

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

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

**IVAN BRAGATTO**

**Sequências, propriedades e função de  $\beta$ -1,3-  
glucanases de insetos**

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

São Paulo

Data do Depósito na SPG:  
**17/10/2011**

IVAN BRAGATTO

**Sequências, propriedades e função de  $\beta$ -1,3-  
glucanases de insetos**

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

*Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Clélia Ferreira*

São Paulo

2011



## **AGRADECIMENTOS**

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

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

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

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

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

Às agências de fomento CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro.

## RESUMO

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

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

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



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

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

# Sumário

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

## 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:

