

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**UREASES DE *Canavalia ensiformis* E PEPTÍDEO INSETICIDA DERIVADO**

**Fernanda Mulinari Fontana**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Orientadoras:**

**Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini**

**Dra. Maria Fátima Grossi de Sá**

Porto Alegre

Março 2008

## **Instituições e Fontes Financiadoras**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF e Laboratório de Proteínas Tóxicas, do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, sob a orientação da Dra. Célia Regina R. S. Carlini e da Dra. Maria Fátima Grossi de Sá.

Os auxílios financeiros foram obtidos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD-CAPES), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (MCT/PRONEX), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **Banca Examinadora**

Dra. Eleonora Kurtenbach

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,

Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia

Instituto de Biociências, Departamento de Genética  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – CBiot  
Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Diego Bonatto

Membro suplente da banca examinadora  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Instituto de Biotecnologia  
Universidade de Caxias do Sul

Dedico esta tese  
À minha filha Luiza, luz da minha vida.  
Ao meu marido, meu grande amor.

“Ninguém é tão grande que não possa aprender,  
nem tão pequeno que não possa ensinar”

Píndaro

## Agradecimentos

Chego ao final desta tese tendo muito a agradecer a muitas pessoas que marcaram essa jornada. Se por um lado, sinto uma sensação gratificante, por todo esforço, estudo e trabalho empenhados, por outro, brota um sentimento confuso, talvez saudades desta etapa que agora se encerra.

Passaram-se quatro anos, mas tantas coisas aconteceram que poderia ter sido uma década. Ao mesmo tempo, estranhamente, os dias passaram depressa, com tanta animação no laboratório de Interação Molecular Planta Praga, da Embrapa. Os colegas, que se tornaram grandes amigos, tornaram meus dias mais felizes. Agradeço por cada um desses dias. Pelas “cantorias”, a alegria e o alto-astral de todos os colegas. Agradeço por toda ajuda e por todo conhecimento que compartilharam comigo.

Minhas grandes amigas Liziane e Janaína, obrigada pelo apoio, pelos conselhos e pela companhia.

Não posso deixar de mencionar a “parceria” da Railene, da Liziane, do Osmundo e da Mariana, até tarde no laboratório.

Obrigada Isabela e Ete, pela amizade e por tanto carinho.

Ao Osmundo, pelo auxílio, sempre disposto a ajudar e pela revisão desta tese.

Aos meus alunos de Iniciação Científica Daniel, Ísis e Priscilla, pela oportunidade de trocar experiências, pelo desafio e por terem me ensinado tanto.

Agradeço aos amigos do Laprotox, da UFRGS, pelas colaborações nos trabalhos, pela amizade e apoio, mesmo em tempos em que a distância nos separou. Quantas idas e vindas... Mas quando chegava ao laboratório, sentia-me como se nunca tivesse saído. Senti muita falta de todos, nas minhas “andanças”. Saibam que aprendi muito com vocês.

Na verdade, cada partida de um laboratório era uma tristeza, mas cada chegada no outro, uma alegria, sucessivamente...

Ao “trio”: eu, Diogo e German. A nossa amizade é para a vida inteira. Na verdade, Deiber, acho que éramos um “quarteto”...

Obrigada “mãe Martha” e Arlete por tantas conversas e pelo carinho.

Agradeço também aos amigos de Formosa, em especial à Elaine, Vilmo e João Pedro, que me deram força para continuar, nos momentos mais delicados desta etapa.

Aos meus pais, pelos ensinamentos mais preciosos da vida.

Meus irmãos Márcia e Eduardo e sobrinhos Priscila e Daniel, que compreenderam a distância e sempre foram uma inspiração para seguir adiante.

Ao meu irmão Rodrigo e minha cunhada Emanuele. Talvez vocês não saibam a dimensão da importância do apoio de vocês. Obrigada por tudo!

Às minhas orientadoras Célia e Fátima que, cada qual a sua maneira, me guiaram nesta jornada, os meus agradecimentos:

Fátima, agradeço imensamente todo apoio, a receptividade no laboratório e todos os seus ensinamentos. Você me ensinou principalmente a ser forte e nunca desistir.

Célia, obrigada pelas oportunidades singulares que me deste, por ter me ajudado a realizar grandes sonhos e principalmente pela confiança. Carrego comigo todos os teus ensinamentos. Foram tantos anos de aprendizado e espero que sejam muitos mais.

Agradeço ao meu marido, Leomar, por todo apoio, incentivo e por compreender minha ausência e a distância. Obrigada pela paciência, amor e carinho.

Minha filha Luiza, nunca pensei que pudesse aprender tanto contigo. Obrigada por ter me tornado uma pessoa melhor.

Agradeço, por fim, mas em primeiro grau de importância, a Deus.

## ÍNDICE

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>x</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 Ureases .....	18
1.2 Estrutura das ureases .....	19
1.3 Ativação da urease: proteínas acessórias .....	20
1.4 Ureases de <i>Canavalia ensiformis</i> .....	21
1.5 Função fisiológica das ureases em plantas .....	24
1.6 Peptídeos inseticidas derivados de ureases .....	27
<b>2 FORMATO E ORGANIZAÇÃO DA TESE</b> .....	<b>29</b>
<b>Capítulo 1. Clonagem e modelagem molecular de uma isoforma de urease de <i>Canavalia ensiformis</i></b> .....	<b>30</b>
Justificativa .....	31
Materiais e Métodos .....	32
Resultados e Discussão .....	36
<b>Capítulo 2. Sobreposição dos fragmentos e clonagem de <i>jbure-II B</i> completo para expressão em sistema heterólogo</b> .....	<b>52</b>
Justificativa .....	53
Materiais e Métodos .....	54
Resultados e Discussão .....	59
<b>Capítulo 3. Peptídeo inseticida (<i>jaburetox-2</i>) derivado de uma isoforma de urease de <i>Canavalia ensiformis</i>: expressão heteróloga, bioensaios e modelagem molecular</b> .....	<b>71</b>
3A. <i>Jaburetox-2Ec</i> : An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant <i>Canavalia ensiformis</i> .....	72
3B. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant <i>E. coli</i> encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity .....	72
“Enzyme and Microbial Technology 41 (2007) 821–827” .....	72
3C. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug <i>Dysdercus peruvianus</i> (Hemiptera: Pyrrhocoridae) .....	72

<b>Capítulo 4. Transformação de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) com o peptídeo inseticida jaburetox-2 .....</b>	<b>104</b>
Justificativa .....	105
Materiais e métodos .....	106
Resultados e Discussão .....	111
<b>3 DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>120</b>
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>132</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>147</b>
<b>Anexo 1 Protocolos gerais.....</b>	<b>148</b>
A. Purificação de DNA a partir de gel de agarose.....	149
B. Transformação de <i>E. coli</i> para obtenção de massa de plasmídeos ..	149
C. Extração de DNA plasmidial.....	150
D. Preparo de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> .....	151
E. Extração de DNA de plantas .....	151
F. Meios de cultura .....	152
<b>Anexo 2 <i>Curriculum Vitae</i>.....</b>	<b>154</b>

## Lista de Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato- <i>p</i> -toluidino
cDNA	DNA complementar
CNTX	Canatoxina – isoforma de urease de <i>Canavalia ensiformis</i>
C-terminal	Região carboxi-terminal de uma proteína
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50% dos indivíduos testados
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxi-ribonucleotídeos trifosfato
E-64	Trans-epoxisuccinil-L-leucilamide-(4-guanidino)-butano
EDTA	Etilenodiaminotetracético
His	Histidina
HRP	Peroxidase de rábano Silvestre (horseradish peroxidase)
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídio
Kb	Quilo bases (1.000 pares de bases)
kDa	Quilo daltons (1.000 daltons)
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LB-ágar	Meio de cultura Luria-Bertani sólido (contendo ágar)
LB-amp	Meio de cultura Luria-Bertani contendo ampicilina 100 µg/ml
M	Molar
m/m	Relação massa/massa
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MMLV-RT	Transcriptase reversa do vírus de leucemia murina de Moloney
NBT	Cloreto de nitrotetrazólio
N-terminal	Região amino-terminal de uma proteína
OD <sub>600</sub>	Densidade óptica no comprimento de onda de 600 nanômetros
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase

pH	Potencial hidrogeniônico
p-OHB	<i>p</i> -hidroximercuriobenzoato
PVDF	Difluoreto de polivinileno
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
3' RACE	Rápida amplificação de terminações 3' de cDNA
5' RACE	Rápida amplificação de terminações 5' de cDNA
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
Tween 20	Polioxietilenosorbitano
U	Unidade
v/v	Relação volume/volume

## Resumo

Urease, uma enzima encontrada em diversas espécies de plantas, catalisa a hidrólise de uréia, formando amônia e dióxido de carbono. Esta enzima é encontrada também em bactérias, fungos e alguns invertebrados e apresenta três domínios: alfa, beta e gama. Em *Canavalia ensiformis*, foram descritas mais de uma isoforma de urease: a urease clássica JBU (Jack bean urease - cDNA e proteína), o cDNA *jbure-II* e a proteína canatoxina. A sequência *jbure-II*, obtida previamente, codificava uma proteína hipotética incompleta nos domínios alfa e gama (correspondentes as regiões terminais 5' e 3' do cDNA). Neste trabalho, demonstramos a clonagem de um cDNA denominado *jbure-IIB*, que codifica uma proteína predita com os domínios completos. Análises filogenéticas e modelagem molecular da proteína predita foram realizadas. A estrutura proposta para a proteína hipotética JBURE-IIB possui uma forma similar às das ureases bacterianas, exceto pela presença de duas regiões de ligação, que conectam os três domínios das ureases, ausentes nas ureases bacterianas. Todos os resíduos críticos para a atividade ureásica foram detectados. Em seguida, o cDNA completo de *jbure-IIB* foi obtido através de sobreposição dos fragmentos clonados (5', interno e 3'), utilizando uma técnica de "PCR overlap" modificada. O cDNA foi clonado no vetor pET101, a proteína heteróloga foi produzida em *Escherichia coli* e sua presença confirmada por análises de Western blot. A atividade da urease recombinante foi observada em placas das colônias transformadas induzidas, na presença de uréia e níquel.

A proteína canatoxina apresenta atividade inseticida contra diferentes espécies de insetos. Sua toxicidade depende da liberação de um peptídeo interno de 10 kDa (pepcanatox) pelas catepsinas do sistema digestivo dos insetos suscetíveis. Baseado na seqüência N-terminal e tamanho de pepcanatox, projetamos oligonucleotídeos para amplificar um fragmento de 270 pb, usando o cDNA *jbure-II* como molde. Este fragmento, denominado *jaburetox-2* ("Jack bean urease toxin 2") foi clonado em vetor pET101 e expresso em *E. coli*. O peptídeo recombinante foi denominado *jaburetox-2Ec* ("Jack bean urease toxin 2" expresso em células de *E. coli*, contendo uma metionina inicial e acrescido, na região C-

terminal, do epitopo V-5 e seis resíduos de Histidina). Sua atividade inseticida foi testada contra ninfas de *Dysdercus peruvianus* e larvas de *Spodoptera frugiperda*, obtendo-se 100% de mortalidade. Em seguida, cultivou-se a bactéria recombinante em biorreatores para obtenção de grandes quantidades de peptídeo, que foi purificado e testado contra *Rhodnius prolixus* (4<sup>o</sup> instars) e *Triatoma infestans* (5<sup>o</sup> instars e adultos). A injeção de jaburetox-2Ec (1 µg/mg de peso vivo do inseto) resultou em 100% de mortalidade. Em contraste, altas doses do peptídeo foram inócuas quando injetadas ou ingeridas por ratos neonatos e camundongos. Corroborando com estes resultados, a modelagem molecular “ab initio” de jaburetox-2Ec revelou um motivo de “grampo beta” consistente com atividade inseticida, possivelmente baseada em neurotoxicidade ou alteração de permeabilidade celular.

Adicionalmente, plantas de tabaco foram transformadas com o vetor pCAMBIA contendo o fragmento de cDNA *jaburetox-2* (acrescido de um códon de iniciação e um códon de terminação da tradução) e as plantas transformadas, PCR positivas, foram testadas contra *S. frugiperda*. Realizou-se alimentação direta com as folhas de tabaco e observaram-se diferentes níveis de mortalidade (50-100%), provocadas por diferentes plantas, após 15-30 dias.

O conjunto de dados desta tese demonstra o potencial uso de *jaburetox-2* como um transgene para construção de plantas resistentes a insetos e contribui para elucidação do mecanismo de ação da atividade inseticida de ureases, bem como seu possível papel na defesa da planta.

## Abstract

Urease, an ubiquitous enzyme in plants, catalyzes the hydrolysis of urea to form ammonia and carbon dioxide. Urease is also found in bacteria, fungi and some invertebrates. In *Canavalia ensiformis* there are more than one isoform of urease: the classic JBU (the major isoform), JBURE-II and the protein Canatoxin.

In a previous study, a partial sequence of *jbure-II* was obtained that putatively codify for an enzyme incomplete at the alfa and gamma domains. In this work, we report the cloning of a cDNA named *jbure-IIB*, encoding a complete urease protein with the expected 90 kDa size. Phylogenetic studies of the urease sequence and the molecular modeling of the putative protein are also presented. Its modeled structure has an overall shape similar to that of related bacterial ureases except for the presence of two linking regions that connect the three domains of ureases. All critical residues for urease activity are present. The complete cDNA was obtained by overlapping the three parts of cloned cDNA (5', middle part and 3') using a modified PCR overlap technique. The cDNA was cloned into PET101 vector and the heterologous protein was produced in *Escherichia coli* cells and confirmed by Western blot analyses. The activity of the recombinant urease was observed in a urea segregation agar containing urea and nickel.

Canatoxin displays insecticidal activity against different insect species. The entomotoxicity relies on an internal 10 kDa peptide (pepcanatox), released by hydrolysis of Canatoxin by cathepsins in the digestive system of susceptible insects. Here, based on the N-terminal sequence of pepcanatox, we designed primers to amplify by PCR a 270-bp fragment corresponding to pepcanatox using *jbure-II* cDNA as a template. This amplicon named *jaburetox-2* ("jack bean urease toxin 2") was cloned into pET101 vector and expressed in *E. coli*. The recombinant peptide was named *jaburetox-2Ec* and its insecticidal effect was demonstrated against *Dysdercus peruvianus* and *Spodoptera frugiperda* larvae, in which it induced 100% mortality. Bacterial cultivation in bioreactors was carried out with lactose as inducer to obtain large amounts of recombinant peptide. It was tested against *Rhodnius prolixus* (4th instars) and *Triatoma infestans* (5th instars and

adults) by injection and 1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  insect body weight resulted in 100% mortality. In contrast, high doses of *jaburetox-2Ec* were innocuous when injected or ingested by mice and neonate rats. Modeling of *jaburetox-2Ec*, and comparison with other peptide structures, revealed a prominent  $\beta$ -hairpin motif consistent with an insecticidal activity based on either neurotoxicity or alteration of cell permeability.

Finally, tobacco plants were transformed with pCAMBIA vector containing the *jaburetox-2* fragment (with a start and a stop codon) and the transformed plants were tested against *S. frugiperda*. Mortality varying from 50-100% of the insects feeding on different transformed plants was observed after 15-30 days.

Our results showed the potential use of *jaburetox-2* as transgene to engineering insect resistance into plant and contribute to elucidation of mechanisms of action of urease insecticidal activity, as well as its possible role in plant defense.

## **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

As perdas na produção agrícola mundial devido ao ataque de pragas e de doenças têm sido estimadas entre 37% (Gatehouse, 1992) e 45% (Banthi & Taneja, 2007). Além do dano causado nas plantações devido à alimentação direta dos insetos, estes levam a perdas adicionais, através da transmissão de patógenos causadores de doenças (Haq, 2004). Atualmente, o controle de insetos é majoritariamente baseado na utilização de pesticidas químicos, deletérios ao meio ambiente e à saúde humana e animal (Frutos *et al.*, 1999; Goel & Aggarwal, 2007). Tem-se buscado assim, alternativas ao uso de pesticidas químicos em grande escala, sendo que uma das estratégias para se alcançar tal objetivo é a de encontrar meios de aumentar a resistência das plantas a pragas e patógenos.

Uma das estratégias que vem sendo utilizada com este objetivo é o uso da tecnologia do DNA recombinante para introdução de genes em plantas. Esta é uma alternativa atrativa em relação ao controle baseado em inseticidas químicos sintéticos (Estruch *et al.*, 1997), diminuindo os custos de produção, os riscos à saúde humana e os danos ao meio ambiente (Khush, 1999; Sharma & Ortiz, 2002).

Diferentes abordagens visando obter plantas resistentes a insetos têm sido exploradas. A mais utilizada até o momento é o uso de seqüências codificadoras de endotoxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis*, resultando em plantas transgênicas com diferentes graus de resistência a certos grupos de insetos (Hilder & Boulter, 1999; Romeis *et al.*, 2006). Outras estratégias são baseadas em cDNAs de genes derivados de plantas, como os codificadores de inibidores de enzimas digestivas, lectinas ou arcelinas (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002; Mohan Babu *et al.*, 2003), além de proteínas inativadoras de ribossomos

(Vandenbussche *et al.*, 2004) e defensinas (Chen *et al.*, 2002; Lay & Anderson, 2005).

Porém, muitos dos genes utilizados na transformação genética de plantas codificam proteínas apenas parcialmente efetivas contra o inseto praga alvo. Os inibidores de enzimas digestivas e as lectinas afetam o desenvolvimento dos insetos, muitas vezes não levando a sua morte, necessitando concentrações muito elevadas para atingir graus efetivos de toxicidade (Hayakawa *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2002). Existem espécies de insetos insensíveis a muitas destas proteínas (Mohan-Babu *et al.*, 2003). Assim, os estudos de novas proteínas inseticidas, cujos cDNAs possam ser introduzidos individualmente ou em associação com outros cDNAs codificadores de proteínas já conhecidas, são importantes como parte do conjunto de estratégias alternativas para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a insetos.

Neste contexto, as ureases e os peptídeos inseticidas derivados dessas proteínas vêm sendo estudados pelo potencial uso biotecnológico que apresentam, bem como no intuito de desvendar o papel fisiológico dessas proteínas em plantas, ainda não completamente esclarecido.

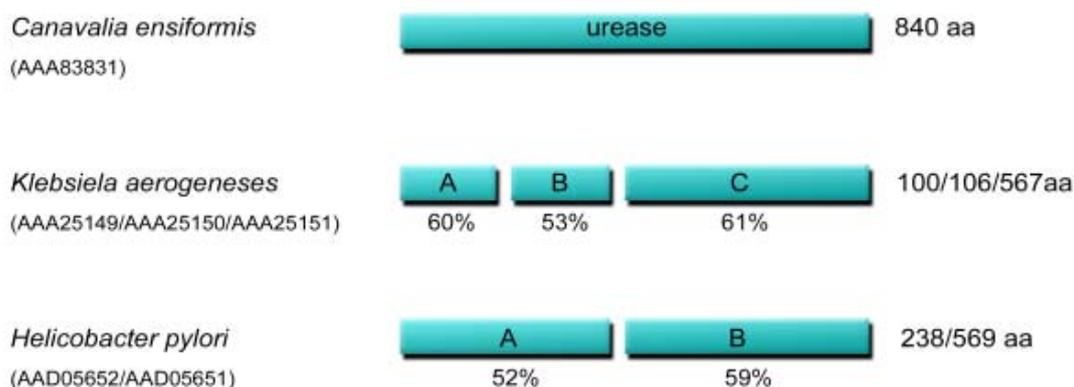
## 1.1 Ureases

Ureases (uréia amido hidrolases; EC 3.5.1.5) são enzimas dependentes de níquel que catalisam a reação de hidrólise da uréia à amônia e carbamato, o qual se decompõe espontaneamente para formar dióxido de carbono e uma segunda molécula de amônia (Wang *et al.*, 1955). Esta enzima age também sobre hidroxauréia e diidroxauréia (Fishbein, 1969), em algumas uréias substituídas e ésteres de ácido carbâmico, como sobre a tiouréia e *p*-nitrofenilcarbamato (Bennett & Wren, 1977).

## 1.2 Estrutura das ureases

As ureases são amplamente distribuídas, sendo encontradas em bactérias, fungos e plantas. Em bactérias, além de disponibilizar nitrogênio, a hidrólise da uréia pode proteger o microrganismo da morte em ambientes ácidos pela formação de amônia, estando envolvidas em diversos processos patológicos em humanos como gastrites, pielonefrites, e formação de pedras no trato urinário (Mobley *et al.*, 1995).

As ureases bacterianas são multímeros, formados por duas ou três cadeias polipeptídicas distintas. A urease da espiroqueta *Helicobacter pylori* apresenta duas subunidades, UreA e UreB, enquanto que todas as outras bactérias apresentam três subunidades distintas: UreA, UreB e UreC (Figura 1). Cada subunidade das ureases bacterianas corresponde a um domínio, altamente conservado, presente inclusive nas ureases vegetais e fúngicas. O domínio  $\alpha$  corresponde à subunidade UreC, o domínio  $\beta$  corresponde à UreB e o  $\gamma$  à UreA (Sirko & Brodzik, 2000). Em *H. pylori*, os domínios  $\beta\gamma$  estão unidos na cadeia ou subunidade UreA e o domínio  $\alpha$  corresponde à subunidade UreB (Ha *et al.*, 2001; Jabri *et al.*, 1995).



**Figura 1 Comparação esquemática das subunidades estruturais das ureases de diferentes organismos.** O número de acesso ao GenBank (parênteses) e o número de aminoácidos (lado direito) estão indicados para cada proteína. Os valores em percentual, abaixo de cada bloco, indicam o grau de identidade com a urease clássica de *C. ensiformis* - JBU. (Adaptado de Sirko & Brodzik, 2000).

A urease bacteriana melhor caracterizada do ponto de vista estrutural é a da *Klebsiella aerogenes*. A enzima nativa apresenta três subunidades  $\gamma$ ,  $\beta$  e  $\alpha$ , correspondendo às cadeias UreA (com 11,1 kDa), UreB (11,7 kDa), e UreC (60,3 kDa) (Jabri *et al.*, 1995).

As ureases de plantas são proteínas homo-oligoméricas, formadas por trímeros ou hexâmeros de uma única subunidade de aproximadamente 90 kDa (Jabri *et al.*, 1995). A seqüência primária do monômero da urease de plantas alinha-se com as várias subunidades das enzimas bacterianas. As ureases vegetais e fúngicas apresentam os três domínios presentes em bactérias ( $\alpha$   $\beta$   $\gamma$ ) em uma única cadeia polipeptídica. Assim, a principal diferença entre as ureases de diferentes fontes são as regiões inter domínios (Figura 1). O sítio catalítico, presente na porção C-terminal (domínio  $\alpha$ ) das ureases de cadeia única, corresponde à subunidade C em *K. aerogenes*, e à subunidade B em *H. pylori* (Figura 1). O sítio ativo de todas as ureases possui dois átomos de níquel (Sirko & Brodzik, 2000), coordenados por resíduos de histidina e por uma lisina carbamilada (Jabri *et al.*, 1995).

O alto grau de similaridade entre as seqüências de aminoácidos indica que todas as ureases são variantes de uma mesma enzima, resultando em isoformas com estruturas terciárias e mecanismos catalíticos similares. Esta conclusão é sustentada pelos resultados de estudos bioquímicos e estruturais de algumas ureases, como as de *C. ensiformis*, *K. aerogenes*, *H. pylori* e *Bacillus pasteurii* (Ciurli *et al.*, 1999).

### 1.3 Ativação da urease: proteínas acessórias

Além dos genes estruturais ureA, ureB e ureC, o operon da urease de *K. aerogenes* apresenta genes que codificam proteínas acessórias importantes: ureD, ure E (peptídeo de 17,6 kDa), ureF (peptídeo de 25,2 kDa) e ureG (peptídeo de 21,9 kDa) (Mobley *et al.*, 1995; Soriano & Hausinger, 1999; Kuchar & Hausinger, 2004).

Estas proteínas são essenciais para incorporação de níquel na apoenzima

e obtenção da holoenzima ativa (Mulrooney & Hausinger, 1990; Mobley *et al.*, 1995). Apesar de estudos demonstrarem que a urease de *K. aerogenes* pode ser ativada *in vitro* quando incubada com íons de níquel na presença de CO<sub>2</sub> (bicarbonato), somente 15% da apoenzima converte-se em enzima ativa nessa condição (Park & Hausinger, 1996; Yamaguchi *et al.*, 1999).

A incorporação de níquel também é indispensável para a atividade das ureases de plantas. Porém, apesar do complexo processo de incorporação do níquel no centro ativo da urease de bactérias estar bem esclarecido em bactérias, este processo ainda não está totalmente elucidado em plantas.

Alguns ortólogos de proteínas acessórias de ureases foram identificados em plantas. Em batata, foi caracterizado o gene da proteína acessória da urease (*ureG*), demonstrando a sua capacidade de substituir o *ureG* de bactéria e sugerindo um envolvimento direto do *ureG* na ativação da urease em plantas (Witte *et al.*, 2001). Resultados similares foram obtidos para um mutante de UreF de *Schizosaccharomyces pombe*, que foi parcialmente complementado pela proteína de soja similar a UreF microbiana (Bacanamwo *et al.*, 2002).

Em soja, foi demonstrada a presença de um ortólogo de UreG, denominado Eu3 (Freyermuth *et al.*, 2000). Em *A. thaliana*, três cDNAs codificadores de proteínas acessórias foram identificados: *AtUreD*, *AtUreF* e *AtUreG* (Witte *et al.*, 2005b; Bacanamwo *et al.*, 2002). A expressão simultânea dos mesmos, juntamente com o cDNA que codifica urease de *A. thaliana* em *E.coli* resultou em ativação da urease vegetal nas células bacterianas e em extratos livres de células, demonstrando que estas proteínas são componentes essenciais para a ativação de ureases de plantas (Witte *et al.*, 2005b).

#### **1.4 Ureases de *Canavalia ensiformis***

A urease de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) foi a primeira enzima a ser cristalizada (Sumner, 1926). Sua unidade estrutural básica constitui-se de uma cadeia polipeptídica com 840 aminoácidos e massa molecular de 90,77 kDa. A forma mínima da enzima ativa é trimérica, com 270 kDa, sendo encontrada na

forma nativa como um hexâmero de 540 kDa (Zerner, 1991). Possui dois átomos de níquel no sítio ativo, cada qual coordenado por dois resíduos de histidina.

Em 1981, Carlini & Guimarães isolaram a canatoxina, uma toxina protéica que provoca convulsão e morte em camundongos e ratos quando aplicada intraperitonealmente ( $DL_{50} = 0,5-2,0$  mg/kg, Carlini *et al.*, 1984). Comparações de seqüências parciais de canatoxina indicaram um alto grau de identidade (aproximadamente 85%) destes fragmentos em relação aos fragmentos correspondentes da urease da mesma planta (JBU, Figura 2). Estudos posteriores demonstraram que a canatoxina é uma isoforma de urease possuindo 30-40% da atividade da urease clássica sobre uréia (Follmer *et al.*, 2001). Esta proteína é uma metaloenzima, contendo um átomo de  $Zn^{2+}$  e um de  $Ni^{2+}$  em cada subunidade, sendo que a principal forma é um dímero de 184 kDa (Follmer *et al.*, 2001).

Estudos sobre o mecanismo de ação da canatoxina mostraram que a proteína apresenta potente efeito secretagogo em vários tipos de células de mamíferos, envolvendo eicosanóides e as vias das lipoxigenases, bem como provocando alterações dos níveis e fluxos intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Carlini *et al.*, 1985; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991; Ghazaleh *et al.*, 1997). Estudos *in vivo* mostraram que a mesma induz bradicardia, hipertensão e hipotermia em ratos, que precedem o fenômeno convulsivo característico da sua ação tóxica. A convulsão tônico-clônica induzida por essa proteína tem provavelmente origem medular, com modulação dos centros superiores do encéfalo (Carlini *et al.*, 1984). A canatoxina é também ativa por via intravenosa, intramuscular e subcutânea, mas não produz efeitos letais por via oral, provavelmente devido à sua instabilidade em meio ácido (Carlini & Guimarães, 1991; Ferreira-DaSilva, 2002).

As atividades biológicas descritas para a canatoxina são independentes da atividade ureásica da molécula, visto que a enzima tratada com inibidor irreversível de urease (p-OHB) perde totalmente a atividade ureásica, mas mantém inalterada a sua atividade tóxica em camundongos, produz agregação plaquetária e hemaglutinação indireta, indicando que outros domínios na proteína seriam os responsáveis por estas atividades (Follmer *et al.*, 2001).

0 01	MKLSPREVEK                     MKLSPREVEK	LGLHNAGYLA     E     RGLGNI GA	QKRLARGVRL	NYTEAVALIA	SQIMEYARDG
0 51	EKTVAQLMCL	GQHLLGRRQV	LP AVPHLLNA	VQVEATFPDG	TKLVTVHDP I                 LVTVHDP I
1 01	SRENGELQEA                     SRENGELQEA	LFGSLLPVPS	LDKFAETKED	NRIPGEILCE                 ( 16 ) IPGEILXE	DECLTLNIGR   XXXL
1 51	KAVILKVT SK ( 12 )	GDRPIQVGS H                     GDRPIQVGS H	YHFIEVNPYL                     YHFIEVNPYL	TFDRRKAYGM           TFDRR	RLNIAAGTAV
2 01	RFE PGDC KSV	TLVSI EGNKV	IRGGNAI ADG   ( 17 ) G	PVNETNLEAA                 PPKE-NLXYA	MHAVRSKGF G                 XH ( 15 ) AFT G
2 51	HEEEKDASEG                     HEEEK	FTKEDPNC PF	NTFIHRKEYA ( 14 )	NKYGPTTGDK                 YGP TTGDA	IRLGD TNLLA AGTR
3 01	EIEKDYALYG	DECVFGGK V	IRDGMGQ SCG	HPPAISLDTV	ITNAVIIDYT
3 51	GIIKADIGIK	DGLIASIGKA	GNPDIMNGVF	SNMIIGANTE	VIAGEGLIVT
4 01	AGAI DCHVHY	ICPQLVYEAI	SSGITTLVGG       ( 6 ) VGG	GTGPAAGTRA                     GTGPAAGTR	TTCTP SPTQM
4 51	RLMLQSTDYL	PLNFGFTGKG	SSSKPDELHE	IIKAGAMGLK	LHEDWGSTPA
5 01	AIDNCLTIAE	HHDIQINIHT	DTLNEAGFVE	HSIAAFKGR T	IHTYHSEGAG Ni-Ni
5 51	GGHAPDIIKV	CGIKNVLPSS       ( 8 ) LVEPSE	TNPTRPLTSN     TNXVXL	TIDEHL DMLM	VCHHL DREIP *
6 01	EDLAF AHSRI	RKKTIAAEDV	LNDIGAI SII	SSDSQAMGRV	GEVISRTWQT
6 51	ADPMKAQTGP	LKCDSSDNDN	FRIRRYIAKY   ( 11 ) Y	TINPAIANGF                     TINPAIANGF	SQYVGSVEVG                     SQYVGSVEVG
7 01	KLADLVMWKP                     KLADXVMYTK	SFFGTKPEMV PVQXDN	IKGGMVAWAD           ( 2 ) VMPAWAN ( 9 ) GGMVAWAD ( 13 ) GGMVAWAD	IGDPNAS IPT                     IGDPXA IGDPNAS IPT IGDGP N	PEPVKMRP MY
7 51	GTLGKAGGAL	SIAFVSKAAL	DQRVNVLYGL	NKRVEAVSNV	RKLT KLDMKL 

**Figura 2. Sequências de peptídeos internos da canatoxina alinhadas com a da urease de *C. ensiformis* - JBU (GenBank M65260).** O asterisco indica o resíduo Cys592, onde se liga o inibidor *p*-hidroximercuribenzoato, e a localização dos dois átomos de níquel na enzima JBU. O peptídeo 17 corresponde à seqüência N-terminal do peptídeo pepcanatox. Os resíduos que apresentam identidade estão demonstrados com barras. Os números em parênteses representam peptídeos de canatoxina, obtidos em mais de um experimento, e seqüenciados pela reação de Edman. (Adaptado de Follmer *et al.*, 2001).

A urease clássica possui várias das atividades biológicas descritas para a canatoxina, como ativação de plaquetas e interação com gangliosídeos, mas não é letal por via intraperitoneal em camundongos. As atividades citadas também são independentes da atividade ureolítica (Follmer *et al.*, 2001).

Um novo membro da família das ureases de *C. ensiformis* foi identificado e clonado por Pires-Alves *et al.* (2003), sendo denominado *jbure-II* (GenBank AF468788). O cDNA clonado apresenta 86% de similaridade com a seqüência de nucleotídeos da urease clássica (Figura 3). A proteína codificada por este cDNA não foi isolada, sendo que a seqüência deduzida de aminoácidos apresentaria massa molecular de 75 kDa, 82% de identidade e 90% de similaridade (Figura 3) quando comparada a urease clássica de *C. ensiformis* (GenBank M65260).

### 1.5 Função fisiológica das ureases em plantas

A principal função da urease, em plantas, parece estar relacionada à reciclagem de nitrogênio a partir de uréia gerada externa ou internamente (Mobley & Hausinger, 1989; Mobley *et al.*, 1995; Andrews *et al.*, 1984; Sirko & Brodzik, 2000). Durante a germinação, a uréia endógena é, na sua maioria, produto da degradação de arginina, que é ativamente degradada à uréia e ornitina (Goldraij & Polacco, 1999). A urease catalisa a conversão de uréia à amônia, que é assimilada na via de síntese de glutamina (Lam *et al.*, 1996). A urease também tem importante papel na reciclagem de uréia exógena, aplicada como fertilizante (Witte *et al.*, 2002).

Porém, apesar de intensamente estudadas, o papel fisiológico das ureases em vegetais ainda não foi completamente elucidado (Pollaco & Holland, 1993). Em estudos com plantas de tabaco expressando urease de *H. pylori*, não foram observadas alterações do padrão de crescimento, apesar das plantas transgênicas apresentarem o dobro da atividade ureásica e níveis oito vezes maiores de amônia, em relação às plantas controle (Brodzik *et al.* 2000). Em soja (*Glycine max*), foram descritas duas isoformas de urease: a urease metabólica ou ubíqua (codificada pelo gene *Eu4*) está presente em todos os tecidos da planta, em concentrações bem menores (0,1 a 1%) em relação à urease denominada

```

JBURE-II -----
JBU MKLSPREVEKLGHLNAGYLAQKRLARGVRLNYTEAVALIASQIMEYARDG 50

JBURE-II -----MNHFNRRQVLPAPVPHLLNI IQVEATLPNGTKLVTVHDPI 39
JBU EKTVAQLMCLGQHLLGRRQVLPAPVPHLLNAVQVEATFPDGTGLVTVHDPI 100
      : .:***** :*****:*****

JBURE-II ANENGDLLEALYGSFLPVPSLDFKFAESKEEHKIPGEIICADGRLTLNPGR 89
JBU SRENGELQEALFGSLLPVPSLDFKFAETKEDNRIPGEILCEDECLTLNIGR 150
      : .***:***:***:*****:***:*****: * * * * *

JBURE-II KAVFLKVVNHGDRPIQVGSYHYHFIEVNPYLTFDRRKAYGMRLNIAAGDSV 139
JBU KAVILKVTSGKDRPIQVGSYHYHFIEVNPYLTFDRRKAYGMRLNIAAGTAV 200
      ***:***. :*****:*****:*****:*****:*****

JBURE-II RFEPGDHKTVNLSIGGNKIRGGNAIADGPVNEANCKAAMEIVCRREFG 189
JBU RFEPGDCKSVTLVSIENKIVIRGGNAIADGPVNETNLEAAMHAVRSRFG 250
      ***** *:*.**** *:*****:*****:*****:*****

JBURE-II HKEEEEASEGVTTGDDPCPFTKAIPREEYANKYGPTIGDKIRLGDTDLIA 239
JBU HEEKDASEGFTKEDPNCPFNTFHRKEYANKYGPTIGDKIRLGDTNLLA 300
      *:***:****. * **:* * * * * * * * * * * * * * * * * * *

JBURE-II EIEKDFALYGDES VFGGK VIRDGMGQSSGHPPAMSLDVTITSAVIIDYT 289
JBU EIEKDYALYGDEC VFGGK VIRDGMGQSSGHPPAISLDTVITNAVIIDYT 350
      *****:*****. *****:*****. *****

JBURE-II GI IKADIGIKDGLIASIGKAGNPDIMNGVFPNMIIGVNTTEVICGEGLIVT 339
JBU GI IKADIGIKDGLIASIGKAGNPDIMNGVFPNMIIGANTEVIAGEGLIVT 400
      *****:*****. *****. *****

JBURE-II AGGIDCHVHYICPQSLDEAIISSGITTVVGGGTGPTDGSRATTCTPAPTQM 389
JBU AGAIDCHVHYICPQLVYEAIISSGITTVVGGGTGPAAGTRATTCTPSPTQM 450
      ** .***** : *****:*****: *****:*****

JBURE-II KLMLQSTDDIPLNFGFTGKGS SHPDELHEI IKAGAMGLKLHEDWGCTPA 439
JBU RLMLQSTDDLPLNFGFTGKGS SSKPDELHEI IKAGAMGLKLHEDWGSTPA 500
      :*****:*****. *:*****:*****. *****

JBURE-II AIDNCLAVAEQHDIQVNIHTDTVNESGFVEHTIAAFNGRTIHTYHSEGAG 489
JBU AIDNCLTIAEHHDQINIHTDTLNEAGFVEHSIAAFKGRTIHTYHSEGAG 550
      *****:***:***:*****:***:*****:*****:*****

JBURE-II GGHPADI IKVCSMKNVLPSSNTNTRPLTSNTVDEHLDMLMVCHKLNREIP 539
JBU GGHPADI IKVCGIKNVLPSSNTNTRPLTSNTIDEHLDMLMVCHHLDREIP 600
      *****:*****. *****:*****:*****:*****

JBURE-II EDLAFASSRVREQTIAAEDILHHIGGISIISSDAQAVGRIGEVISCTWQT 589
JBU EDLAFASRIRKKTIAAEDVLNDIGAISSDSQAMGRVGEVISRWTQT 650
      ***** **:***:*****:*. * .*****:***:*****

JBURE-II ADKMAERGPLQPDGSDNDNFRIKRYIAKYTINPAIVNGISQYVGSVEVG 639
JBU ADKMAQTGPLKCDSSDNDNFRIKRYIAKYTINPAIANGFSQYVGSVEVG 700
      *****:***: * .*****:*****. *****

JBURE-II KLADLVIWKPSFFGAKPDIVIKGGSIAWADMGPNGSIPTPEPVMRPMY 689
JBU KLADLVMWKPSFFGKPEMVIKGMVAWADIGDPNASIPTPEPVMRPMY 750
      *****:*****:***:***** :*****:*****. *****

JBURE-II GTLGKAGSALSIAFVSKAALDLGVKVLVGLNKGWNP----- 725
JBU GTLGKAGGALSIAFVSKAALDQRVNVLYGLNKRVEAVSNVRKLTCLDMKL 800
      ***** .***** ***** *:***** :

JBURE-II -----
JBU NDALPEITVDPESYTVKADGKLLCVSEATTVPLSRNYFLF 840

```

Figura 3. Comparação entre a seqüência de aminoácidos deduzida de JBURE-II e seqüência peptídica da urease clássica de *C. ensiformis* (JBU - EC 3.5.1.5) através do programa Clustalw. Identidade (\*), elevada similaridade (:), e baixa similaridade (.).

embrião-específica (codificada pelo gene E1), esta sintetizada apenas no embrião em formação e se acumulando na semente madura, onde sua atividade ureásica é 1000 vezes superior à da ubíqua (Polacco & Winkler, 1984; Torisky & Polacco, 1990; Torinsky *et al.*, 1994). Estudos de mutantes para estas enzimas indicaram que a urease ubíqua está envolvida em processos de reciclagem da uréia, pois mutantes com silenciamento desta isoforma apresentaram anormalidades como retardamento da germinação, acúmulo de uréia nas folhas e necroses pontuais nas folhas e raízes (Stebbins *et al.*, 1991). Estes pontos de necrose também foram observados quando se borrifou a planta com uréia juntamente com um inibidor de urease (Krogmeier *et al.*, 1989).

Mutantes de soja com silenciamento da urease embrião-específica, por sua vez, não demonstraram quaisquer das anormalidades observadas no silenciamento da urease ubíqua. Embora muita uréia seja gerada durante o processo de germinação (Polacco & Holland, 1993), a perda da urease embrião-específica não causa aumento dos níveis de uréia da plântula, se comparada ao tipo selvagem. Estudos *in vitro* com cotilédones de ervilha (Lea *et al.*, 1979) e plântulas de soja (Thompson *et al.*, 1977; Stebbins & Polacco, 1995) indicaram que a(s) urease(s) representam pouca ou nenhuma função na nutrição embrionária.

Estes estudos despertaram dúvidas sobre a função desta isoforma de urease na semente, pois não estaria envolvida em processos ligados à assimilação de uréia, podendo assim participar de outros processos na planta, como defesa (Polacco & Holland, 1993).

Visando verificar o papel fisiológico das ureases de plantas, foram realizados diversos estudos. Através de ensaios de imunorreatividade contra anticorpos policlonais anti-canatoxina, demonstrou-se a presença de proteínas tipo-canatoxina, provavelmente ureases, em diversas leguminosas, indicando um processo de conservação evolutiva dos determinantes antigênicos, sugestivo de um papel fisiológico importante destas proteínas (Carlini *et al.*, 1988). Observou-se também um acúmulo de canatoxina durante o processo de maturação da semente, atingindo níveis máximos na semente madura, como esperado para proteínas de defesa da semente (Barcellos *et al.*, 1993), além de atividade

fungicida e fungiestática da canatoxina, inibindo o crescimento de hifas de vários fungos filamentosos, inclusive alguns fitopatogênicos (Oliveira *et al.*, 1999; Becker-Ritt *et al.*, 2007).

Pires-Alves (2003) demonstrou que o mRNA de urease clássica e do cDNA *jbure-II* de *C. ensiformis* são induzidos pelo fitormônio ácido abscísico. Este hormônio está envolvido na regulação de processos essenciais nos estágios de desenvolvimento posteriores à formação do embrião, tais como: indução de dormência da semente, tolerância à dissecação, acúmulo de reservas na semente e, também, em resposta a ferimentos por dano mecânico (Fosket, 1994). Estes dados reforçam a hipótese de envolvimento das ureases em processos de defesa de plantas.

Outros estudos ainda contribuem para esta hipótese, visto que a canatoxina mostrou-se tóxica quando ingerida pelos insetos *C. maculatus* (coleóptero, caruncho-do-feijão-de-corda), *Rhodnius prolixus* (hemíptera, vetor da Doença de Chagas) (Carlini *et al.*, 1997) e *Dysdercus peruvianus* (hemíptera, percevejo praga da cultura do algodão) (Stanisçuaski *et al.*, 2005). Ureases de outras plantas foram testadas e apresentaram atividade inseticida contra *D. peruvianus*, como a urease de soja embrião específica e a urease clássica de *C. ensiformis* JBU (Follmer *et al.*, 2004a).

## 1.6 Peptídeos inseticidas derivados de ureases

A atividade inseticida das ureases independem da atividade ureolítica, visto que as enzimas obtidas de *C. ensiformis* e a embrião-específica de soja, quando tratadas com p-OHB, um inibidor irreversível da atividade ureásica, mantiveram sua atividade entomotóxica (Follmer *et al.*, 2004b).

O mecanismo de toxicidade de canatoxina está relacionado ao processo de digestão da proteína pelas enzimas digestivas dos insetos (Carlini *et al.*, 1997). Observou-se que os insetos suscetíveis à canatoxina, como *C. maculatus* e *R. prolixus*, possuem o sistema digestivo baseado em enzimas proteolíticas do tipo catepsinas (Campos *et al.*, 1989; Terra *et al.*, 1988), enquanto que os insetos

resistentes (mesmo após ingerirem grandes quantidades de canatoxina) como *Manduca sexta* (lepidóptero; lagarta-do-tabaco), *Schistocerca americana* (ortóptero; gafanhoto), *Drosophyla melanogaster* (díptero; mosca-da-fruta) e *Aedes aegypt* (díptero; mosquito da febre amarela), têm digestão básica, baseada em enzimas tipo tripsina (Miller *et al.*, 1974; Terra & Ferreira, 1994; Gooding, 1973; Davis *et al.*, 1985). Verificou-se, ainda, que a canatoxina ou seus peptídeos derivados não apresentam atividade inibitória das enzimas digestivas de *R. prolixus* ou atividade lectínica ou quitinolítica, sugerindo um mecanismo de ação diferente de outras proteínas inseticidas já conhecidas (Carlini *et al.*, 1997).

Posteriormente, demonstrou-se que administração de canatoxina juntamente com inibidores de catepsinas, como pepstatina A ou E-64 diminuía o índice de mortalidade de *R. prolixus* alimentado com canatoxina, sugerindo que as enzimas digestivas poderiam estar envolvidas na “ativação” desta proteína (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva, *et al.*, 2000). Foi realizada digestão “*in vitro*” da canatoxina com enzimas obtidas da larva do besouro *C. maculatus*, obtendo-se assim, um conjunto de peptídeos de 10 a 15 kDa tóxicos quando injetados ou ingeridos pelos barbeiros *R. prolixus* (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). O peptídeo mais ativo, denominado pepcanatox (10 kDa), foi purificado através de processos cromatográficos clássicos (patente INPI-RS 0003334, de 6 de junho de 2000) e obteve-se sua seqüência N-terminal (Figura 2) (Gombarovits, 1999).

## 2 FORMATO E ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta tese é composta por quatro capítulos, cada qual com Justificativa, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão. Ao final da tese, são apresentadas a Discussão Geral e a Bibliografia Completa.

**Capítulo 1.** Clonagem e modelagem molecular de uma isoforma de urease de *Canavalia ensiformis*

**Capítulo 2.** Sobreposição dos fragmentos e Clonagem de *jbure-II*B para expressão em sistema heterólogo

**Capítulo 3.** Composto por 3 partes:

**3A.** Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*

Artigo publicado na revista "Peptides"

**3B.** Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity

"Artigo publicado na revista "Enzyme and Microbial Technology"

**3C.** Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae)

Artigo publicado na revista "Toxicon"

**Capítulo 4.** Transformação de tabaco (*Nicotiana tabacum*) com jaburetox-2.

# Capítulo 1

## **CLONAGEM E MODELAGEM MOLECULAR DE UMA ISOFORMA DE UREASE DE *Canavalia ensiformis***

## Justificativa

Em *Canavalia ensiformis* foi descrita a presença de uma família de ureases. A urease clássica (JBU) foi a primeira enzima a ser cristalizada (Sumner, 1926). Posteriormente, a canatoxina, uma proteína tóxica extraída das sementes desta leguminosa foi caracterizada como uma isoforma de urease (Carlini & Guimarães, 1981; Follmer *et al.*, 2001). Em 2003, Pires-Alves e colaboradores publicaram a clonagem de um cDNA de urease denominado *jbure-II*, que codifica uma proteína hipotética de 78 kDa. Este cDNA representaria uma terceira isoforma de urease de *Canavalia ensiformis*, codificando uma proteína de tamanho menor do que todas as ureases conhecidas, e também distinta da canatoxina. Estudos comparativos da seqüência desta isoforma de 78 kDa apontam para diferenças importantes em relação a outras ureases de plantas (proteínas homo-oligoméricas de ~90 kDa), com destaque para a falta de 60 aminoácidos na porção N-terminal, o que acarretaria a ausência de uma parte do domínio gama, e de 55 aminoácidos na porção C-terminal da proteína.

Visando investigar se JBURE-II seria realmente uma urease vegetal hipotética formada por monômeros menores que 90 kDa, realizamos análises das seqüências previamente obtidas e clonagem de um novo cDNA, que codifica uma proteína predita com o tamanho esperado, diferindo na região 5' e que não apresenta terminação prematura. Estudos filogenéticos e de modelagem molecular da proteína hipotética foram propostos.

## **Materiais e Métodos**

### *Material vegetal e isolamento de RNA total*

As sementes de *Canavalia ensiformis* foram germinadas em vermiculita contendo meio MS (Murashige e Skoog). Após 15 dias, foram retiradas folhas das plântulas com o pecíolo e imersas em meio MS contendo 100  $\mu$ M de ABA (Life Technologies). As folhas foram mantidas no escuro durante 18 h e o RNA total foi extraído, utilizando o kit RNeasy (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante.

### *RT-PCR*

A seqüência completa da região codificadora do gene *jbure-II* foi obtida através de clonagem do cDNA. A transcrição reversa do RNA total foi realizada utilizando-se o oligonucleotídeo âncora (d(T)) e a enzima MMLV-RT. A RT-PCR foi realizada em 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 6,8 mM DTT, 0,34 mM cada dNTP, 1,36  $\mu$ M oligonucleotídeo (d(T))-âncora e 68 U de enzima MMLV. A reação foi incubada durante 1h a 37°C e utilizada como molde para amplificação por PCR, contendo oligonucleotídeos desenhados a partir da seqüência do cDNA de *jbure-II* (AF468788): JBII-1F (5' CGGAATTCATGAACCATTTTAAACAGG 3') e JB-II-1R (5' CGTGAGCAATGTGAGAAGCGGCCGCAA 3') e um sistema de PCR contendo 2,5 U Taq Polimerase de Alta fidelidade (Invitrogen), 200  $\mu$ M dNTPs, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub> e 400 nM cada oligonucleotídeos em volume final de 50  $\mu$ l. As condições da PCR foram: desnaturação a 94°C por 2 min, 30 ciclos a 94°C de 1 min, 50°C por 45 s e 72°C por 3 min e uma etapa de alongação final a 72°C por 5 min.

## 5' RACE

Foram utilizados dois microgramas de RNA total como molde para a reação 5'RACE, utilizando o oligonucleotídeo Ure-8 (5' TTCCCTTCTGCACAC 3') na reação de transcrição reversa para obtenção da primeira fita de cDNA. A reação de transcrição reversa foi realizada como descrita anteriormente.

A PCR foi feita utilizando os oligonucleotídeos

Ure-9 (5' ATCTCCATAGCTGCTTTTAC 3') e

dTAP (5' GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3')

e na segunda rodada, utilizou-se os oligonucleotídeos

Ure-14 (5' GATTGGCCTGTCTCCATGGTTGAC 3') e

AP (5' GACCACGCGTATCGAATGTCGAC 3')

## *Seqüenciamento de DNA e análises das seqüências*

Os produtos de amplificação foram purificados do gel de agarose (Anexo 1-protocolos gerais A) e clonados no vetor pGEMT-easy (Promega). Células de *E. coli* XL-1Blue foram transformadas e as células recombinantes brancas foram escolhidas para extração de DNA plasmidial. Os plasmídeos obtidos foram seqüenciados em um seqüenciador automático, utilizando os oligonucleotídeos T7 e SP6. Comparações das seqüências obtidas foram realizadas utilizando o software BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os alinhamentos foram realizados com o auxílio do software ClustalW (Thompson *et al.*, 1994, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). A tradução do DNA para proteína foi realizada através do servidor Expasy (<http://ca.expasy.org/tools/#translate>). A massa molecular predita e pI da proteína foram obtidas submetendo-se a sequência ao programa ProtParam, disponível no endereço eletrônico <http://ca.expasy.org/tools/#primary>.

## *Análises Filogenéticas*

As análises filogenéticas foram realizadas, inicialmente, submetendo a seqüência deduzida JBURE-IIB ao banco de dados não redundante BLASTp (Altschul *et al.*, 1990) ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_blast.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_blast.html)). Foram selecionadas 25 seqüências de ureases fúngicas e vegetais. As seqüências foram alinhadas com ClustalW. O software BioEdit software, versão 7.0.8.0 (Hall, 1999) foi usado para manipular as seqüências de aminoácidos, quando necessário. A estimativa da filogenia foi conduzida por “neighbor-joining” (NJ) (Saitou & Nei, 1987), utilizando a distância p e as distâncias corrigidas de Poisson para análise das seqüências de aminoácidos, disponível no programa MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar *et al.*, 2004). Foram realizadas 2000 repetições, utilizando o método “bootstrapping” para verificar a confiabilidade de cada parte da árvore.

## *Modelagem Molecular*

Foi utilizada uma sobreposição de estruturas de ureases para modelar JBURE-IIB. Primeiramente, a seqüência de JBURE-IIB foi submetida ao programa Blastp (Altschul *et al.*, 1990) para análises das seqüências disponíveis. Para obter um melhor alinhamento, as seqüências dos domínios foram modeladas separadamente. Os moldes usados para modelagem do domínio gama foram: 1KRB\_A, 2UBP\_A e 1E9Z\_A. Para o domínio beta, os moldes foram: 1A5M\_B, 1UBP\_B e 1E9Z\_A, enquanto para o domínio alfa, utilizaram-se os moldes: 1FWI\_C, 1EJR\_C, 1EJX\_C, 1EJS\_C, 1EJT\_C, 1EJV\_C, 1EJU\_C, 1FWA\_C, 1FWF\_C, 1FWG\_C, 1FWH\_C, 1EF2\_C, 2KAU\_C, 1KRB\_C, 1KRC\_C, 1<sup>a</sup>5M\_C, 1<sup>a</sup>5k\_C, 1<sup>a</sup>5O\_C, 1<sup>a</sup>5L\_C, 3UBP\_C, 1IE7\_C, 1E9Z\_B e 1E9Y\_C.

Os alinhamentos das múltiplas seqüências foram realizados com ClustalW e submetidos ao servidor Swiss-Model (Schwede *et al.*, 2003) (<http://swissmodel.expasy.org/>) para modelagem de estrutura por homologia. O servidor Swiss-Model utiliza o protocolo Modeller para adquirir o modelo, seguido por procedimentos padrão de minimização de energia. Os modelos foram

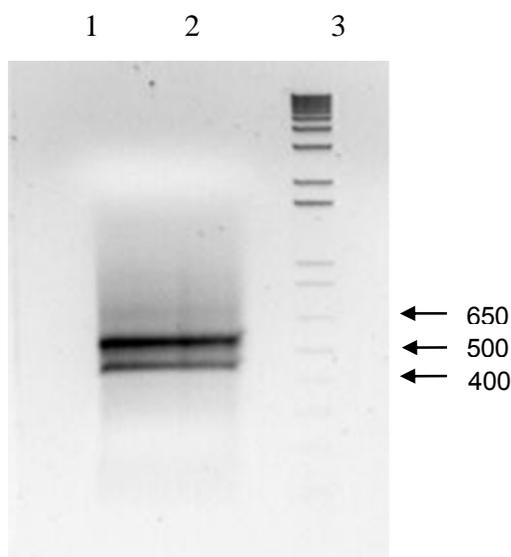
avaliados com WHATCHECK v.19991018-1516 e considerados adequados para este estudo.

Visto que o procedimento de modelagem não permite inclusão de resíduos de aminoácidos modificados, a lisina (K490) foi substituída por uma forma carbamílica. Os átomos de níquel foram geometricamente alocados dentro da estrutura do sítio ativo de JBURE-IIB e a estrutura foi submetida a 150.000 etapas de minimização com o Gromos96, implementado pela GROMACS.

## Resultados e Discussão

### Clonagem de *jbure-II*B

Primeiramente, foi projetado um novo oligonucleotídeo para a reação 5' RACE (*Ure-8*), baseado na seqüência de cDNA *jbure-II* (acesso AF 468788) e utilizou-se dois oligonucleotídeos diferentes (*Ure-14* e *Ure-9*) para amplificação por PCR. Foram obtidas duas bandas (450 e 550 pb), que foram purificadas, clonadas em pGEMT-esy e seqüenciadas (Figura 1.1). A seqüência da banda de 450 pb corresponde a um segmento interno de *jbure-II*, enquanto a banda de 550 pb codifica uma seqüência correspondente à uma região 5' diferente da obtida por Pires-Alves (2003) (Figura 1.2). Esta seqüência foi denominada *jbure-II*B e apresenta o códon de iniciação na posição esperada, similar a todas as ureases vegetais descritas. A proteína hipotética deduzida, codificada por *jbure-II*B possui o domínio gama completo, exibindo 86% de identidade com a seqüência de JBU.



**Figura 1.1** Amplificação da região 5' de *jbure-II*B por RT-PCR a partir de folhas de *C. ensiformis*. Linha 1: Controle negativo (sem cDNA). Linha 2: Amplificação com oligonucleotídeos *Ure-9* e *dTAP* (primeira rodada) e *Ure-14* e *AP* (segunda rodada). Linha 3: marcador molecular.

```

jbure-IIB      CTTGGATATAATCACTCAAACCTCATTTCATTCAATTCTCATCAACATCACTTTTTTCTCA 60
jbure-II      -----

jbure-IIB      AACTAATAAAATGAAAGCTGAGTCCTCGAGAGGTGGAGAAAATAAGCCTGCACAATGCAGG 120
jbure-II      -----

jbure-IIB      GTTCCTTGCTCAGAAACGTCTTGCTCGTGGTGTAAGACTCAATTATTCTGAATCTGTAGC 180
jbure-II      -----

jbure-IIB      TCTCATTGCTTCCCAGATTTTGGAACATGCTCGTGACGGTGAAAAGACTGTGGCACAAC 240
jbure-II      -----ATAAGTAATTGGAAGTAG- 19
                    ** * * * * *

jbure-IIB      AATGAGCATAGGGAAACATTTACTCGGGAGGAGACAGGTGCTTCCAGCAGTTCACATCT 300
jbure-II      AAAAGGCTGAATGAACCATTT--TTAACAGGAGACAGGTGCTTCCAGCAGTTCACATCT 76
                    ** * * * * *

jbure-IIB      GTTGAACATTATTTCAGGTTGAGGCTACCTTACCTAATGGGACCAAGTTAGTGACAGTTCA 360
jbure-II      GTTGAACATTATTTCAGGTTGAGGCTACCTTACCTAATGGGACCAAGTTAGTGACAGTTCA 136
                    *****

jbure-IIB      TGATCCGATTGCGAATGAGAATGGAGATCTAGAAGAAGCATTATATGGTTCTTTTCTTCC 420
jbure-II      TGATCCGATTGCGAATGAGAATGGAGATCTAGAAGAAGCATTATATGGTTCTTTTCTTCC 196
                    *****

jbure-IIB      AGTTCCTTCGCTTGACAAGTTTGCTGAGAGTAAAGAAGAGCATAAAAATTCCTGGAGAAAT 480
jbure-II      AGTTCCTTCGCTTGACAAGTTTGCTGAGAGTAAAGAAGAGCATAAAAATTCCTGGAGAAAT 256
                    *****

jbure-IIB      AATATGTGCAGATGGAAGACTAACTCTTAACCCCTGGAAGGAAAGCAGTATTCTCAAAGT 540
jbure-II      AATATGTGCAGATGGAAGACTAACTCTTAACCCCTGGAAGGAAAGCAGTATTCTCAAAGT 316
                    *****

jbure-IIB      TGTCAACCATGGAGACAGGCCAATCCAGGTAGGGAGCCATTATCATTTTTATTGAAGTAAA 600
jbure-II      TGTCAACCATGGAGACAGGCCAATCCAGGTAGGGAGCCATTATCATTTTTATTGAAGTAAA 376
                    *****

jbure-IIB      TCCATACTTGACTTTTGATCGAAGGAAAGCTTATGGCATGCGCCTGAATATAGCTGCAGG 660
jbure-II      TCCATACTTGACTTTTGATCGAAGGAAAGCTTATGGCATGCGCCTGAATATAGCTGCAGG 436
                    *****

jbure-IIB      GGATTCTGTTCGCTTTGAGCCTGGGGATCATAAACTGTTAATCTTGTAAGCATTGGAGG 720
jbure-II      GGATTCTGTTCGCTTTGAGCCTGGGGATCATAAACTGTTAATCTTGTAAGCATTGGAGG 496
                    *****

jbure-IIB      TAACAAAATCATTAGAGGAGGTAATGCCATTGCTGATGGTCCAGTTAATGAAGCCAATTG 780
jbure-II      TAACAAAATCATTAGAGGAGGTAATGCCATTGCTGATGGTCCAGTTAATGAAGCCAATTG 556
                    *****

jbure-IIB      TAAAGCAGCTATGGAGATTGTGTGCAGAAGGGAATTTGGACATAAGGAAGAAGAAGATGC 840
jbure-II      TAAAGCAGCTATGGAGATTGTGTGCAGAAGGGAATTTGGACATAAGGAAGAAGAAGATGC 616
                    *****

```

**Figura 1.2** Alinhamento das seqüências da região 5' do cDNA *jbure-II* e *jbure-IIB* (novo) de *Canavalia ensiformis*. Na caixa: provável códon de iniciação da tradução. Sublinhado: oligonucleotídeo utilizado na reação de transcrição reversa 5' RACE (URE-8). Na caixa cinza: oligonucleotídeo utilizado na primeira rodada da reação de PCR (URE-9). Tachado duplo: oligonucleotídeo utilizado na segunda rodada da reação de PCR (URE-14).

Para investigar a diferença na porção C-terminal de JBURE-II em relação a outras ureases descritas, clonamos o cDNA da urease obtida por Pires-Alves *et al.* (2003), usando oligonucleotídeos para amplificar a seqüência completa. Obteve-se a seqüência *jbure-IIB*, que apresentou apenas um nucleotídeo de diferença, que modifica a fase de tradução na região 3' do cDNA. Devido à ausência de um nucleotídeo e conseqüente mudança na fase de leitura, a proteína predita para JBURE-II apresentou quatro aminoácidos incorretos e um falso códon de terminação prematuro (Figura 1.3). Os clones previamente obtidos por Pires Alves *et al.* (2003) foram novamente seqüenciados e o erro de seqüenciamento foi confirmado. A nova seqüência, (*jbure-IIB*), obtida neste trabalho, possui um nucleotídeo a mais (G), que modifica a fase de tradução, resultando em uma proteína predita com o domínio alfa completo e códon de terminação no local esperado para ureases vegetais (Figura 1.4).

