas infectadas com os baculovírus contendo os insertos BV e ZA1 respectivamente.

Fig.32 Padrão Cromatográfico da clivagem do amido pela amilase do inseto *Anopheles merus*

O amido 0,5% foi preparado em tampão fosfato de potássio 100mM + CaCl_2 1mM + NaCl 20mM pH 6,0. Foram preparados uma série de sete tubos "ependorfs" contendo 490 μl de amido, e cada um acrescentaram-se 10 μl do sobrenadante concentrado das culturas Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes BV-1 e ZA1. Os tubos foram incubados a 37°C/24h, e centrifugados a 13000 rpm/10 min/4°C. O sobrenadante foi seco a 65°C e finalmente redissolvido em 50 μl de água milli-Q. Foram aplicados 1 μl (5 aplicações de 0,2 μl) de cada amostra.

- 1) Padrão Glicose/Maltose
- 2) Sobrenadante de Sf9-Z1 (Amilase de *Zabrotes subfasciatus*)
- 3) Sf9-Bd -Baculovírus sem inserto.
- 4) BV-1 amilase de *Anopheles merus* com seu próprio peptídeo sinal
- 5) ZA1 amilase de *Anopheles merus* com o peptídeo sinal de *Zabrotes*
- 6) Sobrenadante de Sf9-A2^P_Z (Amilase de *B. stearothersophilus*)
- 7) Padrão de malto-oligossacarídeos
- 8) Amido 0,5%
- 9) Padrão Glicose/Maltose

Como controles negativos foram usados 10 μl de água milli-Q e 10 μl do sobrenadante da cultura Sf9 infectada com o baculovírus sem inserto.

Fig.33 Expressão da Amilase de *Anopheles merus* em Amido Azul em PAGE nativo de sobrenadantes e sedimento celular das culturas Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes Bv-BV 1 e Bv-ZA1.

Os sobrenadantes das culturas de células Sf9 Bv-BV1 e Bv-ZA1 foram precipitados com acetona(-20°C) e redissolvidos em 10% do volume inicial. Após a separação eletroforética em um gel de poliacrilamida nativo (PAGE-nativo), o gel foi lavado em 200 ml de água milli-Q (3x/10 min). Sobre o gel foi colocado amido azul 2% + agarose 1% em tampão fosfato de potássio 100mM pH 6.0. Esta montagem foi mantida a 37°C/12 horas.

O resultado mostra atividade para amilase de *Anopheles merus* correspondente ao gene com seu próprio peptídeo sinal (BV-1) ou com o gene com o peptídeo sinal da alfa amilase do besouro *Zabrotes subfasciatus*.

Aplicaram-se 5 µg de proteína por fenda, para Sf9-Z1 foi 0,5 µg. A corrida foi efetuada a 100 V para evitar o aquecimento. A seta indica as amostras que degradam o amido azul.

amido foi degradado, principalmente, ate glicose e maltose e pequenas quantidades de oligossacarídeos.

3.3.5 Detecção em PAGE não denaturante de atividade amilásica.

A detecção de atividade amilásica em PAGE não denaturante de sobrenadantes e sedimentos de preparações de células infectadas com os baculovírus Bv-BV1 e BV-ZA1 mostra que A1 foi expressa corretamente em células de *Spodoptera frugiperda*. Fizeram-se três PAGE não denaturantes. Nas duas primeiras a corrida eletroforética foi feita a 167 volts 78mA, onde a amilase A1 não apresentou atividade amilásica. Contudo, a amilase de *Zabrotes subfasciatus* apresentou atividade nessa condição. Quando a corrida foi feita a 100 volts 20 mA a amilase A1 apresentou atividade em 12 horas de incubação (Fig. 33). Este resultado sugere que as amilases produzidas pelas culturas Sf9 infectadas com as construções Bv-BV e Bv-ZA1 são termo sensíveis.

Nas Figs. 34 e 35 está mostrada a detecção de atividade amilásica após separação em PAGE não denaturante. Nessa foram aplicadas amostras de sobrenadantes e sedimentos das culturas Sf9 infetadas com os baculovírus recombinantes Bv-BV, Bv-P, Bv-Y, Bv-KLG, Bv-A1SP e Bv-A2^P_Z. A corrida foi feita a 180 volts. A amilase termoestável A2 apresentando o consenso ACCATGA e o peptídeo sinal de *Zabrotes subfasciatus* foi expressa e apareceu tanto no sobrenadante quanto no sedimento. Na Fig 36 pode ser observada a detecção de atividade amilásica nos sobrenadantes das culturas Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes Bv-KA1, Bv-ZA1, Bv-Z1 e Bv-K1A2. As amilases de *Zabrotes subfasciatus* (Z1) e de *Bacillus stearothermophilus* K1A2, com consenso ACCATGA e seu próprio peptídeo sinal são secretadas e exibem atividade.

3.3.6 Analise em SDS-PAGE e Western-Blot.

O SDS-PAGE de preparações de sobrenadante (Fig.37) e de sedimentos celulares (Fig. 38) de culturas infectadas com os baculovírus recombinantes Bv-BV, Bv-P, Bv-Y, Bv-KLG, Bv-A1SP mostrou bandas de proteínas diferentes das culturas infectadas com baculovírus não recombinante. Essas bandas apresentam um peso molecular entre 52-64 KDa. Entretanto o western-blot foi negativo para todas amostras do sobrenadante, nenhuma banda reagiu com o anticorpo (dados não mostrados). O western-blot das amostras dos sedimentos celulares das culturas BV, P e Y mostra que duas bandas reagiram, a mais pesada com um peso molecular de aproximadamente 62 kDa e a menor com um peso aproximadamente de 52 kDa.

Fig.34 Detecção de atividade amilase em gel de amido azul dos sobrenadantes de culturas Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes Bv-BV, Bv-P, Bv-Y, Bv-KLG, Bv-A1SP e Bv-A2^{P_z}.

As proteínas foram separadas em PAGE (10%) nativo em condições não denaturantes. Após a corrida, o amido azul tamponado* (a 40°C) foi vertido sobre o gel de poliacrilamida e mantido a temperatura ambiente até a solidificação. Em seguida foi incubado a 37°C/12 horas. A atividade amilásica foi detectada pela descoloração do amido azul.

*Amido azul 2% + NaCl 20mM + CaCl₂ + Tampão Fosfato de potássio pH 6,0 + agarose 1%.

PM) Padrão de pesos moleculares. Sobrenadantes de cultura de células de inseto Sf9: 1) não infectado, 2) e 17) infectado com baculovírus sem inserto; e infectados com os baculovírus recombinantes 3) e 4) A1SP, 5) e 6) BV-4, 7) BV-1, 8) BV-2, 9) P4, 10) P7, 11) Y4, 12) Y7, 13) KLG4, 14) KLG7, 15) e 16) A2^{P_z}. 18) Amilase de *Tenebrio molitor*. A construção A1SP corresponde a A1 sem o peptídeo sinal, BV A1 com seu próprio peptídeo sinal sem Kozak, P e Y A1 com as seqüências Kozak ACC e AAA respectivamente.

KLG é A1 com o peptídeo sinal da amilase de *Gallus gallus* e seqüência Kozak ACC. A2^{P_z} é a amilase de *Bacillus stearothermophilus* com o peptídeo sinal da amilase de *Zabrotes subfasciatus* e sem seqüência precedendo o ATG.

Fig.35 Detecção de atividade amilase em gel de amido azul dos sedimentos celulares de culturas de inseto Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes Bv-BV, Bv-P, Bv-Y, Bv-KLG, Bv-A1SP e Bv-A2^P_Z. Metodologia e legenda iguais às da Fig.34

Fig.36 Teste de atividade de amilase em amido azul em PAGE nativo de sobrenadantes de culturas de inseto Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes Bv-KA1, Bv-ZA1, Bv-Z1 e K1A2.

As diferentes raia apresentando atividade amilásica estão assinaladas pelas setas. O esquema abaixo do gel mostra que a migração eletroforética das proteínas apresentando atividade são diferentes.

Material testado: 20 μ l do sobrenadante de cultura por raia.

1) Sf9 cultura não infectada, 2) Sf9-Bd cultura infectada com o baculovírus sem inserto. Culturas infectadas com os baculovírus recombinante: 3) Z1, 4) K1A2Hc, 5) KA1, 6) ZA1, 7) K1A2k, 8) e 9) K1A2 e 10) Amilase de *Tenebrio molitor*.

Z1 é amilase de *Zabrotes subfasciatus*, K1A2Hc e K1A2k são construções quiméricas entre a alfa-amilase de *Bacillus stearothermophilus* e alfa-amilase de *Anopheles merus*, KA1 é A1 com o peptídeo sinal de A2, ZA1 é A1 com o peptídeo sinal de Z1, K1A2 é A2 contendo a sequência Kozak ACC.

A1 é a amilase de *Anopheles merus* e A2 a amilase de *Bacillus stearothermophilus* K e Hc construções quimeras entre A1 e A2.

Fig.37 SDS-PAGE de proteínas de sobrenadantes de células Sf9 de culturas infectadas com os baculovírus recombinantes Bv-BV, Bv-P, Bv-Y, Bv-KLG, Bv-A1SP e Bv-A2^P_Z

O gel de poliacrilamida 10% foi feito como indicado por Sambrook *et al.* (1989). A amilase de *Tenebrio molitor* foi usada como proteína marcadora do peso molecular da proteína expressa por *Spodoptera frugiperda* (Sf9). O gel foi corado com azul de coomassie como indicado por Sambrook *et al.* (1989) e em seguida, com prata segundo as indicações do fabricante do Kit Silver Stain Plus (BioRad).

PM) padrão de pesos moleculares (Benchmark Marker -GIBCO).

Cultura de inseto Sf9 1) não infectada, 2) e 17) infectada com o baculovírus sem inserto; culturas infectadas com os baculovírus recombinantes 3) e 4) A1SP-3, 5) e 6) BV-4, 7) BV-1 8) BV-2, 9) P4, 10) P7, 11) Y4, 12) Y7, 13) KLG-4, 14) KLG-6, 15) e 16) A2^P_Z e 18) Amilase de *Tenebrio molitor*.

A1SP é A1 sem peptídeo sinal, BV é A1 com seu próprio peptídeo sinal e sem sequência Kozak, P e Y são A1 com seu próprio peptídeo sinal e com as sequências Kozak ACC e AAA respectivamente. KLG e A1 com o peptídeo sinal da amilase de *Gallus gallus* e Kozak ACC e A2^P_Z é A2 com o peptídeo sinal da amilase de *Zabrotes subfasciatus* e Kozak ACC

A1 é a amilase de *Anopheles merus*, A2 a amilase de *B. stearotheophilus*.

Fig.38 SDS - PAGE 10% e Western-Blot das Proteínas dos Pellets de Culturas Sf9 infectadas com os Baculovirus Recombinantes Bv-BV, Bv-P, Bv-Y, Bv-KLG, Bv-A1SP e Bacv-A2^P_Z.

A seta indica as bandas dos recombinantes que reagem com o anticorpo anti amilase de *Zabrotes subfasciatus*. A metodologia e legenda como na Fig.37. A) SDS-PAGE, B) Western-Blot

Fig.39 SDS-PAGE (A) e Western-Blot (B) dos sobrenadantes e sedimentos celulares de culturas Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes Bv-Z1, Bv-KA1, Bv-ZA1 e Bv-K1A2.

A) Comparação entre o padrão de proteínas coradas com prata e B) o padrão obtido por Western-Blot com o anticorpo anti amilase de *Zabrotes subfasciatus*. As áreas marcadas assinalam as proteínas que reagem com o anticorpo. A amilase de *Zabrotes* (Z1) é expressa, detectada intracelularmente e secretada ao sobrenadante. A proteína da construção K1A2 amilase de *Bacillus stearothermophilus* foi detectada no sedimento celular. A amilase de *Anopheles merus* produzida pela construção KA1 foi detectada no sobrenadante e a de ZA1 no sedimento celular.

K1A2Hc e K1A2k são construções quiméricas entre o gene da alfa amilase de *Bacillus stearothermophilus* e o gene da alfa amilase de *Anopheles merus*.

Amostras de sobrenadantes de culturas de inseto Sf9 1) não infectada com o baculovírus, 2) infectada com o baculovírus sem inserto, infectadas com os baculovírus recombinantes 3)Z1, 4) K1A2Hc, 5) KA1, 6) ZA1, 7) K1A2k, 8) e 9) KA2. Amostras dos sedimentos celulares: 10) não infectada com o baculovírus, 11) infectada com o baculovírus sem inserto, infectadas com os baculovírus recombinantes 12)Z1, 13) K1A2Hc, 14) KA1, 15) ZA1, 16) K1A2k, 17) e 18) KA2. 19) Amilase de *Tenebrio molitor*.

Z1 é amilase de *Zabrotes subfasciatus*, K1A2Hc e K1A2k são construções quiméricas entre a alfa-amilase de *Bacillus stearothermophilus* e alfa-amilase de *Anopheles merus*, KA1 é A1 com o peptídeo sinal de A2, ZA1 é A1 com o peptídeo sinal de Z1, K1A2 é A2 contendo a sequência tipo Kozak AAACC.

A1 é a amilase de *Anopheles merus* e A2 a amilase de *Bacillus stearothermophilus*

O SDS-PAGE e western-blot (Fig. 39) de preparações de sobrenadante e sedimento celular de culturas Sf9 infectadas com os baculovírus Bv-KA1, Bv-Z1 e K1A2 mostrou que a amilase de *Zabrotes subfasciatus* (sem o consenso ACCATGA e com seu próprio peptídeo sinal) e amilase de *Bacillus stearothermophilus* (com o consenso ACCATGA e seu próprio peptídeo sinal) são ativas tanto no sobrenadante quanto no sedimento. A amilase ZA1 (aprox. 52 Kd) presente no sedimento reagiu com o anticorpo anti amilase de *Zabrotes subfasciatus*. Essa enzima foi detectada no sobrenadante. A amilase KA1 foi observada por western-blot no sobrenadante e mas não no sedimento celular. ZA1 é a amilase A1 sem consenso ACCATGA e com o peptídeo sinal de *Zabrotes subfasciatus*. Já KA1 apresenta o consenso ACCATGA e o peptídeo sinal de *Bacillus stearothermophilus*.

