

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)**

DANIELA BETON

**Estrutura e função das cisteína proteinases
intestinais do besouro *Tenebrio molitor***

São Paulo

Data de Depósito na SPG:
09/10/2009

DANIELA BETON

**Estrutura e função das cisteína proteinases
intestinais do besouro *Tenebrio molitor***

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

Orientador: Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra

São Paulo

2009

DANIELA BETON

Estrutura e função das cisteína proteinases intestinais do besouro *Tenebrio molitor*

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico...

...a meus pais que sempre me
incentivaram para a realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra, pelos ensinamentos, conselhos e competente orientação que tornaram possível a execução deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Clélia Ferreira, pelas discussões durante este projeto e pelo tratamento carinhoso.

Ao Prof. Dr. Shaker Chuck Farah e a sua aluna Cristiane Guzzo, pela ajuda essencial na cristalização, obtenção e coleta de dados de difração de raios-X dos cristais e na determinação das estruturas cristalográficas das pró-catepsinas L digestivas.

Ao Prof. Alberto de Freitas Ribeiro e ao Waldir pela colaboração nos experimentos de imunocitocalização.

Ao Prof. Luiz Juliano, à Prof^a. Dr^a. Maria Juliano e a Isaura Yoshico Hirata pelo seqüenciamento N-terminal.

Ao Prof. Sandro Roberto Marana, pelas dicas e protocolos de expressão em levedura e pelo vetor de expressão pET28a.

A Prof^a. Dr^a. Aline Maria da Silva pelas cepas bacterianas BL21(DE3) e BL21(DE3)PLysS .

Ao Dr. Julio Cesar Levano Garcia pelas dicas valiosas da cepa bacteriana OrigamiB(DE3).

A Dr^a. Fabiane Chaves Cançado pela valiosa ajuda no programa PyMol.

A Luci Deise Navarro pelo seqüenciamento de DNA.

Aos amigos que me acompanharam desde o começo, Daniela C. Gonzalez Kristeller, Juliana M. de Souza Canavez, Andréa C. Fogaça, Michelle Susin, Alexandre Sanchez e Raquel Bagattini pela dedicação, carinho e amizade.

Aos amigos Layla F. Martins, Maria Cícera P. da Silva, Fabiane Chaves Cançado, Lúcio M. Ferreira de Mendonça e Luci Deise Navarro pela ajuda e amizade.

Aos amigos do laboratório Nathália Ramalho, Fábio Tamaki, Thaís Bifano, Érica Moreira, Fernando Genta, Ana Gómez Duran, Alexandra Dumont, Lucas

Guerra, Ivan Bragatto, Marcelo Padilha, André Pimentel, Walciane da Silva, Adriana Lopes, Bruno Lira, Fábio Mendes, Pedro Tizei, Thiago Alegria, Augusto Crivellari e Flávia Bartolleti, pelo apoio e convivência.

À Luiza Nakabayashi, M. Ivanilde Marcelino e Christiane Cardoso pelo apoio técnico e, principalmente, pela amizade.

Aos amigos do bloco 9, Luciana, Alessandra, Milton, Érica, Sara, Alessandro, Humberto, Carol, Paloma, Flávia Terzini, Flávia e Ana Claudia pelo apoio e principalmente pelos momentos de descontração.

Aos demais amigos do Instituto: Renato Raposo, Patrícia, Chico, Yvone, Karina, Rafaela, Sílvia, Sandra, Rogério, André, Ana Laura, Diogo, Prof^a. Dr^a. Regina, Isaura, Flávia, Renato, Julio C.L. Garcia, Denise, Adriana, Diorge, Max, Priscila, Maira, Larissa, Júlio, Lúcia e Juliana.

Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP pela infraestrutura para realização deste trabalho.

Ao laboratório Nacional de luz Síncrotron pela infraestrutura para a coleta de dados de difração de raios-X dos cristais da pró-catepsinas L digestivas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

Beton, D. **Estrutura e função das cisteína proteinases intestinais do besouro *Tenebrio molitor***. 2009.165p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

A catepsina L é uma cisteína proteinase da família da papaína (clã CA, família C1), sendo esta família a mais conhecida entre as cisteína proteinase. A catepsina L, como outras proteinases da família C1, é sintetizada como uma pró-enzima inativa que é ativada através da remoção do pró-peptídeo. Os pró-peptídeos das catepsinas da subfamília catepsina L apresentam um motivo consenso, denominado motivo ERFNIN. A catepsina L corresponde a principal proteinase digestiva em *Tenebrio molitor*. No nosso laboratório 3 pró-catepsinas L (pCALs) foram clonadas e seqüenciadas a partir de uma biblioteca de cDNA de intestino médio de larvas de *T. molitor*: pCAL1 (CAL lisossomal), pCAL2 e pCAL3 (enzimas digestivas). Estas proteinases apresentam o motivo ERFNIN e os resíduos envolvidos na catálise: Cys25, His169, e Asn175 com Gln19 (numeração da papaína). Neste trabalho descrevemos a clonagem em vetores de expressão e a expressão em bactérias das sequências codificadoras de pCAL1, pCAL2 e pCAL3. As pró-catepsinas L recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade e a incubação em pH ácido resultou na formação das enzimas maduras CAL1, CAL2 e CAL3 com atividade sobre o substrato Z-FR-MCA. O anticorpo policlonal anti-pCAL2 foi produzido em coelho e reconheceu pCAL2 e CAL2 em *immunoblots*. Experimentos de *immunoblots* com diferentes tecidos de *T. molitor* mostraram que o anticorpo policlonal anti-pCAL3 reconheceu pCAL3 e CAL3 nos dois terços anteriores do intestino médio de larvas de *T. molitor*. Estudos de imunocitocalização indicam que