A seqüência completa do cDNA de *jbure-IIB* foi obtida sobrepondo-se às seqüências 3'e 5' obtidas com a região interna do cDNA (Figura 1.5). A proteína hipotética codificada por *jbure-IIB* foi deduzida utilizando-se softwares disponíveis na página do "Expasy" e foi confirmada através de comparação com a seqüência de JBU (Mamiya *et al.*, 1985, Riddles *et al.*, 1991). JBURE-IIB possui 840 aminoácidos, massa molecular prevista de 90059.6 Da e ponto isoelétrico (pI) predito de 5,6. Observou-se elevada identidade da seqüência predita para JBURE-IIB com as ureases vegetais: JBU (accession number AAA83831) 82%; urease de soja ebrião específica (AAO85884) 81%; urease de soja ubíqua (AAO85883) 79%, urease de *Arabidopsis thaliana* (AAG52306) 71%, urease de *Solanum tuberosum* (CAC43859), 71% e de *Oryza sativa* (BAB78715) 71%.

cDNA: TGTATGGAACACTTGGCAAGGCTGGTAGTGCTTTATCCATAGCTTTTGTGA  
+3: **Y G T L G K A G S A L S I A F V S**  
+2: V W N T W Q G W \* C F I H S F C E  
+1: C M E H L A R L V V L Y P \* L L \*

cDNA: GCAAGCGGCTTTAGACCTTGGAGTGAAAGTTTTATATGGACTGAACA**AAAG**  
+3: **K A A L D L G V K V L Y G L N K G**  
+2: Q G G F R P W S E S F I W T E Q R  
+1: A R R L \* T L E \* K F Y M D \* T K

cDNA: GGTGGAACCCG**TGA**GCAATGTGAGAAAGCTCACCAAAGTACTTGAAGT  
+3: W N P \* A M \* E S S P N \* T \* N S  
+2: **V E P V S N V R K L T K L D L K L**  
+1: G G T R E Q C E K A H Q T R L E T

cDNA: CAATAACTCTCTTCCAGAAATCACTGTGTGCCAGAAACATTCACAGTTAC  
+3: I T L F Q K S L C A Q K H S Q L Q  
+2: **N N S L P E I T V C P E T F T V T**  
+1: Q \* L S S R N H C V P R N I H S Y

cDNA: AGTAGATGGCCAGGCTCTCTCCAGCGAGGCAGTCACCACTTTGCCACTTTC  
+3: \* M A R L S P A R Q S P L C H F L  
+2: **V D G Q A L S S E A V T T L P L S**  
+1: S R W P G S L Q R G S H H F A T F

cDNA: TCAAAATTACTTCATCTTTTAAGTACTCCTACAAATTAAGGTTAATTATTG  
+3: K I T S S F K Y S Y K L R L I I V  
+2: **Q N Y F I F \* V L L Q I K V N Y C**  
+1: S K L L H L L S T P T N \* G \* L L

**Figura 1.3 Tradução de *jbure-II* e *jbure-IIB*.** cDNA: seqüência de cDNA *jbure-II* obtida por Pires-Alves, 2003 através de 3' RACE. +3 +2 e +1: possíveis fases de leitura e tradução de *jbure-II*. A flecha indica a posição onde a falta de um nucleotídeo G no seqüenciamento gerou erro na seqüência predita (sublinhada) e códon de terminação prematuro (na caixa, indicado com asterisco \*). A seqüência de JBURE-IIB é mostrada em negrito.

JBURE-IIB	MKLSPREVEKISLHNAGFLAQKRLARGVRLNYSVALIASQILEHARDGEKTVAQLMSI	60
JBURE-II	-----	
JBU	MKLSPREVEKLGHLNAGYLAQKRLARGVRLNYTEAVALIASQIMEYARDGEKTVAQLMCL	60
JBURE-IIB	GKHLGRQVLPVPHLLNIIQVEATLPNGTKLVTVHDPANENGDL EEALYGSFLPVPS	120
JBURE-II	-MNHFNRRQVLPVPHLLNIIQVEATLPNGTKLVTVHDPANENGDL EEALYGSFLPVPS	59
JBU	GQHLGRQVLPVPHLLNAVQVEATFPDGTGLVTVHDPISRENGELQEALFGSLLPVPS	120
	: .:***** :*****:*****:*****:*****:*****	
JBURE-IIB	LDKFAESKEEHKIPGEIICADGRITLNPGRKAVFLKVVNHGDRPIQVGSYHFIEVNPYL	180
JBURE-II	LDKFAESKEEHKIPGEIICADGRITLNPGRKAVFLKVVNHGDRPIQVGSYHFIEVNPYL	119
JBU	LDKFAETKEDNRIPGEILCEDECLTNI GRKAVILKVTSGDRPIQVGSYHFIEVNPYL	180
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
JBURE-IIB	TFDRRKAYGMRLNIAAGDSVRFEPGDHKT VNLVSI GGNKIRGGNAIADGPNANCKAA	240
JBURE-II	TFDRRKAYGMRLNIAAGDSVRFEPGDHKT VNLVSI GGNKIRGGNAIADGPNANCKAA	179
JBU	TFDRRKAYGMRLNIAAGTAVRFEPGDCKSVTLVSI EGNKIRGGNAIADGPNANETNLEAA	240
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
JBURE-IIB	MEIVCRREFGHKEEEEASEGVTTGDPDCPFTKAI PREEYANKYGPITGDKIRLGDIDLIA	300
JBURE-II	MEIVCRREFGHKEEEEASEGVTTGDPDCPFTKAI PREEYANKYGPITGDKIRLGDIDLIA	239
JBU	MHAVRSKGFGEHEEKDASEGFTKEDPNC PFNTF IHRKEYANKYGPITGDKIRLGDINLLA	300
	*. * : *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
JBURE-IIB	EIEKDFALYGDSEVFGGGKVIDRGMGQSSGHPPAMSLDVTITSAVIIDYTGIIKADIGIK	360
JBURE-II	EIEKDFALYGDSEVFGGGKVIDRGMGQSSGHPPAMSLDVTITSAVIIDYTGIIKADIGIK	299
JBU	EIEKDYALYGDSEVFGGGKVIDRGMGQSSGHPPAISLDTVITNAVIIDYTGIIKADIGIK	360
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
JBURE-IIB	DGLIASIGKAGNPDIMNGVFPNMIIGVNTEVICGEGLIVTAGGIDCHVHYICPQSLDEAI	420
JBURE-II	DGLIASIGKAGNPDIMNGVFPNMIIGVNTEVICGEGLIVTAGGIDCHVHYICPQSLDEAI	359
JBU	DGLIASIGKAGNPDIMNGVFSNMIIGANTEVIAGEGLIVTAGAIDCHVHYICPQLVYEA	420
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
JBURE-IIB	SSGITTVVGGGTGPTDGSRATTCTPAPTQMKLMLQSTDDIPLNFGFTGKGS SHPDELHE	480
JBURE-II	SSGITTVVGGGTGPTDGSRATTCTPAPTQMKLMLQSTDDIPLNFGFTGKGS SHPDELHE	419
JBU	SSGITTVVGGGTGPAAGTRATTCTPSPTQMLMLQSTDDIPLNFGFTGKGS SKPDELHE	480
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
JBURE-IIB	I IKAGAMGLKLHEDWGCTPAAIDNCLAVAEQHDIQVNIHTDTVNESGFVEHTIAAFNGRT	540
JBURE-II	I IKAGAMGLKLHEDWGCTPAAIDNCLAVAEQHDIQVNIHTDTVNESGFVEHTIAAFNGRT	479
JBU	I IKAGAMGLKLHEDWGCTPAAIDNCLTIAEHHDIQINIHTDTLNEAGFVEHSIAAFKGR	540
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
JBURE-IIB	IHTYHSEGAGGGHAPDI IKVCSMKNVLPSSNTNTRPLTSNTVDEHLDMLMVCHKLNREIP	600
JBURE-II	IHTYHSEGAGGGHAPDI IKVCSMKNVLPSSNTNTRPLTSNTVDEHLDMLMVCHKLNREIP	539
JBU	IHTYHSEGAGGGHAPDI IKVCGIKNVLPSSNTPTRPLTSNTIDEHLDMLMVCHHLDREIP	600
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
JBURE-IIB	EDLAFASSRVREQTIAAEDILHHIGGISIISSDAQVGRIGEVISCTWQTADKMKAEERP	660
JBURE-II	EDLAFASSRVREQTIAAEDILHHIGGISIISSDAQVGRIGEVISCTWQTADKMKAEERP	599
JBU	EDLAFASHRIRKKTIAAEDVLNDIGAISIISSDAQMGRVGEVISRTWQTADKMKAQTGP	660
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
JBURE-IIB	LQPDGSDNDNFRIKRYIAKYTINPAIVNGISQYVGSVEVGKLDLVIWKPSFFGAKPDIV	720
JBURE-II	LQPDGSDNDNFRIKRYIAKYTINPAIVNGISQYVGSVEVGKLDLVIWKPSFFGAKPDIV	659
JBU	LKCDSSDNDNFRIKRYIAKYTINPAIANGFSQYVGSVEVGKLDLVMWKPSSFFGTKPEMV	720
	*: * *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
JBURE-IIB	IKGGSIAWADMGPNGSIPTEPEVLMRPMYGTGLGKAGSALSIAFVSKAALDLGVKLVLYGL	780
JBURE-II	IKGGSIAWADMGPNGSIPTEPEVLMRPMYGTGLGKAGSALSIAFVSKAALDLGVKLVLYGL	719
JBU	IKGMVAWADIGDPNASIPTEPEVKMRPMYGTGLGKAGGALSIAFVSKAALDQRVNVLYGL	780
	****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
JBURE-IIB	NKRVEPVS NVRKLT KLDLKLNSLPEITVCPETFTVTVDGQALSSEAVTTLPLSQNYFIF	840
JBURE-II	NKGWNP-----	725
JBU	NKRVEAVSNVRKLT KLDLKLNSLPEITVDPESYTVKADGKLLCVSEATTVPLSRNYFLF	840
	** :.	