O SDS-PAGE corado com azul de coomassie de proteínas de sobrenadantes de cultura de células infectadas com Bv-ZA1 e Bv-Z1 revelou uma banda de aproximadamente 62 kDa para ambas amostras. A banda correspondente a ZA1 é mais intensa que a correspondente a Z1. Quando o gel foi corado com prata, uma segunda banda, de aproximadamente 52 kDa, foi detectada em Z1 (dado não mostrado). O western-blot destas preparações mostrou que duas amilases foram secretadas por células infectadas com o baculovírus Bv-ZA1 (Fig. 40). A proteína presente na banda de aprox. 62 kDa reagiu debilmente com o anticorpo anti amilase de *Zabrotes subfasciatus*. No caso de *Anopheles merus*, somente uma banda, correspondente a proteína com aprox. 52 kDa foi detectada. Essa tem aparentemente o mesmo peso molecular da banda maior das amilases de *Zabrotes* secretadas pelo sistema Baculovírus-*Spodoptera*.

3.4 Expressão em *Pichia pastoris*

3.4.1 Construção dos vetores: o resultado da construção dos vetores recombinantes pPic9-BV, pPic9-P, pPic9-Y, pPic9-KLG, pPic9-A1SP, pPic9-KA1, pPic9-ZA1, pPic9-A2^P_Z e pPic9-K1A2 é descrita a seguir.

As construções BV, P, Y, KLG foram obtidas por PCR (Fig. 41 A) e clivadas com as enzimas *Bam*H I - *Eco*R I. Os fragmentos BV^{B/E}, P^{B/E}, Y^{B/E}, KLG^{B/E} (Fig. 41B) foram ligados ao vetor linearizado pPic9^{B/E}(Fig, 41 C). Após da transformação das bactérias com as produtos da ligação foram extraídos plasmídeos e estes clivados com as enzimas de restrição *Bam*H I/*Eco*R I (Fig.41D) ou *Bam*H I/*Hind* III (Fig.41E,F,G.). As construções KA1, ZA1, K1A2 e A2^P_Z foram obtidas por PCR (Fig.

Fig.40 SDS-PAGE (A) e Western-Blot (B) das proteínas dos sobrenadantes de culturas Sf9 infectadas com os baculovírus recombinantes Bv-Z1 e ZA1.

(A) Em Z1 e ZA1 a α -amilase detectada no sobrenadante. Ambas aparentam peso molecular de 64 kDa. PM) padrão de pesos moleculares de proteínas (Benchmark-GIBCO). Uma vez que as proteínas do padrão não reagem com o anticorpo, elas foram marcadas esquematicamente para poder estimar o peso molecular da proteína no western blot

(B) Duas amilases de *Zabrotes subfasciatus* (Z1) são secretadas. A de maior peso molecular (64 kDa) reage fracamente com o anticorpo anti amilase de *Z. subfasciatus* enquanto que a menor (~52 kDa) reage fortemente. Somente uma amilase de *Anopheles merus* (ZA1) foi secretada e seu peso molecular é também de 64 kDa.

44A, B). KA1 foi clivada com as enzimas *Bam*H I -*Eco*R I para dar o fragmento KA1^{B/E} (Fig. 44C) que foi ligado ao vetor linearizado pPic9^{B/E}. As construções ZA1 e K1A2 clivadas com as enzimas *Bam*H I - *Xho* I deram os fragmentos ZA1^{B/X} e K1A2^{B/X}. Estes foram ligados ao vetor linearizado pPic9^{B/X} (F44 D, E). As colônias de *E. coli* DH5 α transformadas com os produtos destas ligações e que continham os vetores recombinantes pPic9-BV e pPic9-P (Fig.41 D,E), pPic9-Y e pPic9-KLG (Fig.41 F,G), pPic9-KA1, pPic9-ZA1, pPic9-A2^{P_Z} e pPic9-K1A2 (Fig.44 F-I) foram detectadas por PCR (Higgins & Cregg 1998) ou pelo método rápido de Beuken *et al* (1998). Os vetores recombinantes pPic9-BV e pPic9-P (F42), pPic9-Y e pPic9-KLG (Fig. 43), pPic9-KA1 (Fig. 45), pPic9-ZA1 (Fig.46), pPic9-K1A2 (Fig.47) e pPic9-A2^{P_Z} (Fig.48) extraídos destas colônias foram confirmados pela clivagem com enzimas de restrição e seqüenciamento usando “primer” AOX1-Forward. A Fig.49 mostra a construção A1SP e a Fig. 49 D,E a detecção e caracterização do vetor pPic9-A1SP e a Fig.50 o seqüenciamento do vetor pPic9-A1SP.

3.4.2 Preparação dos vetores recombinantes e transformação de células competentes de *Pichia pastoris*

Os vetores recombinantes pPic9-BV, pPic9-P, pPic9-Y, pPic9-KLG, pPic9-A1SP, pPic9-KA1, pPic9-ZA1, pPic9-A2^{P_Z} e pPic9-K1A2 que são integrados no genoma de *Pichia pastoris* foram linearizados com a enzima *Bgl* II (Fig.51), precipitados com isopropanol, lavados com etanol 80%, secos e redissolvidos em 10 μ l de água milli-Q para serem usados na transformação de células competentes de *Pichia pastoris* por eletroporação. As colônias transformadas que cresceram no meio MD (meio mínimo dextrose) foram replicadas em meio MM-Amido azul para detectar as colônias expressando amilase ativa (Figs. 52,53). Somente as colônias transformadas com os vetores pPic9-A2^{P_Z} e pPic9-K1A2 mostraram atividade amilásica. Esses vetores contém respectivamente o gene da amilase de *Bacillus stearothermophilus* com a seqüência do peptídeo sinal de *Zabrotes* e o consenso ACCATGA (A2^{P_Z}) e o mesmo gene com a seqüência do seu próprio peptídeo sinal e o consenso ACCATGA (K1A2). O teste em placa de amido azul para a *Pichia pastoris* transformada com o vetor sem inserto foi negativo (Fig.54)

3.4.3 PCR de colônias de *Pichia pastoris* transformadas com os vetores recombinantes

Fig.41 Construção dos vetores pPic9-Bv, pPic9-P, pPic9-Y e pPic9-KLG

A) O gene A1 da amilase de *Anopheles merus* com diferentes seqüências Kozak (BV, P, Y) e com o peptídeo sinal de frango (*Gallus gallus*)(KLG) foram obtidos por PCR (ver Fig.19). **B)** Os produtos do PCR foram clivados com as enzimas *Bam*H I - *Eco*R I. Após a clivagem as bandas resultantes foram separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%. As bandas correspondentes a BV^{B/E}, P^{B/E}, Y^{B/E} e KLG^{B/E} foram recuperadas do gel com resina Sephaglass (Pharmacia TM) e **C)** ligadas ao vetor linearizado pPic9^{B/E}. Células competentes de *E. coli* DH5 alfa foram transformadas com o produto desta ligação. As colônias transformadas contendo os vetores recombinantes foram detectadas por PCR (nas seguintes paginas Figs.41 D1, E1, F1, G1) usando como "primers" aqueles empregados na construção. Destas colônias (assinaladas pelas setas) extraíram-se os plasmídeos que foram clivados com as enzimas *Bam*H I - *Hind* III ou *Bam*H I - *Eco*R I para confirmar que os genes foram inseridos no vetor (nas seguintes páginas D2, E2, F2, G2).

BV é A1 com seu próprio peptídeo sinal sem nenhuma seqüência Kozak, P e Y são A1 com seu próprio peptídeo sinal e com as seqüências Kozak ACC e AAA respectivamente. KLG é A1 com o peptídeo sinal de *Gallus gallus* e Kozak ACC.

Fig.41-D Detecção de pPic9-BV Das colônias 4 e 10 suspeitas de conter o plasmídeo pPic9(BV) (assinaladas com ?) se extraíram os plasmídeos e estes foram clivados com as enzimas de restrição *Bam*H I/*Eco*R I (B/E). Somente a colônia 10 continha o plasmídeo pPic9(BV).

Fig.41-E Detecção de pPic9-P Colônias 2, 5, 8 e 14 suspeitas de conter o plasmídeo pPic9-P (assinaladas pelas setas). Da colônia 5 se extraiu o plasmídeo e este foi clivado com as enzimas de restrição *Bam*H I/*Hind* III (B/H). A seta preta indica o inserto P.

Detecção por PCR de colônias
Contendo o plasmídeo pPic9-Y

Fig.41-F Detecção de pPic9-Y O PCR mostra que as colônias 1,2,3,4,11 e 12 contem o plasmídeo pPic9-Y. Isto foi confirmado clivando com as enzimas *Bam*H I/*Hind* III(B/H) o plasmídeo extraído da colônia 2. A seta assinala o Inserto Y.

Detecção de Colônias hospedando
o plasmídeo pPIC9(KLG)

Fig.41-G Detecção de pPic9-KLG A detecção rápida de plasmídeo (Beuken *et al.*,1998) indica que a colônia 6 (assinalada com ?) poderia conter o plasmídeo pPic9-KLG. Isto foi confirmado clivando com as enzimas *Bam*H I/*Hind* III(B/H) o plasmídeo extraído dessa colônia. A seta assinala o inserto KLG

A construção BV é o gene A1 sem sequência Kozak

Fig.42 Cromatograma obtido dos Sequenciamentos de pPic9-BV e pPic9-P

A construção P corresponde ao gene A1 com a sequência Kozak AAACC
A clonagem das construções BV e P foram feitas nos sítios *Bam*H I e *Eco*R I

A construção Y corresponde ao gene A1 com a sequência Kozak AAAAA

Fig.43 Cromatogramas obtidos dos Sequenciamentos dos Vetores pPic9-Y e pPic9-KLG

A construção KLG corresponde ao gene A1 com a sequência peptídeo sinal da amilase de *Gallus gallus*

As construções Y e KLG foram clonados nos sítios de restrição das enzimas *BamH I* e *EcoR I*

Fig.44 Construção dos vetores pPic9-KA1, pPic9-ZA1, pPic9-K1A2 e pPic9-A2^{P_Z}

A) Os produtos de PCR, ZA1 e K1A2 (Fig.24) foram clivados com as enzimas *BamH* I e *Xho* I. K1A2 foi clivado brevemente com *BamH* I (5 min/37°C com a enzima diluída 10X). B) A2^{P_Z} obtido por PCR (Fig. 25A) foi clivado com a enzima *Not* I e brevemente com a enzima *BamH* I. KA1 foi clivado com *EcoR* I e, em seguida, brevemente com *BamH* I. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% onde foram recuperados C) os fragmentos KA1^{B/E}, ZA1^{B/X}, K1A2^{B/X} e A2^{P_Z}^{B/N} foram ligados ao vetor pPic9 D) e E) linearizado com as mesmas enzimas, pPic9^{B/N}, pPic9^{B/X} e pPic9^{B/E}, respectivamente. Células competentes de *E. coli* DH5 alfa foram transformados com os produtos destas ligações. As colônias (indicadas pelas setas) contendo os vetores recombinantes pPic9-KA1 [F] , pPic9ZA1 [G] , pPic9-K1A2 [H] e pPic9-A2^{P_Z} [I] foram detectados por PCR. Foram extraídos destas colônias os plasmídeos que foram clivados com enzimas de restrição para comprovar se o vetor continha o inserto.

Fig.44-F Detecção do vetor PKA1 A seta assinala a colônia 4 que contém o inserto KA1. O plasmídeo extraído desta colônia foi clivado com a enzima de restrição *Hind* III para confirmar a presença do inserto KA1.

Fig.44-G Detecção de PZA1 A seta assinala as colônias 1 e 2 que contém o inserto ZA1. Os plasmídeos extraídos destas colônias foram clivados com as enzimas de restrição *Bam*H I/*Hind* III para confirmar a presença do inserto ZA1.

Fig.44-H Detecção do vetor PK1A2

As seta branca assinala as colônias contendo o inserto K1A2. Os plasmídeos obtidos destas colônias foram clivados com a enzima *Hind* III para confirmar a presença do inserto K1A2.

Fig.44-I pPic9-A2^P_Z

Fig.46 Cromatograma obtido do Sequenciamento do Vetor pPic9-ZA1

A construção ZA1 consiste do gene A1 contendo a sequência do peptídeo sinal da alfa amilase de *Zabrotes subfasciatus*. A construção foi inserida nos sítios *Bam*H I e *Xho* I do vetor pPic9.

A1SP por sua vez é a construção anterior que não tem o peptídeo sinal

Fig.48 Cromatograma obtido do Sequenciamento do Vetor pPic9-A2^{Pz}

A construção A2^{Pz}, consiste do gene A2, o gene da alfa amilase de *Bacillus stearothermophilus*, com o peptídeo sinal da alfa amilase de *Zabrotes subfasciatus*. A construção foi ligada ao vetor pPic9 nos sítios *BamH I* e *Xho I*.

Fig.49 Construção do Vetor pPic9-A1SP

O vetor pAE2-A1SP (Fig.12) foi clivado com as enzimas *Bam*H I e *Hind* III para liberar o fragmento ^BA1SP^H (A), o qual foi recuperado do gel e ligado ao vetor pET32^{B/H} linearizado [com as mesmas enzimas] (B) para obter o vetor pET32-A1SP. O vetor pET32-A1SP foi clivado com as enzimas **Eco*R V e *Eco*R I gerando o fragmento A1SP com extremidades ^{Eco}R V A1SP^{Eco}R I que por sua vez, foi ligado ao vetor pPic9 linearizado (C) com as enzimas **Sna*B I e *Eco*R I (pPic9^{Sna}B I/*Eco*R I). Células competentes de *E. coli* DH5 alfa foram transformadas com o produto da ligação. As colônias contendo o vetor pPic9-A1SP (D) foram detectadas por PCR. Dessas colônias foram extraídos os plasmídeos que foram clivados (E) com as enzimas *Xho* I - *Eco*R I e *Xho* I - *Hind* III para confirmar a presença do inserto .

* As enzimas *Eco*R V e *Sna*B I produzem extremidades cegas.

Fig.49-D PCR de Colônias Transformadas com o plasmídeo pPIC9(A1SP)

Fig.49-E pPic9-A1SP clivado com as enzimas *Xho* I – *EcoR* I e *Xho* I - *Hind* III

A figura mostra que as colônias 1-9 contêm o inserto A1SP. Das colônias 2, 5 e 7 foram extraídos os plasmídeos e clivados com as enzimas de restrição *Xho* I/*EcoR* I para confirmar a presença do inserto A1SP

Fig.50 Cromatograma obtido do Sequenciamento do vetor pPic9-A1SP

A construção A1SP^{EcoRV/EcoRI} foi inserida nos sítios *SnaBI* (TACGTA) e *EcoRI* (GAATTC), do vetor pPic9. O sítio para *EcoRV* é GATATC, a ligação gerou a sequência TACATC assinalada pela seta azul.

A) Vetores recombinantes pPic9-BV, pPic9-P, pPic9-Y, pPic9-KLG, pPic9-A1SP, pPic9-KA1, pPic9-ZA1 e pPic9-K1A2

B) Clivagem com *Bgl* II dos vetores recombinantes

Fig.51 Clivagem com a enzima *Bgl* II dos plasmídeos recombinantes pPic9-BV, pPic9-P, pPic9-Y, pPic9-KLG, pPic9-A1SP, pPic9-KA1, pPic9-ZA1 e pPic9-K1A2.

Os plasmídeos recombinantes pPic9-Bv, pPic9-P, pPic9-Y, pPic9-KLG, pPic9-A1SP, pPic9-KA1, pPic9-ZA1, pPic9-K1A2 e pPic9-A2^{P_Z} devem ser linearizados para transformar as células competentes de *Pichia pastoris*.

A) A quantificação do DNA para cada plasmídeo foi feita espectrofotometricamente. Para ter idéia da intensidade da banda obtida após a clivagem, visualizou-se a quantidade do DNA pela comparação com o padrão de pesos moleculares (1Kb - GIBCO 0,25 μ l/raia); foram aplicados 0,5 μ l da solução de cada plasmídeo.

B) 20 μ g de cada plasmídeo foram clivados com a enzima *Bgl* II (volume final 25 μ l), liberando dois fragmentos, o maior de ~6900 pb (assinalado pela seta) contendo o inserto, e o menor de 2403 pb que é parte do plasmídeo pPic9. Quando a clivagem foi completada foram acrescentados 200 μ l de água milli-Q + 25 μ l de NaCl 2M + 250 μ l de isopropanol. Depois de 10 minutos à temperatura ambiente, o precipitado foi recuperado por centrifugação a 13000xg durante 10min e lavado 2X com etanol 80% frio (4°C). Depois de seco, o precipitado foi redissolvido em 10 μ l de água milli-Q, e usado para transformar as células de *Pichia*..

Fig.52 Detecção em ágar meio mínimo amido azul de atividade amilásica de *Pichia pastoris* SMD1160 transformada com os plasmídeos pPIC9(BV), pPIC9(P), pPIC9(Y), pPIC9(KLG) e pPIC9(A1SP).

Fig.53 Detecção de atividade amilásica em colônias de *Pichia pastoris* SMD1168 transformada com os vetores pPic9-A2^P_Z, pPic9-K1A2, pPic9-KA1 e pPic9-ZA1

Fig. 54 Controle de *Pichia pastoris* na placa MM-Amido azul

Fig.55 PCR de colônias de *Pichia pastoris* transformada com o vetor pPic9-BV
Todas as colônias contêm o inserto BV no genoma

Fig.56 PCR de colônias de *Pichia pastoris* transformada com o vetor pPic9-P
Somente a colônia P-209 assinalada pela seta, integrou o inserto em seu DNA cromossomal.

Fig.57 PCR de colônias de *Pichia pastoris* transformadas com os vetores A) pPic9-Y e B) pPic9-KLG. Todas as colônias de levedura testadas contêm o inserto KLG. M) Padrão de pesos moleculares de DNA

Fig.58 PCR de colônias de *Pichia pastoris* transformada com o vetor pPic9-A1SP

Todas as colônias integraram o inserto A1SP no DNA cromossomal

Fig.59 PCR de colônias de *Pichia pastoris* transformada com o vetor pPic9-KA1

Somente a colônia não integrou o inserto KA1

Fig.60 PCR de colônias de *Pichia pastoris* transformada com o vetor pPic9-ZA1.

As setas assinalam o produto de PCR esperado

Fig.61 PCR de uma colônia de *Pichia pastoris* transformada com o vetor pPic9-A2^P_Z.

A maioria das colônias transformadas com o vetor pPic9-A2^P_Z mostraram atividade em placa de amido azul. O PCR de uma colônia permitiu comprovar a integração do gene A2^P_Z no genoma da *Pichia pastoris*.

M) Padrão de pesos moleculares de DNA

Os PCR de colônias transformadas com os vetores pPic9-BV, pPic9-P, pPic9-Y, pPic9-KLG, pPic9-A1SP, pPic9-KA1, pPic9-ZA1, pPic9-A2^P_Z e pPic9-K1A2 mostraram que os genes BV (Fig.55), P(Fig.56), Y e KLG (Fig, 57), A1SP (Fig.58), KA1 (Fig. 59), ZA1(Fig.60) e A2^P_Z (Fig. 61) foram integrados ao genoma da *Pichia*. As colônias de A2^P_Z e K1A2 não necessitaram da confirmação por PCR pois elas expressaram a amilase. É mostrado o PCR da colônia A2^P_Z como ilustração.

3.4.4 Detecção de Atividade amilásica

Depois do PCR foram selecionadas 30 colônias de *Pichia* contendo no genoma as construções BV, P, Y, KLG, A1SP, ZA1, KA1. Estas colônias foram cultivadas em meio BMMG (meio mínimo glicerol), em seguida recuperadas por centrifugação, lavadas com água milli-Q estéril para eliminar o glicerol e cultivadas em meio MM (meio mínimo) por 96 horas. A cultura da colônia contendo o gene K1A2 foi usada para monitorar o tempo de expressão da amilase. Foi mostrado que em 48 horas já se tem secreção notável da amilase A2 de *Bacillus stearothermophilus*. O teste de DNS para detectar açúcares redutores de amido hidrolisado com as amostras dos sobrenadantes e sedimentos celulares obtidos destas culturas foi negativo para todos (dados não mostrados). O teste de lugol também foi negativo (Fig. 62). As amostras de *Pichia pastoris* contendo a construção K1A2, integrada no genoma, foram positivas.

O halo médio de atividade das colônias secretando a amilase A2^P_Z foi $9,7 \pm 0,48$ mm e o da K1A2 $8,2 \pm 0,63$ mm. A quantidade de proteína foi $12.52 \pm 0,085$ mg/L e $10.83 \pm 0,087$ mg/L respectivamente.

3.4.5 Teste de amostras de sobrenadante e sedimento celular de *Pichia pastoris* tendo integrado os genes BV, P, Y, KLG, A1SP, KA1, ZA1, A2^P_Z e K1A2 em seu genoma

Amostras dos sedimentos celulares das culturas de *Pichia pastoris* contendo os genes BV, P, Y, KLG, A1SP, KA1, ZA1, A2^P_Z e K1A2 mostraram ser positivas. Nenhum sobrenadante das diversas culturas reagiu com o anticorpo da amilase de *Zabrotes* (Fig. 63).

3.4.6 SDS-PAGE e Western-Blot com amostras de sedimento celular de culturas de *Pichia pastoris* contendo os genes BV, P, Y, KLG, A1SP, KA1, ZA1, A2^P_Z e K1A2.

O SDS-PAGE mostrou uma banda de aproximadamente 64 kDa que não foi observada no controle (*Pichia* transformada com pPic9). O western-blot (Fig.64, 65) com amostras de sedimento celular de culturas de *Pichia pastoris* contendo os genes BV, P, Y, KLG, A1SP, KA1, ZA1 que foram selecionadas pelo dot-blot mostrou que essas sintetizam proteínas que reagem com o anticorpo da amilase de *Zabrotes*. Estas amilases putativas têm peso molecular no intervalo de 52-64 Kd.

Fig.62 Teste de Lugol com os hidrolisados de amido obtidos com o ensaio usando os sobrenadantes (Sob) e sedimento celular (SC) de colônias de *Pichia pastoris* transformadas com os plasmídeos recombinantes pPic9-BV, pPic9-P, pPic9-Y, pPic9-KLG, pPic9-A1SP, pPic9-KA1, pPic9-ZA1 e pPic9-K1A2.

1) BV-153	12) Y-8	23) KA1-8
2) BV-156	13) KLG-1	24) KA1-13
3) BV-158	14) KLG-3	25) ZA1-7
4) BV-159	15) KLG-4	26) ZA1-8
5) BV-160	16) KLG-7	27) ZA1-10
6) BV-166	17) A1SP-1	28) ZA1-32
7) Y-1	18) A1SP-3	29) ZA1-34
8) Y-2	19) A1SP-5	30) P-209
9) Y-5	20) A1SP-7	mQ) água milli-Q
10) Y-6	21) KA1-1	B) <i>Pichia pastoris</i>
11) Y-7	22) KA1-4	A2) <i>Pichia</i> K1A2

As leveduras cresceram em 4ml de meio BMMG a 28°C/ 250 rpm até $D.O_{600} \approx 2.0$. A seguir os meios foram centrifugados a 2000 rpm/5min, os precipitados foram lavados com água milli-Q estéril e as leveduras cultivadas em 4ml de meio BMM por 96 horas. A cultura de *Pichia* transformada com o vetor pPic9-K1A2 foi usada para monitorar a expressão. Desta cultura retirou-se nos tempos: 1) 0 2) 6 3) 12 4) 24 5) 48 e 6) 72 horas, uma alíquota de 50 μ l para avaliar a expressão da amilase no amido azul

Sobrenadantes

Sedimentos celulares

Fig.63 Detecção de amilase em amostras de sobrenadante e sedimento celular de *Pichia pastoris* transformada com os plasmídeos recombinantes pPic9-BV, pPic9-P, pPic9-Y, pPic9-KLG, pPic9-A1SP, pPic9-KA1 e pPic9-ZA1.

2 μ l de amostra foram aplicados na membrana de nitrocelulose. A detecção da amilase foi feita por western-blot (ver materiais e métodos) usando o anticorpo de amilase de *Z. subfasciatus*. (A) é idêntico a (A').

- 1) BV-153
- 2) BV-156
- 3) BV-158
- 4) BV-159
- 5) BV-160
- 6) BV-166
- 7) Y-1
- 8) Y-2
- 9) Y-5
- 10) Y-6
- 11) Y-7

- 12) Y-8
- 13) KLG-1
- 14) KLG-3
- 15) KLG-4
- 16) KLG-7
- 17) A1SP-1
- 18) A1SP-3
- 19) A1SP-5
- 20) A1SP-7
- 21) KA1-1
- 22) KA1-4

- 23) KA1-8
- 24) KA1-13
- 25) ZA1-7
- 26) ZA1-8
- 27) ZA1-10
- 28) ZA1-32
- 29) ZA1-34
- 30) P-209

B) água milli-Q
Z) Amilase de *Zabrotes*

Estas amostras provêm das culturas da Fig.62

Fig.64 SDS-PAGE das proteínas dos sedimentos celulares das culturas de *Pichia pastoris* transformadas com os vetores recombinantes pPic9-BV, pPic9-P, pPic9-Y, pPic9-KLG, pPic9-A1SP, pPic9-KA1 e pPic9-ZA1.

PM) Padrão de pesos moleculares para proteínas (Benchmark-GIBCO). Das culturas de colônias de *Pichia pastoris* SMD1168 transformadas com os plasmídeos recombinantes pPic9-BV, pPic9-P, pPic9-Y, pPic9-KLG, pPic9-A1SP, pPic9-KA1 e pPic9-ZA1 foram obtidos os sedimentos celulares das colônias contendo os insertos: 1) BV-160, 2) BV-166, 3) P-209, 4) Y-5, 5) Y-6, 6) KLG-4, 7) KLG-7, 8) A1SP-1, 9) A1SP-3, 10) A1SP-7, 11) KA1-4, 12) KA1-8, 13) KA1-13, 14) ZA1-32, 15) ZA1-34, 16) SMD1168 (levedura transformada com o plasmídeo pPic9).

BV corresponde a A1 (alfa amilase de *Anopheles merus*) com seu próprio peptídeo sinal e sem seqüências Kozak precedendo ao códon ATG. P e Y são A1 com seu próprio peptídeo sinal e com as seqüências Kozak AAACC e AAAAA respectivamente. KLG corresponde a A1 com o peptídeo sinal da amilase de *Gallus gallus*. A1SP corresponde a A1 com o peptídeo sinal do vetor pPic9. KA1 corresponde a A1 com o peptídeo sinal de A2 (alfa amilase de *Bacillus stearothermophilus*). ZA1 corresponde a A1 com o peptídeo sinal da amilase de *Zabrotes subfasciatus*.

O número mostrado após do hífen corresponde a colônia selecionada por PCR (ver Figs. 55-60).

Fig.65 Comparação das bandas do gel corado com azul de coomassie e as bandas no western-blot usando o anticorpo da amilase de *Zabrotes subfasciatus*.

Das culturas de colônias de *Pichia pastoris* SMD1168 transformadas com os plasmídeos recombinantes pPic9-BV, pPic9-P, pPic9-Y, pPic9-KLG, pPic9-A1SP, pPic9-KA1 e pPic9-ZA1 foram obtidos sedimentos celulares de colônias contendo os insertos: 1) BV-160, 2) BV-166, 3) P-209, 4) Y-5, 5) Y-6, 6) KLG-4, 7) KLG-7 8) A1SP-1, 9) A1SP-3, 10) A1SP-7, 11) KA1-4, 12) KA1-8, 13) KA1-13, 14) ZA1-32, 15) ZA1-34, 16) SMD1168 (levedura transformada com o plasmídeo pPic9). A legenda é a mesma apresentada na Fig.64.

As seta assinala que bandas com peso molecular de 52-64KDa reagiram com o anticorpo da amilase de *Zabrotes subfasciatus*. A preparação da levedura transformada com o plasmídeo pPic9 (sem conter inserto) não apresentou nenhuma banda que reagiu com o anticorpo.

Este resultado mostra que a amilase de *Anopheles merus* é sintetizada por *Pichia pastoris*.

4. DISCUSSÃO

A identidade da α -amilase de *Anopheles merus* (A1) com α -amilases de mamíferos, insetos e aves é relativamente alta (59, 51, 47 % respectivamente). A α -amilase A1 tem 98% de identidade com a α -amilase do mosquito *Anopheles gambiae* e 59-61 % idêntica com as de *Drosophila melanogaster* (Tabela 4). Foram identificados três aminoácidos (D215, E252, D318), importantes para a catalise e três resíduos de histidina (H125, H219, H317), os quais estão envolvidos na ligação do substrato (Qian *et al*, 1994). Também identificamos os resíduos R213, N316, R351 que constituem o sítio de ligação do íon cloreto⁺¹ (Strobl *et al*, 1998). Os resíduos N124, R176, D185, H219 foram relacionados ao sítio de ligação do cálcio⁺² (Vihinen *et al*, 1990). Estes resultados indicam que A1, como outras amilases, tem uma composição e distribuição canônica de resíduos para exercer sua função (Fig.7). As seqüências de aminoácidos da extremidade C terminal de organismos incluídos em diferentes classes tais como Mamífera, Insecta (díptera, hymenoptera, lepidóptera, coleóptera), Arachnida, Nematoda, Osteichthyes (teleostea), Bivalva e Crustacea foram compilados (dados não mostrados) para compara-los com a seqüência correspondente de A1. Como regra geral, a cauda C terminal começando com D compreende 12 aminoácidos. Um exemplo desta seqüência é DGVLAIHVNAKL na amilase de *Tenebrio molitor* (Strobl *et al.*, 1997). Desta compilação se pode observar a seqüência conservada DG__AIH__e também a similaridade de resíduos entre DG e A e depois de H. Na maioria das seqüências coletadas, os dois aminoácidos precedendo AIH são hidrofóbicos VL, IL, VV, FV, ou FI. Os aminoácidos imediatamente depois de AIG são hidrofóbicos (A,V,I,G) e hidrofílicos (K_K, N_K, N_R, S_K, E_K, D_K, D_R) com lisina altamente conservada, ou em poucos casos trocada por arginina ou glutamina. Esta cauda não é observada em amilases de bactéria, fungos, aracnídeas, nematódeas, o plantas. É provável que a extremidade C terminal, como descrita anteriormente, seja uma característica bem definida de algumas α -amilases. Seu rol e distribuição em organismos permanece por ser esclarecida. É importante ressaltar que a α -amilase de *A. merus* apresenta a seqüência DGVIAIH como esperado, mas não segue a regra da similaridade ou extensão depois dessa seqüência. Caracteristicamente foi detectada a seqüência SEVSVCVCCMRSDGRV como sendo exclusiva da α -amilase de *A. merus* e em parte da mesma proteína de *A. gambiae* (acession L04753). Uma parte desta seqüência, VSVCVC, é encontrada em

proteínas não relacionadas com amilases de diferentes organismos e vírus, incluindo a região interna de agCP8155 (acession EAA13780.1), uma proteína não identificada de *A. gambiae*. Porém, considerando sua extremidade C terminal, α -amilase de *Anopheles merus* parece ser única entre as amilases de organismos superiores. Mais, esta seqüência C terminal poderia estar presente na tradução conceptual da seqüência genômica e não na proteína funcional.

A comparação da α -amilase derivada da seqüência de nucleotídeos do gene A1 com as α -amilases de insetos permitiu comprovar que A1 tem as quatro regiões conservadas típicas das α -amilases (Nakajima *et al*, 1986) (Tabela 5). Um caso notável são as α -amilases 1 e 2 do mosquito *Aedes aegypti*, as quais são 46% e 100% idênticas nas regiões conservadas III e IV, mas 66% e 78% idênticas nas regiões I e II respectivamente. Surpreendentemente a α -amilase 2 tem uma identidade >70% quando comparada com as α -amilases de mamíferos (Grossman *et al*, 1997).

A distribuição de estruturas secundárias previstas (Fig. 8) mostra um alternância de regiões de 8 α -hélices e 8 folhas β que sugerem o barril característico das α -amilases (Jespersen *et al*, 1993; Janecek 1997). Estes dados iniciais nos indicaram que a seqüência isolada (A1) do banco de EMBL3 correspondia a uma α -amilase verdadeira e que era possível tentar expressá-la.

As construções para expressar A1 (com ou sem peptídeo sinal) foram inseridas em fase de leitura nos vetores empregados para sua expressão.

Em *E. coli* A1 é expressa com e sem seu próprio peptídeo sinal mas sem atividade (Figs. 16, 18) e as proteínas que reagiram com o anticorpo têm um peso molecular de aproximadamente 62KDa. O peso molecular esperado para a A1, se o peptídeo sinal não fosse removida é de 62,59 KDa e para a proteína sintetizada do vetor pAE2-A1SP 54.8 KDa (sem o peptídeo sinal). O fato de que a bactéria hospedeira (*E. coli* AD494) tivesse atividade amilásica não permitiu estabelecer pelo teste DNS que essa atividade fosse da amilase recombinante. Porém, o teste de lugol foi conclusivo mostrando que a atividade amilásica era proveniente da bactéria. Os padrões cromatográficos da hidrólise do amido (Fig. 15) mostra o mesmo padrão para todas as amostras, incluindo os padrões negativos, a bactéria transformada com o vetor sem inserto e a bactéria sozinha. A presença de proteínas de tamanho < 52 KDa se explicaria pelo fato do anticorpo ter sido obtido de coelho, que deve ter

certa resposta imunológica às células de *E. coli* que fazem parte da flora intestinal. O peptídeo sinal de A1 não foi reconhecido pela bactéria. A clivagem do peptídeo sinal é produzida pela enzima sinal peptidase, presente na membrana de bateria como uma proteína e em eucariotes como um complexo. Ambas enzimas podem clivar peptídeos sinal de qualquer fonte (Dalbey & Von Heijne 1992). O sistema de transporte de *E.coli* transloca, através da membrana, proteínas que possuam ligado ao grupo amino terminal um peptídeo composto de 15-20 aminoácidos, dos quais os 4-5 primeiros são básicos e os seguintes hidrofóbicos, distribuídos ao redor de uma prolina ou glicina (Randall & Hardy 1984, Holland *et al* 1986). O peptídeo sinal dirige a proteína ao interior da membrana interna para ser translocada. A localização final da proteína dentro de uma ou outra membrana, ou no periplasma depende da informação contida na proteína. A amilase de *Bacillus stearothermophilus* (A2) é secretada em um 20%, enquanto a de *A. merus* é periplásmica (Figs.17,18) e foi detectada por western-blot após aquecimento da bactéria. O aquecimento altera a fluidez da membrana externa permitindo a saída da proteína (Silva 1989). Por tanto a substituição do peptídeo sinal não faz que uma proteína seja secretada. É possível que o direcionamento de uma proteína para um determinado compartimento da célula bacteriana requeira sua fusão com regiões críticas de uma proteína específica do compartimento (Lunn *et al.*, 1986). O peptídeo sinal da amilase de *B. stearothermophilus* foi reconhecido pelo sistema de transporte de *E.coli*. Como as bactérias gram⁺, de donde se origina A2, não possuem membrana interna ou espaço periplásmico, resulta de interesse conhecer porque um peptídeo sinal, que na célula de origem permite a passagem através de uma barreira hidrofóbica, é reconhecido em *E.coli*, onde esta passagem é feita através de uma membrana interna que é hidrofílica (Silva 1989).

Também devemos considerar que o fracasso para expressar a α -amilase de *A. merus* (A1) com atividade em *E.coli* pode ser atribuído a que a enzima possui 11 resíduos de cisteína e provavelmente forma cinco pontes dissulfeto. O ambiente celular bacteriano por ser não redutor não é o apropriado para que os pontes dissulfeto e o dobramento correto desta proteína ocorram. Foram desenvolvidas bactérias recombinantes que contêm as enzimas chaves (thrB/groE) para uma via redutora que permita o dobramento específico de proteínas contendo pontes dissulfeto (Derman *et al.*, 1993). Neste trabalho usou-se a bactéria *E.coli* AD494

(trhB) o que sugere que provavelmente as pontes dissulfeto se formaram mas não ocorreu o dobramento específico da enzima A1.

Ensaio para expressar α -amilase de *Zabrotes subfasciatus* e α -amilase de *Tenebrio molitor* em *E.coli* já foram feitos mas não foram reportados porque a enzima não tinha atividade (comunicação pessoal Drs. Fátima Grossi e Walter Terra, respectivamente). Estes dados sugerem que os genes de α -amilases de eucariotes podem ser expressos em *E.coli* mas sem atividade amilásica por não ter o dobramento específico.

A α -amilase de *B. stearrowthermophilus* (A2) foi clonada e expressa com atividade em *E.coli* (Silva 1989). Da enzima detectada, 20% é secretada e 80% localiza-se no periplasma. Após aquecimento da cultura foram obtidos 8 mg/L dos quais 1,6 mg corresponderiam à proteína secretada e 6,4 à proteína do periplasma. Por motivos não determinados parte dessa enzima permanece no interior da célula (Silva 1989). No sistema *Pichia pastoris* a proteína A1 expressa tem um peso molecular >64 KDa e mostra uma forte reação contra o anticorpo anti-amilase de *Zabrotes subfasciatus* (Fig. 65). As proteínas dos sedimentos celulares das amostras de KLG (A1 com o peptídeo sinal da amilase de frango e a sequência tipo Kozak ACCATGA), A1SP (A1 com o peptídeo sinal do fator α do vetor pPic9), ZA1 (A1 com o peptídeo sinal da amilase de *Z. subfasciatus*) e KA1 (A1 com o peptídeo sinal da amilase de *B. stearrowthermophilus* e a sequência tipo Kozak ACCATGA); BV, P e Y (A1 com seu próprio peptídeo sinal, com a sequência tipo Kozak ACCATGA e AAAATGA, respectivamente) deram reação fraca contra o mesmo anticorpo. Isto mostra que nenhuma das proteínas dessas construções foram secretadas. Estes resultados indicam que não é somente a natureza do peptídeo sinal que impede a exportação, isto porque a α -amilase de *B. stearrowthermophilus* foi secretada usando seu próprio peptídeo sinal (construção KA2) e o peptídeo sinal da amilase do inseto *Z. subfasciatus* (construção A2^P_Z) (Tabela 2, Figs. 34, 35, e 53). Provavelmente, a α -amilase A1 não é exportada em *Pichia* porque a proteína não possui o dobramento correto

O rendimento da expressão da amilase A2, pela *Pichia pastoris*, usando a construção A2^P_Z (12mg/L) não variou muito quando comparado com o rendimento da construção KA2 (10.8 mg/L). Também não observamos diferenças dramáticas na

atividade medida pelo halo incolor gerado ao redor da colônia: 10mm para A2^P_Z e 8 mm para KA2. Este dado indica que a secreção da enzima não é afetada pelo peptídeo sinal nem por a sequência tipo Kozak. O rendimento obtido é menor quando comparado com o rendimento da α -amilase de *Bacillus licheniformis* expressa também em *Pichia pastoris* com seu próprio peptídeo sinal (0.9 g/L) e com o peptídeo sinal do vetor de expressão (2.5 g/L) (Paifer *et al*,1994). Outras α -amilases do gênero *Bacillus* já foram expressas com atividade na levedura *Saccharomyces cerevisiae* usando seu próprio peptídeo sinal. Estas enzimas também foram glicosiladas. O rendimento da expressão em *Pichia* não tem uma regra geral. Ele depende da proteína (Higgins & Cregg 1998). Em *Pichia pastoris* o rendimento maximo de expressão foi para o fragmento C da toxina de tétano 12g/L (Clare *et al*, 1991). Um dado importante devido a sua natureza contraditória é a expressão da lisozima humana com seu próprio peptídeo sinal. Usando a mesma cepa de *Pichia* GS115 his4 e o mesmo vetor de expressão, um grupo de pesquisadores obteve 300 mg/L (Goda *et al*.,2000) e outro 39 μ g/L (Koganesawa *et al*.,2001).