a catepsina L 3 ocorre em vesículas no intestino médio anterior e em microvilosidades no intestino médio posterior. Para os experimentos de cristalização, nós expressamos pCAL1, pCAL2 e pCAL3 como mutantes Cys25→Ser inativos. pCAL3Cys26Ser foi cristalizada por difusão de vapor (gota sentada) contra 0,1–1,6M de dihidrogênio fosfato de amônio. Os cristais são monoclinicos com grupo espacial C2 e parâmetros de célula: $a=57,634 \text{ \AA}$, $b=89,322 \text{ \AA}$, $c=70,076 \text{ \AA}$, $\alpha=\gamma=90^\circ$, $\beta=92,502^\circ$ e uma molécula na unidade assimétrica. A estrutura foi determinada por substituição molecular usando a estrutura de *Fasciola hepatica* (42% de identidade) como modelo. O modelo foi refinado a $2,1 \text{ \AA}$ com fator R final de 16,19% ($R_{\text{free}}=20,5\%$). pCAL2Cys25Ser foi cristalizada por difusão de vapor (gota sentada) contra acetato de sódio 0,2M, cacodilato de sódio 0,1M pH6,6-6,7 e 20% de PEG 8000. Os cristais são triclinicos com grupo espacial P1 e parâmetros de célula: $a=51,669 \text{ \AA}$, $b=52,37 \text{ \AA}$, $c=59,716 \text{ \AA}$, $\alpha= 91,278^\circ$, $\gamma=109,586^\circ$, $\beta=91,547^\circ$ e duas moléculas na unidade assimétrica. A estrutura foi determinada por substituição molecular usando a estrutura da pCAL3 (44% de identidade) como modelo. O modelo foi refinado a $2,0 \text{ \AA}$ com fator R final de 17,61% ($R_{\text{free}}=22,48\%$). A estrutura terciária da pró-catepsinas L digestivas é muito similar as estruturas de cisteína proteinases da família da papaína.

Palavras chave: pró-catepsina L, catepsina L, *Tenebrio molitor*

ABSTRACT

Beton, D. **Structure and function of intestinal cysteine proteinases of *Tenebrio molitor* beetle.** 2009. 165p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cathepsin L is a cysteine proteinase of the papain family (clan CA, family C1), which is the most known among the cysteine proteinases. Cathepsin L, like other proteinases of family C1, is synthesized as an inactive proenzyme that is activated by propeptide removal. The propeptide of cathepsin L-like subfamily contain a highly conserved motif, the so called ERFNIN motif. Cathepsin L corresponds to the major digestive proteinase in *Tenebrio molitor*. In our laboratory, 3 procathepsins L (pCALs) were cloned and sequenced from a cDNA library prepared from *T. molitor* larval midguts: pCAL1 (lysosomal CAL), pCAL2 and pCAL3 (digestive enzymes). These proteinases have ERFNIN motif and 3 residues directly involved in catalysis: Cys25, His169, Asn175 with Gln19 (papain numbering). In this work we report the cloning into the expression vector and bacterial expression of the sequences coding pCAL1, pCAL2 and pCAL3. The recombinant procathepsins L were purified by affinity chromatography and activation of these enzymes occurs under acidic conditions. The cathepsins L (CAL1, CAL2 and CAL3) were able to hydrolyse Z-FR-MCA. The polyclonal antibody anti-pCAL2 was produced in rabbit and recognized pCAL2 and CAL2 on immunoblots. Immunoblot analyses of different *T. molitor* larval tissues demonstrated that the polyclonal antibody anti-pCAL3 recognised pCAL3 and CAL3 in the anterior two-thirds of midgut tissue of *T. molitor* larvae. Immunolocalization studies indicate that cathepsin L 3 occurs in vesicles in the anterior midgut and microvilli in posterior midgut. To crystallographic studies we expressed pCAL1, pCAL2 and pCAL3 as inactive Cys25→Ser mutants. pCAL3Cys26Ser was

crystallized by vapor diffusion in sitting drops against 0.1-1.6 M mono-ammonium dihydrogen phosphate. The crystals are monoclinic, belonging to space group C2, with cell parameters: $a = 57.634 \text{ \AA}$, $b = 89.322 \text{ \AA}$, $c = 70.076 \text{ \AA}$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 92.502^\circ$ and contain one molecule in the asymmetric unit. The structure was determined by molecular replacement using the structure of *Fasciola hepatica* procathepsin L (42.5% identity) as a model. The model was refined at 2.1 \AA resolution with an R factor of 16.19% ($R_{\text{free}} = 20.5\%$). pCAL2Cys25Ser was crystallized by vapor diffusion in sitting drops against 0.2M sodium acetate, 0.1M sodium cacodylate pH 6.6-6.7 and 20% polyethylene glycol 8,000. The crystals are triclinic, belonging to space group P1, with cell parameters: $a = 51.669 \text{ \AA}$, $b = 52.37 \text{ \AA}$, $c = 59.716 \text{ \AA}$, $\alpha = 91.278^\circ$, $\gamma = 109.586^\circ$, $\beta = 91.547^\circ$ and contain two molecules in the asymmetric unit. The structure was determined by molecular replacement using the structure of procathepsin L 3 (44 % identity) as a model. The model was refined at 2.0 \AA resolution with an R factor of 17.61% ($R_{\text{free}} = 22.48\%$). The tertiary structure of digestive procathepsins L is very similar to papain-like cysteine proteinases structures.

Keywords: procathepsins L, cathepsin L, *Tenebrio molitor*

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