Esperava-se que a α -amilase de *A. merus* (A1) é seja O-glicosilada nos resíduos Ser141 Thr142 com 96% de probabilidade (Tabela 10). O peso molecular observado, >64 kDa, na α -amilase putativa de *A. merus* que reagiu com o anticorpo anti amilase de *Z. subfasciatus* (Fig.65) se explicaria pelo fato de estar glicosilada. Não foi observada nenhuma micro heterogeneidade eletroforética. A predição de O-glicosilação para a α -amilase de *B. stearothermophilus* diz que ela pode ocorrer nos resíduos Thr439 (96,38%), Thr517(95,45%), Thr518 (89%) e Ser510 (98,41%). A amilase de *B. stearothermophilus* (construção A2^P_Z) expressa por *Pichia* tem um peso molecular de aproximadamente 84 kDa (Fig.17) indicando que a glicosilação aumentou o peso molecular aparente da enzima. Alem disso apresenta micro heterogeneidade eletroforética comparada com a expressão em bactéria donde não é glicosilada. Considerando o fato de que a provável glicosilação na α -amilase de *B. stearothermophilus* ocorre em sítios agrupados na porção carboxila terminal e relativamente afastados das regiões envolvidas na catálise, supõe-se que essa modificação, se ocorrer, não deve afetar a atividade da enzima quando esta é expressa em sistemas como *Pichia* e Baculovírus/*Spodoptera*. A α -amilase de

Tenebrio molitor não tem sítio para N- ou O-glicosilação e não apresentou micro heterogeneidade eletroforética (Fig.16). Quando a α -amilase de *B. stearythermophilus* foi aquecida a atividade aumentou mostrando que a proteína retinha sua estabilidade térmica.

A glicosilação de proteínas expressas por *Pichia pastoris* tem diferentes efeitos. A N-glicosilação está bem documentada (Higgins & Cregg 1998, Bretthauer & Castellino 1999, Gemmil & Trimble 1999, Cereghino & Cregg 2000). Assim, a celobiohidrolase cel7A de *Trichoderma resei* foi expressa hiperglicosilada mas esta hiperglicosilação não afetou a termo estabilidade da enzima (Boer *et al.*, 2000). Uma glicoamilase de *Aspergillus awamori* foi super expressa e glicosilada; neste caso a glicosilação melhorou a atividade (Fierobe *et al.*, 1997). A fitase de *Aspergillus niger* expressa em *Pichia pastoris* foi glicosilada. Para esta proteína a glicosilação incrementou a secreção da enzima e melhorou a termo estabilidade (Han & Lei 1999). Alpha amilase alkalofílica de *Bacillus* tem 9 sítios para N-glicosilação mas a enzima foi glicosilada em 7. A glicosilação trocou o pH da enzima a um pH ácido e diminuiu a termo estabilidade Este dado também demonstra que a glicosilação não sempre ocorre em todos os sítios de glicosilação esperados (Tull *et al.*, 2001).

Sobre O-glicosilação em *Pichia pastoris* a informação é limitada (Bretthauer & Castellino 1999). Mostrou-se que ela afetou a remoção de carboidratos quando α -manosidase foi tratada com endo-H e endo-N glicanase (Liao *et al.*, 1996). Em proteínas sem sítios para N-glicosilação foi demonstrado que a O-glicosilação ocorre em resíduos de Ser ou Thr (Van den Steen *et al.*, 1998). Finalmente, proteínas que sofrem hiperglicosilação na levedura *S. cerevisiae* foram glicosiladas em *Pichia pastoris* com um padrão de glicosilação Man8GlcNAc2 (Montesino *et al.*, 1998).

Usando o sistema de expressão da levedura *Kluveromyces lactis*, demonstrou-se que a α -amilase de rato é expressa na forma ativa tanto quando essa é N-glicosilada quanto quando ela não é glicosilada (Tokunaga *et al.*, 1997). Porém a primeira apresentava duas vezes mais atividade que a segunda. A eliminação do sítio de N-glicosilação (entre as seqüências consensos III e IV e a primeira parte do $(\alpha/\beta)_8$ -barril no domínio B) na isoenzima de arroz Amy1A, reduz a estabilidade

térmica da enzima e a capacidade de reconhecimento de substrato (Terashima *et al.*, 1994)

A α -amilase de *B. stearrowthermophilus* já foi expressa na levedura *S. cerevisiae* usando o peptídeo sinal do fator α da proteína do feromonio de acasalamento (fator α). A atividade foi determinada usando o diâmetro do halo incolor gerado ao redor da levedura devido à hidrólise do amido pela α -amilase secretada. Entretanto, não foi detectada atividade amilásica no sobrenadante do meio de cultura (Nonato & Shishido 1988). Neste trabalho foi expressa a mesma α -amilase com seu próprio peptídeo sinal (construção KA2, Tabela 2) e com o peptídeo sinal da α -amilase de *Z. subfasciatus* (construção A2^P_Z, Tabela 2). A comparação entre o rendimento em placa medido pelo diâmetro do halo de atividade revelou que a α -amilase de *B. stearrowthermophilus* expressa em *Pichia pastoris* (este trabalho) foi 5 vezes maior que quando expressa em *S. cerevisiae*. Além disso, a α -amilase expressa por *S. cerevisiae* foi ativa somente em meio sólido e inativa no sobrenadante da cultura. A razão desta inatividade foi atribuída a presença de proteases que degradaram a enzima. A enzima expressa em *P. pastoris* teve atividade no meio sólido (Fig.53) e no sobrenadante (Fig.62).

As mesmas construções de A1 expressas em *Pichia* foram expressas no sistema baculovírus - *Spodoptera* onde foi usado como controle positivo a amilase de *Z. subfasciatus* (já expressa neste sistema por Grossi de Sá & Chrispeels 1997). Neste sistema, A1 foi expressa com atividade quase que exclusivamente no sobrenadante (Figs.30, 33) quando possuindo seu próprio peptídeo sinal (construção BV) ou o peptídeo sinal da amilase de *Z. subfasciatus* (construção ZA1). É provável que estes resultados se devam principalmente ao fato de que o dobramento de A1 foi correto nas células de *Spodoptera frugiperda*. O resultado apresentado na Fig.40-A mostra uma única banda ZA1 de aproximadamente 62 KDa do sobrenadante que reage para o anticorpo anti amilase de *Z. subfasciatus*. Considerando que o peso molecular calculado da α -amilase madura de *A. merus* é 54,8 KDa, este resultado indicaria que a proteína foi modificada após da tradução, provavelmente por O-glicosilação (ver Tabela 10), incrementando seu peso a um valor aparente de 62 KDa como ocorre com a α -amilase de *Z. subfasciatus*. O western-blot (Fig.40-B) sugere que a glicosilação putativa é um evento diferente para estas enzimas nas

células de *Spodoptera*. A α -amilase de *Z. subfasciatus* poderia ter sido ou não modificada, entanto que a amilase de *A. merus* foi totalmente modificada. Observando a forte reação da banda de 52 KDa de *Z. subfasciatus* e tênue reação da banda de 62 KDa, pode-se sugerir que esta modificação é um fator que impede o reconhecimento do epítipo da α -amilase pelo anticorpo anti amilase de *Z. subfasciatus*. Este provavelmente, está localizado na extremidade carboxila e contém o resíduo Asn 442. Uma inspeção visual da relação entre a intensidade das bandas com peso de 62 KDa de ZA1 e Z1 revela que há uma relação inversa entre massa e intensidade da reação antígeno-anticorpo. Já a banda de 52 KDa de A1 dá uma forte reação para o anticorpo. Isto poderia indicar que a hipotética modificação na α -amilase de *A. merus* não afeta a reação imunogênica para o anticorpo e provavelmente não está localizada no epítipo da α -amilase. A glicosilação em A1 pode ocorrer nos resíduos Ser141 e Thr142 que está afastada somente 15 resíduos (Fig. 8) da região conservada DIIINH que contém aminoácidos envolvidos no processo catalítico, dentro do domínio B da enzima. É previsível por tanto que a atividade desta enzima esteja relacionada com esta modificação.

Se a glicosilação ocorre, esta não gera micro-heterogeneidade eletroforética nas α -amilases de *A. merus* e *Z. subfasciatus* (Fig. 33).

O padrão cromatográfico dos produtos da hidrólise do amido pelas α -amilases de *A. merus* e *Z. subfasciatus* revela que a primeira é liquefaciente, gerando pouca glicose e maltose e majoritariamente oligossacarídeos, entanto que a segunda é sacarificante gerando abundante glicose e maltose. (Fig.32) (Pazur & Okada 1966, Robyt & French 1967). A α -amilase de *A. merus*, foi mas rapidamente detectada por lugol que pela técnica do amido azul (Figs, 28,29). O complexo iodo-iodeto com o amido é dependente do número de glicoses na cadeia (Bailey & Whelan 1961). Uma cadeia com menos de 10 resíduos de glicoses não gera cor. Entretanto, quando o número de resíduos aumenta pode-se observar mudanças na cor de vermelho-púrpura, púrpura e azul. Assim a Fig.29 indica que a α -amilase de *Z. subfasciatus* produz principalmente oligossacarídeos com poucos resíduos de glicose. No caso da α -amilase de *A. merus* a enzima pode liberar oligossacarídeos com alto número de resíduos de glicoses. Em harmonia com este resultado podemos analisar o padrão da clivagem do amido após as 12 horas (Fig.33). A α -amilase de *Z.*

subfasciatus libera principalmente glicose e maltose e relativamente poucos oligossacarídeos. A α -amilase de *A.merus* produz pouca glicose e quantidade relativamente maior de oligossacarídeos. Os resultados mostrados nas Figs.28-33 sugerem que estas α -amilases degradam o amido por diferentes mecanismos.

O rendimento da enzima expressa com seu próprio peptídeo sinal (construção BV 7,5 μ g/ml) não foi muito diferente do expresso com o peptídeo sinal de *Z.subfasciatus* (construção ZA1 8,4 μ g/ml). O rendimento da α -amilase de *Z.subfasciatus* foi significativamente maior (18,8 μ g/ml). Este resultado sugere que o rendimento no sobrenadante não está em relação direta com peptídeo sinal. Outros fatores podem estar implicados. O rendimento, em geral, das α -amilases expressas no sistema baculovírus-Spodoptera foi baixo quando comparado com o rendimento obtido para outras proteínas heterólogas: GRP78/BiP 50-75 μ g/ml, antígeno superficial do vírus da hepatites C 90 μ g/ml (Lanford *et al.*, 1989) e faseolina 90 μ g/ml (Bustos *et al.*, 1988).

Da identidade (não >40%, Tabelas 8, 9) entre os peptídeos sinais de α -amilases de insetos infere-se que o peptídeo sinal pode não ser limitante para a secreção de proteínas ativas com o dobramento correto expressas em sistemas heterólogos. Esse resultado sugere também que as peptidases de membrana não seriam muito específicas com relação às seqüências. As α -amilases dos insetos *Dermatophagoides maynei* e *Tenebrio molitor* aparentemente não possuem peptídeo sinal. A previsão de peptídeo sinal para as α -amilases destes insetos foi de 0% de probabilidade.

Com respeito a α -amilase de *B.stearothermophilus*, esta enzima foi expressa com atividade usando seu próprio peptídeo sinal e com seqüência tipo Kozak ACCATGA, (construção K1A2) e com o peptídeo sinal da α -amilase de *Z.subfasciatus* e seqüência tipo Kozak ACCATGA (A2^P_Z) (Figs.34-36). A enzima foi ativa tanto no sobrenadante como no sedimento celular. O rendimento das proteínas produzidas não foi muito diferente, 12,0 μ g/ml e 11,3 μ g/ml respectivamente. A micro-heterogeneidade observada (Figs.35,36) na eletroforese comparada com a micro-heterogeneidade observada na expressão em *Pichia pastoris* (Fig.16) nos permite afirmar que a enzima foi glicosilada e que provavelmente o padrão de glicosilação foi o mesmo.

Para comprovar se os peptídeos sinais podem ser removidos e colocados à frente de outros polipeptídios de modo que estes possam ser expressos e secretados com atividade em sistemas heterólogos, foram feitos experimentos para expressar a α -amilase de *A. merus* (A1) com seu próprio peptídeo sinal e com os peptídeos sinais das amilases de *Z. subfasciatus* (ZA1), *B. stearothermophilus* (K1A2), *Gallus gallus* (KLG) e o do fator alfa do vetor pPic9. Também foi expressa a α -amilase de *B. stearothermophilus* (A2) com seu próprio peptídeo sinal e com aquele de *Z. subfasciatus*. Os resultados aqui apresentados demonstram que o peptídeo sinal não é um fator limitante para a expressão e secreção das α -amilases ativas nos sistemas *Pichia pastoris* e baculovírus-*Spodoptera*.

A estratégia de expressar uma proteína heteróloga com o peptídeo sinal derivado de proteínas de insetos ou vírus se baseia na descoberta de que faseolina, uma proteína vegetal, foi secretada sete vezes mais, usando o peptídeo sinal da melitina (uma proteína do inseto *Apis mellifera*) que com seu próprio peptídeo sinal. Mas, também foi mostrado que a proteína não foi expressa quando o peptídeo sinal foi substituído pelo peptídeo sinal da amilase de *Drosophila. melanogaster* (Tessier *et al.*, 1991). A α -amilase de *D. melanogaster* não tinha sido secretada em nenhum sistema de expressão de proteínas recombinantes. Outros ensaios donde se mostrou que a proteína heteróloga com o peptídeo sinal de melitina não foi produzida foram feitos com lipase ácida de mamífero e glutamina cicltransferase de planta (Dupuis *et al.*, 1997 e Dahl *et al.*, 2000 respectivamente). Porém já foi proposto que a fusão de proteínas heterólogas (foraneas) não sempre há resultado em um incremento na produção e secreção da proteína por células de inseto (Devlin *et al.*, 1989). Um fato notável consiste em que a α -amilase de *B. stearothermophilus* foi expressa ativa usando seu próprio peptídeo sinal e que o rendimento (12 $\mu\text{g/ml}$) não foi significativamente diferente do obtido com o peptídeo sinal da amilase de *Z. subfasciatus* (11,3 $\mu\text{g/ml}$). Este resultado constitui-se no segundo caso em que uma proteína heteróloga é expressa com o peptídeo sinal de uma proteína de bactéria. O primeiro foi reportado para a expressão do gene CD23 humano usando o peptídeo sinal da proteína A de *Staphylococcus aureus* (Allet *et al.*, 1997). Uma explicação para o fato de que a α -amilase de *B. stearothermophilus* se expresse com atividade nos três sistemas estudados pode estar relacionada com a facilidade de formar o

dobramento correto pelo conjunto de chaperona/chaperoninas. Para a α -amilase de *A. merus* entretanto somente as células de *Spodoptera* conseguiriam colocar a proteína em um dobramento compatível com atividade. Isto sugere uma grande facilidade de expressar o gene da bactéria e que as células de inseto representa um bom sistema para dar a conformação ativa a polipeptídios em geral. É provável que o número de resíduos de cisteína, 1 em A2 e 11 em A1, esteja relacionado com os resultados obtidos. Se isto for correto, seria importante verificar o número de resíduos de cisteína num peptídeo antes de decidir sua expressão num sistema bacteriano ou de inseto.

A glicosilação por células de inseto é um fator que devemos considerar já que as α -amilases de *A. merus*, *B. stearothermophilus* e *Z. subfasciatus* podem ser glicosiladas. O papel exato desempenhado pela glicosilação na função de proteínas não está completamente compreendido, mas os estudos disponíveis indicam papéis variados para diferentes proteínas. A questão de como a N- ou a O-glicosilação pode afetar as propriedades das α -amilases de insetos ou de proteínas em geral está por ser respondida. A natureza dos açúcares na N- ou O-glicosilação pode depender da proteína e do sítio da modificação (O'Reilly *et al.*, 1992). Porém, acredita-se que a O-glicosilação ocorreria somente em proteínas nucleares e citoplasmáticas, em quanto que N-glicosilação aconteceria em proteínas que trafegam pela membrana endoplasmática. Dessa forma essas só ocorreriam em proteínas secretadas, lisossomais, e ligadas a membrana (Altman *et al.*, 1999). Mostrou-se que a β -coriogonadotropina humana exibe ambos os tipos de glicosilação (Chen 1991), o que indicaria que essa proteína tanto pode permanecer na célula como pode ser secretada. Isto também sugere que a maquinaria de glicosilação diferenciada ocorre em compartimentos celulares diferentes.

É possível que em α -amilases a presença de carboidratos ao redor ou distantes do sítio ativo aumente a atividade permitindo a amilase hidrolisar o amido solúvel em vários pontos em um complexo enzima-substrato (Robyt & French 1967, Kondo *et al.*, 1978). Além disso é possível que as amilases incrementem sua atividade e estabilidade térmica através de N-glicosilação e não por O-glicosilação, especialmente se a última acontecera entre seqüências consensos. Neste sentido seria interessante testar sistema de O- ou N-glicosilação "*in vitro*" em proteínas que

exibem os dois sítios de glicosilação como é o caso da α -amilase de *D. melanogaster* (Tabela 10). Aparentemente quando a glicosilação acontece em locais diferentes das seqüências consensos, a modificação não reduz a atividade das α -amilases. Estudos adicionais são necessários para determinar se a α -amilase de *A. merus* é na realidade glicosilada e como isto pode afetar sua estabilidade térmica e sua especificidade pelo substrato. Nesta enzima uma potencial O-glicosilação poderia acontecer no domínio B. Modificações neste domínio foram descritas como responsáveis por afetar fortemente a atividade das α -amilases (Janecek 1997). Na α -amilase pancreática de porco a alça que compreende os resíduos 51-57, dentro do domínio A, e a alça que compreende os resíduos 138-146, no domínio B, estão envolvidas na ligação ao carboidrato (Larson *et al.*, 1994; Qian *et al.*, 1995). Isto levou a tentar correlacionar a ausência de algumas de estas alças na α -amilase de *Tenebrio molitor* com a ligação diferencial a inibidores protéicos (Strobl *et al.*, 1998).

Depois de analisar 699 seqüências não codificantes na extremidade 5' do mRNA de vertebrados a pesquisadora Marilyn Kozak (1987) propôs a presença de um consenso envolvendo o ATG iniciador ($^6\text{CCACCATGG}^{+4}$) e posteriormente determinou que a estrutura secundária do mRNA facilita o reconhecimento do códon iniciador (Kozak 1990). Regras e hipóteses foram estabelecidas para determinar o início da tradução em eucariotes enfatizando-se que o contexto ótimo para o início da tradução em mRNA de vertebrados é o consenso GCCACCATGG e que o reconhecimento do consenso realiza-se por um mecanismo de varredura pelo qual a subunidade pequena do ribossomo (40s) liga-se inicialmente na extremidade 5' e migra na orientação 5'→3' parando no primeiro ATG. Se este ATG tem o contexto favorável, isto é a presença do consenso GCCACCATGG, liga-se a subunidade maior (60s), fixando-se o complexo de iniciação da tradução (Kozak 1996, 1999). Como o consenso é reconhecido e como funciona todo o processo ainda são campos de investigação em aberto (Kozak 1999).

Em leveduras, a estrutura secundária do mRNA influencia a tradução, mais nem mudanças no tamanho do gene nem na seqüência consenso parecem afetar dramaticamente a tradução (Slusher *et al.*, 1991). Trocando o consenso normal do gene His4 (AAUAAUGG) pelo consenso proposto por Kozak (GCCACCAUGG) não

observou-se incremento notável na expressão. O consenso em leveduras é a sequência AA(AU)AAUGUCU (Cigan *et al.*,1988). Assim mesmo em leveduras foi reportada a presença de seqüências pequenas (uma ou mais) precedendo o ATG iniciador (ORF). Estas seqüências geralmente inibem, mas em alguns casos, estimulam a tradução. Podem ainda ter um rol antagônico: uma inibe e a outra a estimula (Vilela *et al.*,1998) O mecanismo de varredura proposto por Kozak para iniciar a tradução é aceito em leveduras (Cigan *et al.*,1988; Slusher *et al.*,1991; Vilela *et al.*,1998).

Recentemente a hipótese de Kozak foi questionada. A análise de 954 cDNAs humanos demonstrou que 278 possuíam somente um ATG. Isto implica que nestes mRNA não haveria um mecanismo de seleção do consenso GCCACCATGG (Suzuki *et al.*, 2000).

Nos expressamos com atividade a α -amilase de *A. merus* em células de *Spodoptera* sem a seqüência tipo Kozak (construção ZA1, Tabela 2 Fig.40) e sem atividade com a seqüências tipo Kozak (construções P e Y, Tabela 2, Fig.34, 35). Uma compilação de 20 nucleotídeos precedendo o ATG iniciador (ORF) de α -amilases de insetos revela a ausência do consenso proposto por Kozak. (dados não mostrados).

Um aporte desta tese é haver expressado com atividade a α -amilase do díptero *A. merus* que hidrolisa o amido ate oligossacarídeos e propor no contexto alimentar do inseto qual é papel funcional desta enzima.

Os mosquitos transmitem mais doenças parasíticas em humanos que qualquer outro grupo artrópode. Os Anophelinae, membros do complexo *gambiae* o qual compreende muitas espécies morfológicamente indistinguíveis (White 1985) foram responsáveis por quase 500 milhões de casos clínicos de malária cada ano na década dos 80's (Sturchler 1989). O conhecimento dos hábitos alimentares destes dípteros é de extrema importância porque pode permitir desenhar uma estratégia de controle do vetor de transmissão da malária. Estudos sobre o rol fisiológico da glândula salivar do mosquito da febre amarela (*Aedes aegypti*) revelam que estes órgãos são sexualmente dimórficos. Na fêmeas eles expressam diferentes produtos gênicos a partir de uma única região da glândula capacitando a fêmea ter dois hábitos alimentar diferentes baseados em sangue e açúcares. O macho somente é capaz de usar açúcares. Os resultados discutidos aqui sugerem que a seqüência

genômica da α -amilase de *A. merus* poderia ser expressa como uma enzima completamente ativa durante o ciclo de vida do mosquito, em concordância com dados prévios que demonstram a expressão do mRNA da α -amilase das glândulas salivares de *A. aegypti* (Grossman & James 1993). Juntas estas evidências indicam um modo alimentar de açúcares tanto em mosquitos Culicinae como em Anophelinae os quais provavelmente usam o amido como alvo primário de α -amilases. Entretanto, uma dieta com amido requer as enzimas α -amilase e glucosidase atuando como parte da secreção digestiva para obter o produto final do metabolismo de polissacarídeos, a D-glicose. Aparentemente, além da α -amilase (Grossman & James 1993) *A. aegypti* também expressa uma glucosidase ativa (Marinotti & James 1990, Terra & Ferreira 1994) em concordância com o requerimento anterior. Isto sugere que uma glucosidase pode estar também presente em Anophelinae, que poderia obter a partir de amido os açúcares que são decisivos para a sobrevivência macho. A observação de que as glândulas salivares não são capazes de hidrolisar amido (Marinotti & James 1990) não é coerente com esta proposta mas sugere uma hipótese alternativa. A amilase poderia ser parcialmente secretada permanecendo insolúvel e ligada a superfície externa da membrana celular. Poderia ser de interesse esclarecer a função da extremidade C já discutida como uma âncora da α -amilase na membrana. Portanto nossos dados sugerem que a idéia de mosquitos alimentando-se de flores (van Handel 1972) ou néctares é insatisfatória. Amido ou outros substratos de α -amilase podem ter um papel nos hábitos alimentares do inseto que ainda não foram explicados.

5. Conclusões

1. Expressou-se pela primeira vez como uma enzima ativa, o gene clonado de α -amilase de *Anopheles merus* no sistema Baculovírus-*Spodoptera*. Esse gene é expresso também em bactéria e levedura mas seu produto não apresenta atividade nesses sistemas.
2. O gene clonado da α -amilase de *Bacillus stearothermophilus* foi expresso em bactéria, levedura e inseto. Essa enzima possui atividade no interior e fora das células dos três sistemas estudados. É a primeira vez que se observa em células de inseto a expressão de um gene de bactéria cujo produto é ativo.
3. A expressão do gene de *Bacillus stearothermophilus* se observa quando ele está associado à sequência do próprio peptídeo sinal ou ao de uma amilase de inseto (*Zabrotes subfasciatus*). Isto sugere : a) que o gene poderia estar sendo expresso com atividade mesmo quando seu produto está associado a peptídeos sinais diferentes (atividade no interior das células); b) que o sistema de secreção nas membranas celulares dos três sistemas são indiferentes à natureza do peptídeo sinal ou que essa permeabilidade depende também do produto gênico que o segue; c) que a α -amilase de *Bacillus stearothermophilus* adquire a conformação ativa em células de origens muito diferentes; d) que essa enzima adquire facilmente conformação que lhe confere atividade.
4. A observação de que o gene de *Anopheles merus* tenha sido expresso em levedura e em no sistema Baculovírus-*Spodoptera*, mas apresente atividade somente neste último sistema, sugere : a) a α -amilase de mosquito não adquire facilmente conformação ativa (o gene de α -amilase de *Zabrotes subfasciatus* é expresso com atividade em levedura); c) as células de insetos são muito versáteis na expressão com atividade de genes de qualquer origem, o que poderia indicar a existência de um sistema de chaperonas/chaperoninas muito mais eficiente do que os descritos até o momento.

6. Referências Bibliográficas

- Abe J, Shibata Y, Fujisue M, Hizukuri S.** (1996). Expression of periplasmic alpha-amylase of *Xanthomonas campestris* K-11151 in *Escherichia coli* and its action on maltose. *Microbiology*.142 (Pt 6):1505-12.
- ABIPRISM-Perkin Elmer Manual.**(1997).Model 177, Version 3.0 AB
- Ajandouz EH, Abe J, Svenson B, Marchis-Mouren G.**(1992). Barley malt-alpha-amylase. Purification, action pattern, and subsite mapping of isozyme 1 and two members of the isozyme 2 subfamily using p-nitrophenylated maltooligosaccharide substrates. *Biochim Biophys Acta*. 23;1159(2):193-202.
- Akazawa T, Mitsui T, Hayashi M.**(1988). Recent progress in α -amylase biosynthesis. In *The biochemistry of plants*, vol 14. Preiss, J (ed) Acad.Press San Diego, Calif, pp.465-492.
- Allet B, Bernard AR, Hochmann A, Rohrbach E, Graber P, Magnenat E, Mazzei GJ, Bernasconi L.**(1997). A bacterial signal peptide directs efficient secretion of eukaryotic proteins in the baculovirus expression system. *Protein Expr Purif* 9:61-8.
- Altmann F, Staudacher E, Wilson IB, März L.**(1999). Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoprotein. *Glycoconjugate Journal* 16: 109-123.
- Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Strhl K.**(1994). *Currents Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Willey Intersciences. NY
- Bahl H, Burchhardt G, Spreinat A, Haeckel K, Wienecke A, Schmidt B, Antranikian G.** (1991). Alpha-Amylase of *Clostridium thermosulfurogenes* EM1: nucleotide sequence of the gene, processing of the enzyme, and comparison of other alpha-amylases. *Appl Environ Microbiol* 57(5):1554-9
- Bahri SM, Ward JM** (1990).Cloning and expression of an alpha-amylase gene from *Streptomyces thermoviolaceus* CUB74 in *Escherichia coli* JM107 and *S. lividans* TK24. *J Gen Microbiol* ;136 (Pt 5):811-8.
- Bailey JM, Whelan WJ.** (1961). Physical properties of starch. Relationship between iodine stain and chain length. *J Biol Chem* 236: 969-73.
- Bertoft E, Andtfolk C, Kulp S-E.** (1984). Effect of pH, temperature, and calcium ions on barley malt a-amylase isoenzyme. *J. Inst. Brew.*90:298-302.
- Beuken E, Vink C, Bruggeman CA.**(1998). One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. *Biotechniques* 24(5):748-50.
- Birnboim HC, Doly J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*;7(6):1513-23
- Boer H, Teeri TT, Koivula A.**(2000). Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. *Biotechnol Bioeng* 69:486-94.
- Boer PH, Hickey DA.** (1986). The alpha-amylase gene in *Drosophila melanogaster*: nucleotide sequence, gene structure and expression motifs. *Nucleic Acids Res* 14(21):8399-411
- Bradford MM.**(1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

- Braun C, Lindhorst T, Madsen NB, Withers SG.** (1996). Identification of Asp 549 as the catalytic nucleophile of glycogen-debranching enzyme via trapping of the glycosyl-enzyme intermediate. *Biochemistry* 35(17):5458-63
- Bretthauer RK, Castellino FJ.**(199). Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol Appl Biochem* 30 (Pt 3):193-200.
- Buisson G, Duee E, Haser R, Payan F.**(1987). Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *EMBO J* 6(13):3909-16.
- Bustos, M. M., Luckow, V. A., Griffing, L. R., Summers, M. D. and Hall, T. C.** (1988). Expression, glycosylation and secretion of phaseolin in a baculovirus system. *Plant Mol. Biol.* 10: 475-488.
- Cereghino JL, Cregg JM** (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24:45-66.
- Chen W.Y.** (1991). Recombinant carbohydrate and selenomethionyl variants of human choriogonadotropin. *J. Biol. Chem* 266(13) : 8192-8197.
- Cigan AM, Pabich EK, Donahue TF.**(1988). Mutational analysis of the HIS4 translational initiator region in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8:2964-75.
- Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, Sreekrishna K, Romanos MA.** (1991). High-level Expression of Tetanus Toxin Fragment c in *Pichia pastoris* Strains containing Multiple Tandem Integrations of the Gene. *Bio/Technology* 9: 455-60.
- Clark RG, Hu YJ, Hynes MF, Salmon RK, Cheng KJ.** (1992). Cloning and expression of an amylase gene from *Streptococcus bovis* in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*;157(3):201-4.
- Clone 4 Program.**(1993).Version 4.0. Clone Manager. Scientific & Educational Software.
- Cohen J, Charpilienne A, Chilmonczyk S, Estes MK.** (1989). Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. *Virology*. 171:131-140.
- Cornel AJ, Coetzee M, Van Rensburg AJ, Koekemoer LL, Hunt RH, Collins FH.**(1997). Ribosomal DNA-polymerase chain reaction assay discriminates between *Anopheles quadriannulatus* and *An. merus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 34:573-7.
- Cornelis P, Digneffe C, Willemot K.** (1982). Cloning and expression of a *Bacillus coagulans* amylase gene in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*;186(4):507-1
- Cregg JM, Higgins DR.**(1995). Production of Foreign Proteins in the Yeast *Pichia pastoris*. *Canadian Journal Botany Supp* 73:5981-87
- Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA.**(1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* 9(3):1316-23
- Dahl SW, Slaughter C, Lauritzen C, Bateman RC Jr, Connerton I, Pedersen J.**(2000). Carica papaya glutamine cyclotransferase belongs to a novel plant enzyme subfamily: cloning and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expr Purif* 20:27-36.
- Dalbey RE, von Heijne G.**(1992). Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes-a new protease family. *Trends Biochem Sci* 17: 474-78.
- Derman AI, Prinz WA, Belin D, Beckwith J.**(1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* 262:1744-7.

- Devlin JJ, Devlin PE, Clark R, O'Rourke EC, Levenson C, Mark DF.** (1989). *BioTechnology* 7:286
- Dong G, Vieille C, Savchenko A, Zeikus JG.**(1997). Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular alpha-amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl Environ Microbiol* ;63(9):3569-76.
- Dupuis L, Canaan S, Riviere M, Wicker-Planquart C.** (1997). Influence of Various Signal Peptides Secretion of Mammalian Acidic Lipases in Baculovirus-Insect Cell System. *Methods in Enzymology* 284:261-272.
- Eisenhaber F, Persson B, Argos P.**(1995). Protein structure prediction: recognition of primary, secondary, and tertiary structural features from amino acid sequence. *Crit Rev Biochem Mol Biol*;30(1):1-94.
- Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold MM, Gingeras TR.** (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*;5(5):1111-21.
- Farber GK, Petsko GA.** (1990).The evolution of alpha/beta barrel enzymes. *Trends Biochem Sci* ;15(6):228-34.
- Fierobe HP, Mirgorodskaya E, Frandsen TP, Roepstorff P, Svensson B.**(1997). Overexpression and characterization of *Aspergillus awamori* wild-type and mutant glucoamylase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: comparison with wild-type recombinant glucoamylase produced using *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* as hosts. *Protein Expr Purif* 9:159-70.
- Fleming G.**(1986). Biología y ecología de los vectores de malaria en las Américas. *Organización Panamericana de la Salud-OMS* pp.9.
- Folgueras-Flatschart, A., Flatschart, R.B., Resende, M., Sogayar, M.C.**(2000). Early detection of Productive Baculovirus DNA Transfections. *Biotechnology* 29: 430-434
- Foster PG, Abukashawa S, Magoulas C, Hickey D.A.**(1993). Molecular Evolution of Mosquito alpha amylase genes (Genbank accession number U01210)
- French, D.**(1975). Chemistry and Biochemistry of Starch. In *Biochemistry of Carbohydrates* 5:267-355. London.
- Frillingos S, Linden A, Niehaus F, Vargas C, Nieto JJ, Ventosa A, Antranikian G, Drainas C.**(2000). Cloning and expression of alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. *J Appl Microbiol* ;88(3):495-503.
- Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas** (1994). Manual de Entomología Médica para investigadores de América Latina. B.L. Travi (Ed). Colombia pp.163-192.
- Gellissen G.** (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:741-50.
- Gemmill TR, Trimble RB.** (199). Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta* 1426:227-37.
- 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 Eng* 13:299-307.

- Grossi de Sá MF, Chrispeels MJ.**(1997). Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) alpha-amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochem Mol Biol* ;27(4):271-81.
- Grossman GL, Campos Y, Severson DW, James AA.**(1997). Evidence for two distinct members of the amylase gene family in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*;27(8-9):769-81.
- Grossman GL, James AA.** (1993). The salivary glands of the vector mosquito, *Aedes aegypti*, express a novel member of the amylase gene family. *Insect Mol Biol* 1: 223-32.
- Gussow D, Clackson T.**(1989). Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*;17(10):4000.
- Haeckel K, Bahl H.**(1989).Cloning and expression of the thermostable alpha-amylase gene from *Clostridium thermosulfurogenes* (DSM 3896) in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Let* ;51(3):333-7.
- Han Y, Lei XG.**(1999). Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys* 364:83-90.
- Hansen JE, Lund O, Tolstrup N, Gooley AA, Williams KL, Brunak S.**(1998). NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility. *Glycoconj J*;15(2):115-30.
- Harwood RF.** (1993). *Entomologia Médica y Veterinaria*. Limusa (Ed) México pp.232.
- Henrissat B, Bairoch A.** (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* 316: 695-6.
- Higgins DR, Cregg JM.** (1998).Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol*;103:1-15.
- Hoffman CS, Winston F.**(1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*;57(2-3):267-72.
- Holland IS, Mackman N, Nicaud JM.** (1986). Secretion of Proteins from Bacteria. *Biotechnology* 4:427-31.
- Holm L, Koivula AK, Lehtovaara PM, Hemminki A, Knowles JK.**(1990). Random mutagenesis used to probe the structure and function of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase. *Protein Eng*;3(3):181-91.
- Horinouchi S, Fukusumi S, Ohshima T, Beppu T.**(1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of two additional amylase genes of a strictly anaerobic thermophile, *Dictyoglomus thermophilum*, and their nucleotide sequences with extremely low guanine-plus-cytosine contents. *Eur J Biochem*;176(2):243-53.
- Hoshiko S, Makabe O, Nojiri C, Katsumata K, Satoh E, Nagaoka K.**(1987). Molecular cloning and characterization of the *Streptomyces hygroscopicus* alpha-amylase gene. *J Bacteriol*;169(3):1029-36.
- Hu NT, Hung MN, Huang AM, Tsai HF, Yang BY, Chow TY, Tseng YH.** (1992). Molecular cloning, characterization and nucleotide sequence of the gene for secreted alpha-amylase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Gen Microbiol*;138 (Pt 8):1647-55.

- Janecek S.**(1997). Alpha-Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog Biophys Mol Biol*;67(1):67-97.
- Janse BJ, Steyn AJ, Pretorius IS.**(1993). Regional sequence homologies in starch-degrading enzymes. *Curr Genet*;24(5):400-7.
- Jespersen HM, MacGregor EA, Henrissat B, Sierks MR, Svensson B.**(1993). Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural features of the catalytic (beta/alpha)₈-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *J Protein Chem*;12(6):791-805.
- Jorgensen S, Vorgias CE, Antranikian G.**(1997). Cloning, sequencing, characterization, and expression of an extracellular alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*;272(26):16335-42.
- Juge N, Andersen JS, Tull D, Roepstorff P, Svensson B.**(1996). Overexpression, purification, and characterization of recombinant barley alpha-amylases 1 and 2 secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* ;8(2):204-14.
- Kadziola A, Abe J, Svensson B, Haser R.**(1994). Crystal and molecular structure of barley alpha-amylase. *J Mol Biol* ;239(1):104-21.
- Kawata Y, Hongo K, Mizobata T, Nagai J.**(1998). Chaperonin GroE-facilitated refolding of disulfide-bonded and reduced Taka-amylase A from *Aspergillus oryzae*. *Protein Eng*;11(12):1293-8.
- Kim CH, Sata H, Taniguchi H, Maruyama Y.**(1990). Cloning and expression of raw-starch-digesting alpha-amylase gene from *Bacillus circulans* F-2 in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* ;1048(2-3):223-30.
- Kimura T, Horikoshi K.**(1990).The nucleotide sequence of an alpha-amylase gene from an alkalopsychrotrophic *Micrococcus* sp. *FEMS Microbiol Lett* ;59(1-2):35-41.
- Klein C, Hollender J, Bender H, Schulz GE.**(1992). Catalytic center of cyclodextrin glycosyltransferase derived from x-ray structure analysis combined with site-directed mutagenesis *Biochemistry*; 31(37); 8740-8746.
- Kloke RG.** (1997). New distribution record of *Anopheles merus* Dönitz (Diptera: Culicidae) in Zambia. *African Entomology* Vol 5: 361–362
- Knutson CA.**(1993). Reaction patterns of maize α -amylases with soluble starch, granular starch, and maltooligosaccharides. *Cereal Chem*;70: 534-538
- 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 selection of signal sequence on level of expression in the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Eng* 4:705-10.
- Koivula TT, Hemila H, Pakkanen R, Sibakov M, Palva I.**(1993). Cloning and sequencing of a gene encoding acidophilic amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *J Gen Microbiol*;139 (Pt 10):2399-407.
- Kondo H, Nakatani H, Hiromi K, Matsuno R.**(1978).Multiple attack in porcine pancreatic α -amylase catalyzed hydrolysis of amylose studied with a fluorescence probe. *J. Biochem (Tokyo)*; 84 : 403-417.
- Koutz P, Davis GR, Stillman C, Barringer K, Cregg J, Thill G.**(1989). Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast*;5(3):167-77.

- Kozak M.**(1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15:8125-48.
- Kozak M.**(1990). Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8301-5.
- Kozak M.**(1996). Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm Genome* 7:563-74.
- Kozak M.**(1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234:187-208.
- Kumagai MH, Donson J, della-Cioppa G, Grill LK.**(2000). Rapid, high-level expression of glycosylated rice alpha-amylase in transfected plants by an RNA viral vector. *Gene*;245(1):169-74.
- Kuriki T, Guan H, Sivak M, Preiss J.**(1996). Analysis of the active center of branching enzyme II from maize endosperm. *J Protein Chem*;15(3):305-13.
- Kuriki T, Imanaka T.**(1989). Nucleotide sequence of the neopullulanase gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J Gen Microbiol*;135 (Pt 6):1521-8.
- Laderman KA, Asada K, Uemori T, Mukai H, Taguchi Y, Kato I, Anfinsen CB.**(1993). Alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. Cloning and sequencing of the gene and expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*;268(32):24402-7.
- Lanford RE, Luckow V, Kennedy RC, Dreesman GR, Notvall L, Summers MD.**(1989). Expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen polypeptides in insect cells with a baculovirus expression system. *J Virol* 63:1549-57.
- Larson SB, Greenwood A, Cascio D, Day J, McPherson A.**(1994). Refined molecular structure of pancreatic alpha-amylase at 2.1Å resolution. *J Mol Biol* 235:1560-1584.
- Lee SP, Morikawa M, Takagi M, Imanaka T.**(1994). Cloning of the aapT gene and characterization of its product, alpha-amylase-pullulanase (AapT), from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. strain XAL601. *Appl Environ Microbiol*; 60(10):3764-73.
- Leveque E, Haye B, Belarbi A.**(2000). Cloning and expression of an alpha-amylase encoding gene from the hyperthermophilic archaeobacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterisation of the recombinant enzyme. *FEMS Microbiol Lett*;186(1):67-71.
- Liao YF, Lal A, Moremen KW.**(1996). Cloning, expression, purification, and characterization of the human broad specificity lysosomal acid alpha-mannosidase. *J Biol Chem* 271:28348-58.
- Luckow VA.**(1991). Cloning and expression of heterologous genes in Insect cells with baculovirus vector. In *Recombinant DNA technology and applications*. Eds. Prokop, A., Bajpai, RK., Ho, CS. McGraw Hill, Ins., NY.
- Lunn CA, Takahara M, Inouye M.**(1986). Use of secretion cloning vectors for guiding the localization of proteins in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* 125:138.
- MacGregor EA, Svensson B.**(1989). A super-secondary structure predicted to be common to several alpha-1,4-D-glucan-cleaving enzymes. *Biochem J*;259(1):145-52.

- Machius M, Wiegand G, Huber R.**(1995). Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* alpha-amylase at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol*;246(4):545-59.
- Mandel M, Higa A.**(1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53:159-62.
- Manual Bac-to-Bac** (1996). GIBCO.
- Marinotti O, James AA.** (1990). An α -glucosidase in the salivary glands of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry* 20: 619-23.
- Mathupala SP, Lowe SE, Podkovyrov SM, Zeikus JG.**(1993). Sequencing of the amylopullulanase (apu) gene of *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E, and identification of the active site by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*;268(22):16332-44.
- Matssura Y, Kusunoki M, Harada W, Kakudo M.**(1984). Structure and Possible Catalytic Residues of Taka-Amylase A. *J. Biochem* 95:697-702.
- Matsui I, Ishikawa K, Matsui E, Miyairi S, Fukui S, Honda K.**(1991). Subsite structure of *Saccharomycopsis* alpha-amylase secreted from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem (Tokyo)*;109(4):566-9.
- McCarter JD, Withers SG.**(1996). Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides. *J Biol Chem*;271(12):6889-94.
- Melasniemi H, Paloheimo M.**(1989). Cloning and expression of the *Clostridium thermohydrosulfuricum* alpha-amylase-pullulanase gene in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*;135 (Pt 6):1755-62.
- Mnzava AEP, Sharp BL, Cuamba N, Barreto A.**(1997). Malaria vector studies in Maputo, Mozambique-Implications for control. *S Afr Med J*; 87(11): 1611-14
- Montesino R, Garcia R, Quintero O, Cremata JA.**(1998). Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*;14(2):197-207.
- Morton RE, Evans TA.**(1992). Modifications of the bicinchonic acid protein assay to eliminate protein interference in determining lipid protein content. *Anal Biochem* 204: 332-334
- Nagashima T, Tada S, Kitamoto K, Gomi K, Kumagai C, Toda H.**(1992). Site-directed mutagenesis of catalytic active-site residues of Taka-amylase A. *Biosci Biotechnol Biochem*;56(2):207-10.
- Nakajima R, Imanaka T, Aiba S.**(1986). Comparison of amino acid sequence of eleven different α -amylases. *Appl Microbio Biotechnol* 23:355-360.
- Nakamura A, Haga K, Yamane K.**(1994). Four aromatic residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011: effects of replacements on substrate binding and cyclization characteristics. *Biochemistry*;33(33):9929-36.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G.**(1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*;10(1):1-6.
- Nonato RV, Shishido K.**(1988). Alpha-factor-directed synthesis of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 152:76-82.

- O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA.** (1992). Baculovirus expression vectors : A Laboratory Manual. Freeman & Co. NY. pp.221-225.
- Oyama T, Myojin M, Nitta Y, Toda H, Nagashima T, Kitamoto K.** (1996). Properties of Taka-amylase A with Glu230 or Asp297 of the catalytic residue replaced by the corresponding amine. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1351-1352
- Paifer E, Margolles E, Cremata J, Montesino R, Herrera L, Delgado JM.**(1994). Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. *Yeast*;10(11):1415-9.
- Pazur JH, Okada D.** (1966). A Novel Method for the Action Patterns and the diferention of O-1,4- glucan hidrolases. *J Biol Chem* 241:4146.
- Penninga D, Strokopytov B, Rozeboom HJ, Lawson CL, Dijkstra BW, Bergsma J, Dijkhuizen L.**(1995). Site-directed mutations in tyrosine 195 of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 affect activity and product specificity. *Biochemistry*;34(10):3368-76.
- Pernasetti F.** (1991). Isolamento e sequenciamento de um gene de alfa amilase de *Anopheles merus*: *Tese de Mestrado*. Instituto de Química. Universidade de Sao Paulo.
- Podkovyrov SM, Burdette D, Zeikus JG.**(1993). Analysis of the catalytic center of cyclomaltodextrinase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E. *FEBS Lett*; 317(3):259-62.
- pRSETc.**(1997).Manual. Invitrogen.
- QIAGEN.**(1997). The QIA expressionest. 3thrd. Manual.
- Qian M, Haser R, Buisson G, Duée E, Payan F.**(1994). The active center of a mammalian alpha-amylase. Structure of the complex of a pancreatic alpha-amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2 Å resolution. *Biochemistry* 33(20): 6284-6294.
- Qian, M., Haser, R., Payan, F.**(1995). Carbohydrate binding sites in a pancreatic alpha-amylase-substrate complex, derived from X-ray structure analysis at 2.1Å. *Prot.Sci.*4(4) :747-755.
- Randall L, Hardy SJ.**(1984). Export of Protein in Bacteria. *Microbiol Review* 48: 290-98.
- Ribeiro JM, Rowton ED, Charlab R.** (2000). Salivary amylase activity of the phlebotomine sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochem Mol Biol* 30(4):271-7.
- Richardson CD.** (1995). Baculovirus expression protocols. *Methods in Molecular Biology* Vol 39. Humana Press, NJ.
- Robyt J, French D.** (1963). Action Pattern and Specificity of an Amylase from *Bacillus subtilis*. *Arch Biochem Biophys* 100:451-467.
- Robyt JF, French D.**(1967). Multiple attack of α -amylase action : action of porcine, pancreatic, human, salivary and *Aspergillus orizae* α -amylase. *Arch.Biochem. Biophys* 122: 8-16.
- Romanos M.**(1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for High-Level Expression. *Curr Opin Biotech* 6:527-533
- Rydberg EH, Sidhu G, Vo HC, Hewitt J, Cote HC, Wang Y, Numao S, MacGillivray RT, Overall CM, Brayer GD, Withers SG.**(1999). Cloning, mutagenesis, and structural analysis of human pancreatic alpha-amylase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Sci*;8(3):635-43.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci (U S A)*;74(12):5463-7.
- Service MW.** (1993). Mosquitoes (Culicidae) In *Medical Insects and Arachnids* (R.P. Lane & R.W. Grosskey, eds) Chapman & Hall, London, pp.120-240.
- Silva EF.** (1989). Clonagem do gene de uma amilase termo-estavel em *E.coli* e *B.subtilis*. Estudo de sua expressao em *E.coli*. *Tese de Mestrado*. Instituto de Química. Universidade de São Paulo.
- Sin KA, Nakamura A, Masaki H, Matsuura Y, Uozumi T.** (1994). Replacement of an amino acid residue of cyclodextrin glucanotransferase of *Bacillus ohbensis* doubles the production of gamma-cyclodextrin. *J Biotechnol*;32(3):283-8.
- Slusher LB, Gillman EC, Martin NC, Hopper AK.** (1991). mRNA leader length and initiation codon context determine alternative AUG selection for the yeast gene MOD5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9789-93.
- Smith PK, Khron RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC.** (1985). Measurements of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85
- Sogaard M, Kadziola A, Haser R, Svensson B.** (1993). Site-directed mutagenesis of histidine 93, aspartic acid 180, glutamic acid 205, histidine 290, and aspartic acid 291 at the active site and tryptophan 279 at the raw starch binding site in barley alpha-amylase 1. *J Biol Chem*;268(30):22480-4.
- Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wierschke JD, Subramaniam A, Birkenberger LA.** (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*;190(1):55-62.
- Sreekrishna K, Kropp KE.** (1996). *Pichia pastoris*. In *Non conventional yeast in biotechnology*. Springer Verlag, Berlin pp.203-252.
- Steup M.** (1988). Starch degradation. In: *The biochemistry of plants* .vol 14 Eds. Preiss, J. Academic Press, San Diego, Calif, pp255-296.
- Stoesser G, Sterk P, Tuli MA, Stoehr PJ, Cameron GN.** (1997). The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res*;25(1):7-14.
- Strobl S, Gomis-Ruth FX, Maskos K, Frank G, Huber R, Glockshuber R.** (1997). The α -amylase from the yellow meal worm: complete primary structure, crystallization and preliminary X-ray analysis. *FEBS Lett* 409: 109-114.
- Strobl S, Maskos K, Betz M, Wiegand G, Huber R, Gomis-Ruth FX, Glockshuber R.** (1998). Crystal structure of yellow meal worm alpha-amylase at 1.64Å resolution. *J.Mol.Biol.* 278(3) : 617-628.
- Sturchler D.** (1989). How much malaria is there worldwide? *Parasitology Today* 5: 39-40.
- Suzuki Y, Ishihara D, Sasaki M, Nakagawa H, Hata H, Tsunoda T, Watanabe M, Komatsu T, Ota T, Isogai T, Suyama A, Sugano S.** (2000). Statistical analysis of the 5' untranslated region of human mRNA using "Oligo-Capped" cDNA libraries. *Genomics* 64:286-97.
- Svensson B.** (1988). Regional distant sequence homology between amylases, α -glucosidases and transglucanoylases. *FEBS Lett* 23:72-76.

- Takase K.**(1994). Site-directed mutagenesis reveals critical importance of the catalytic site in the binding of alpha-amylase by wheat proteinaceous inhibitor. *Biochemistry*;33(25):7925-30.
- Takata H, Takaha T, Kuriki T, Okada S, Takagi M, Imanaka T.**(1994). Properties and active center of the thermostable branching enzyme from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol*;60(9):3096-104.
- Terashima M, Kawai M, Kumagai MH, Rodriguez RL, Katoh S.**(1996). Characteristic of a Chimera Enzyme Engineered from Two Rice alpha-amylases. *Appl Biotechnol* 45: 607-611.
- Terashima M, Kubo A, Suzawa M, Itoh Y, Katoh S.** (1994). The roles of the N-linked carbohydrate chain of rice α -amylase in thermostability and enzyme kinetics. *Eur.J.Biochem* 226(1) : 249-254.
- Terra WR, Ferreira C.**(1994). Insect digestive enzyme: properties, compartmentalization and function. *Comp.Biochem.Physiol.* 109B,1-62.
- Terra WR.** (1990). Evolution of digestive systems of insects. *Annu Rev Entomol* 35:181-200.
- Tessier DC, Thomas DY, Khouri HE, Laliberte F, Vernet T.**(1991). Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene* 98:177-83.
- Titarenko E, Chrispeels MJ.**(2000). cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect.Biochem.Mol.Biol*; 30(10): 979-990.
- Tokunaga M, Ishibashi M, Tatsuda D, Tokunaga H.**(1997). Secretion of mouse alpha-amylase from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 30;13(8): 699-706.
- Trevelyan WE, Procter DP, Harrison JS.** (1950).Detection of Sugars on Paper Chromatograms. *Nature* 66 : 444-45.
- Trevors JT, Chassy BM, Dower WJ., Blaschek HP.**(1992). Electrotransformation of bacteria by plasmid DNA. In *Guide to Electroporation and Electrofusion*. Chang DC, Chassy BM, Saunders JÁ, Sowers AE (Eds). Chap.17. Acad. Press,San Diego, California, USA
- Tsukagoshi N, Ihara H, Yamagata H, Uda S.**(1984). Cloning and expression of a thermophilic alpha-amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*;193(1):58-63.
- Tull D, Gottschalk TE, Svendsen I, Kramhoft B, Phillipson BA, Bisgard-Frantzen H, Olsen O, Svensson B.**(2001). Extensive N-glycosylation reduces the thermal stability of a recombinant alkalophilic bacillus alpha-amylase produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*;21(1):13-23.
- Van den Steen P, Rudd PM, Proost P, Martens E, Paemen L, Kuster B, van Damme J, Dwek RA, Opdenakker G.**(1998). Oligosaccharides of recombinant mouse gelatinase B variants. *Biochim Biophys Acta* 1425:587-98.
- van Handel E, Haeger JS, Hansen CW.** (1972). The sugars of some Florida nectars. *A. J Bot* 59: 1030-32.
- Van Rensburg AJ, Hunt RH, Koekemoer LL, Coetzee M, Shiff CJ, Minjas J.** (1996). The polymerase chain reaction method as a tool for identifying members of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae) in northeastern Tanzania. *J Am Mosq Control Assoc* 12(2 Pt 1):271-4.

- Verhasselt P, Poncelet F, Vits K, Van Gool A, Vanderleyden J.**(1989). Cloning and expression of a *Clostridium acetobutylicum* alpha-amylase gene in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*;50(1-2):135-40.
- Vigal T, Martin JF, Gil JA.**(1994). Expression of the *Streptomyces griseus* alpha-amylase gene in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*;118(3):259-63.
- Vihinen M, Matsälä P.**(1989). Microbial amylolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 24(4): 329-418
- Vihinen M, Ollikka P, Niskanen J, Meyer P, Suominen I, Karp M, Holm L, Knowles J, Mantsala P.**(1990). Site-directed mutagenesis of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: putative role of three conserved residues. *J Biochem (Tokyo)*;107(2):267-72.
- Vilela C, Linz B, Rodrigues-Pousada C, McCarthy JE.**(1998). The yeast transcription factor genes YAP1 and YAP2 are subject to differential control at the levels of both translation and mRNA stability. *Nucleic Acids Res* 26:1150-9.
- Waibel AH, Hanazawa T, Hinton GE, Shikano K, Lang KJ.**(1989). Phoneme Recognition Using Time-Delay Neural Networks. In *IEEE Transaction on Acoustic, Speech and Signal Processing* Vol.37(3):328-339.
- Watanabe K, Kitamura K, Iha H, Suzuki Y.**(1990). Primary structure of the oligo-1,6-glucosidase of *Bacillus cereus* ATCC7064 deduced from the nucleotide sequence of the cloned gene. *Eur J Biochem*;192(3):609-20.
- White GB.** (1985). Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex *Mosq Syst* 10: 13-44.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION.** (1990). Practical Chemotherapy of Malaria. *Technical Report Series* 805.
- Zhu W, Wu N.**(1992). Expression and secretion of alpha-amylase gene from *Bacillus subtilis* in *E. coli* *Wei Sheng Wu Xue Bao*;32(4):296-8.