**Figura 1.4** Comparação entre as seqüências de aminoácidos deduzidas de JBURE-II e JBURE-IIB e seqüência peptídica da urease clássica de *C. ensiformis* JBU (EC 3.5.1.5). Identidade (\*), elevada similaridade (:), e baixa similaridade (.).

ttggataataactcactcaaaactcatttcttcaattctcactcaacatcaactttttctcaacactaaaaatgaagctgagtcctcgagaggtggagaaaaaagcctgcaaatgcaggg 120  
M K L S P R E V E K I S L H N A G

ttccttgctcagaaaacgtcttgctogtggttaagactcaattattctgaatctgtagctctcattgcttcccagatttggaaactgctcgtagcgtgaaaagactgtggcacaacta 240  
F L A Q K R L A R G V R L N Y S E S V A L I A S Q I L E H A R D G E K T V A Q L

atgagcataggaaaacttactcgggaggagacaggtgcttccagcagttccacatctgttgaacattattcaggttgaggctaccttaccataatgggaccaagttagtgacagttcat 360  
M S I G K H L L G R R Q V L P A V P H L L N I I Q V E A T L P N G T K L V T V H

gatccgatgcaatgagaaaggagactagaagaagcattatattgttttttctccagttctctcgcttgacaagttgctgagagtaaaagaagagcataaaatctcgggaaata 480  
D P I A N E N G D L E E A L Y G S F L P V P S L D K F A E S K E E H K I P G E I

atatgtgcagatggaagactaactcttaacctggaaggaagcagttttctcaaaagtgtcaacctggaagcaggttaggggacattatctttttatgaaagtaaat 600  
I C A D G R L T L N P G R K A V F L K V V N H G D R P I Q V G S H Y H F I E V N

ccactactgacttttgatcgaagaaagccttaggcagtcgctgaataagctgcaggggattctgttcgcttgagcctggggatcataaaactgttaactctgtaagctggaggt 720  
P Y L T F D R R K A Y G M R L N I A A G D S V R F E P G D H K T V N L V S I G G

aacaaaatcattagaggagtaatgccattgctgtggtccagtttaagaagccaattgtaaaagcagctatggagattgtgtgcagaaaggaattggacataaggaagaagaatgca 840  
N K I I R G G N A I A D G P V N E A N C K A A M E I V C R R E F G H K E E E D A

agtgagggtgttacacaggagaccctgattgctcttccaaaagccattctcgtgaagaatagcttaaccaagtaggtccgactattggtgacaaaatccgctctggtgacactgat 960  
S E G V T T G D P D C P F T K A I P R E E Y A N K Y G P T I G D K I R L G D T D

ttgattgctgaaatgaaaagattttgcctcttatggatgaaaggtttttggaggtgaaaagtataaagagatggaatgggtcaatcaagtgggcctccactgctatgctcttg 1080  
L I A E I E K D F A L Y G D E S V F G G G K V I R D G M G Q S S G H P P A M S L

gatactgtatacaagtgacagatgataatgactatactggaatcatcaaaagcagataggtatcaaaagatggccttatgctcttattggaaaagcaggaatccagacatcatgaa 1200  
D T V I T S A V I I D Y T G I I K A D I G I K D G L I A S I G K A G N P D I M N

gggtatttctaaatgatcattggggtaactgaagtataatcgaggagaaggtgatcgtaactgctgggggtatagactgtcatgttcattatattgctcctcaactctgat 1320  
G V F P N M I I G V N T E V I C G E G L I V T A G G I D C H V H Y I C P Q S L D

gaggccatcaagcggcctcaaacagtagtaggaggtggaacaggaccaggaaggaatcgctgccaccacttgtaacaccggcaccacactcagatgaagctaatgtgcaatcaaca 1440  
E A I S S G I T T V V G G G T G P T D G S R A T T C T P A P T Q M K L M L Q S T A

gatgacatccgctaaacttgggttctcactggcaaaagggaggttccacatcctgataagactacataaataatcaaggctggagcaatgggactgaagctgcatgaggactgggatgc 1560  
D D I P L N F G F T G K G S G S H P D E L H E I I K A G A M G L K L H E D W G C

acgcagctgcaatagataatgtttggctgtgctgaaacaactgataccaggttaataacacactgacaccgtaaaatgaaatcgtggattcgtggaacacactattgctgacttaat 1680  
T P A A I D N C L A V A E Q H D I Q V N I H T D T V N E S G F V E H T I A A F N

ggaagaactattcactactaccacagtagggtgcagggtggtggtcatgctccagatatacaaaatagtagtagtataaaaatgctcctaccctcatcaaccaaccacacgccctta 1800  
G R T I H T Y H S E G A G G G H A P D I I K V C S M K N V L P S S T N T T R P L

acatctaaatccgtagatgagcatctgacatgctgaggtctgccataagttgaaatgggaaatccagaagatttagcttttgcaagttcaagggttaagagacaaacaactgctgct 1920  
T S N T V D E H L D M L M V C H K L N R E I P E D L A F A S S R V R E Q T I A A

gaagatatttgcacagatattgggggaatagcattatctctgtagcacagcctggtgggtcgaattggagaggtgataagctgcacttggcaaacctgctgataagatgaaggcagaa 2040  
E D I L H D I G G I S I I S S D A Q A V G R I G E V I S C T W Q T A D K M K A E

agaggaccactccagcctgaggttcagacaatgataaactttcgaatcaaacgataattgcaaaaatacaactataaataccagccatagtaaatggcatctcacaatattgtggttcagtt 2160  
R G P L Q P D G S D N D N F R I K R Y I A K Y T I N P A I V N G I S Q Y V G S V

gaggtgggaaagttagctgattctgtgatttggaaagccatcattttcggggcaaacacagacattgtgatcaaaaggttcaattgcatgggctgacatgggtgaccaaatggcagc 2280  
E V G K L A D L V I W K P S F F G A K P D I V I K G G S I A W A D M G D P N G S

atacctacacctgaaccggctgctgtagggcctatgataggaacacttggcaagcctggtagcttattccatagctttgtgagcaagcggctttagacctggagtgaaagttta 2400  
I P T P E P V L M R P M Y G G T L G K A G S A L S I A F V S K A A L D L G V K V L

tatggactgaacaaggggtggaagcctgagcaatgtgaggaagctcaccacactagacttgaactcaataactctctccagaaactcactgtgtgccagaaacattcacagttaca 2520  
Y G L N K R V E A V S N V R K L T K L D L K L N N S L P E I T V C P E T F T V T

gtagatggccagctctctcagcagggcagtcaccactttgccactttctcaaaattacttcatcttcaagtagctctcaaaaataaggttaattattgttaaacatgacacctacaat 2640  
V D G Q A L S S E A V T T L P L S Q N Y F I F \*

gactgattgagtgaaagtggttaataactgattaagtcaaaagtggtttcttagtttgtaggggtttggttatcctataattagtgattgagttaaactatgcttctcaatttgtagt 2760  
gatttggttatattgagtcgaagtggtatttttttaatttttaataatattgttatgctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 2842

**Figura 1.5 Sequências nucleotídica e protéica predita para JBURE-IIB. Os códons de iniciação e terminação estão circulos. Os oligonucleotídeos reversos estão indicados: Ure-8 (sublinhado) Ure-9 (caixa) e Ure-14 (sublinhado duplo).**

A diferença observada na região 5' dos cDNAs *jbure-II* e *jbure-IIB* sugere um possível processamento alternativo do gene, gerando diferentes mRNAs. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que em *A. thaliana* e *S. pombe*, cujos genes de ureases já foram seqüenciados, a posição de um intron corresponde exatamente à região imediatamente a montante ao primeiro nucleotídeo comum às duas seqüências (*jbure-II* e *jbure-IIB*), a partir do qual, as duas seqüências convergem para a mesma (Figura 1.6). A presença de um motivo de processamento de RNA (3' AG), imediatamente a montante deste ponto e a ausência de identidade do início da região 5' de *jbure-IIB* com as demais ureases também corroboram para esta hipótese (Figura 1.7).

Recentemente foi demonstrado que o pré-mRNA da urease de batata é sujeito a extenso processamento alternativo em diferentes introns, em toda extensão da sua seqüência (Witte *et al.*, 2005a). Eventos de processamento alternativo em genes de urease são difíceis de prever, visto que poucos genes de ureases de plantas foram descritos, e apenas um cDNA menor que o esperado foi clonado e seqüenciado (*jbure-II*, Pires-Alves, 2003). Além disso, o mRNA de urease de *C. ensiformis* mostrou-se indetectável por análises de Northern blot, mesmo utilizando 40 µg de RNA total de folhas (dado não mostrado), sugerindo instabilidade do mRNA ou baixa taxa de transcrição. Desta forma, não foi possível detectarmos transcritos de diferentes tamanhos utilizando-se esta técnica. Witte *et al.* (2005a) fez observações similares, utilizando 30 µg de RNA a partir de diferentes tecidos de batata.

Descrições adicionais de eventos de processamento alternativo de RNA em organismos eucarióticos produtores de urease são necessários, a fim de elucidar como este mecanismo regula os níveis de urease e suas isoformas. Estudos de clonagem genômica de ureases poderão confirmar se os cDNAs descritos são oriundos de genes distintos ou de um mesmo gene, com processamentos diferenciados a nível de RNA.

```

jbure-II -----
jbure-IIB AAAATGAAAGCTGAGTCCTCGAGAGGTGGAGAAAATAAGCCTGCACAATGCAGGGTTCCTT 127
A.t-DNA GAAATGAAGTTGTTGCCGCGAGAGATCGAGAAGTTAGAGCTACATCAAGCTGGTTTCCTT 45349
A.t-cDNA GAAATGAAGTTGTTGCCGCGAGAGATCGAGAAGTTAGAGCTACATCAAGCTGGTTTCCTT 159

jbure-II -----
jbure-IIB GCTCAGAAACGTCTTGCTCGTGGTGAAGACTCAATTATTCTGAATCTGTAGCTCTCATT 187
A.t-DNA GCACAGAAACGTCTTGCTCGTGGTATTAGACTCAATTACACTGAAGCTGTAGCACTTATT 45409
A.t-cDNA GCACAGAAACGTCTTGCTCGTGGTATTAGACTCAATTACACTGAAGCTGTAGCACTTATT 219

jbure-II -----
jbure-IIB GCTTCCCAG----- 196
A.t-DNA GCTACTCAGGTACTTCACTATTCTTCAATTTCACTTACTATTTTATGGTCTGCAATTC 45469
A.t-cDNA GCTACTCAG----- 228

jbure-II -----
jbure-IIB -----ATTTTGGAACATGCTCGTG 215
A.t-DNA TAAGTCGAAGTTATGGTTCCAACTTCTCATGGTTATGTAGATTCTTGAGTTTATTCGTG 45529
A.t-cDNA -----ATTCTTGAGTTTATTCGTG 247

jbure-II -----
jbure-IIB ACGGTGAAAAGACTGTGGCACAACCTAATGAGCATAGGGAAACATTTACTCGGGAG----- 271
A.t-DNA ATGGTGATAAAAAGCGTGGCTGAGCTAATGGATATCGGGAGACAACCTATTAGGAAGGTGAT 45589
A.t-cDNA ATGGTGATAAAAAGCGTGGCTGAGCTAATGGATATCGGGAGACAACCTATTAGGAAG----- 303

jbure-II -----
jbure-IIB -----ATAAGTAATTTGGAACT 16
A.t-DNA GATATGATGAATTCATAGTTGTTTCACTTTTTTGGTTTTGTTTTGATATATTCAGTAC 45649
A.t-cDNA -----

jbure-II -----
jbure-IIB AGAAAAGGCTGAATGAACCATTTTAACAGGAGACAGGTGCTTCCAGCAGTTCCACATCTG 77
A.t-DNA -----GAGACAGGTGCTTCCAGCAGTTCCACATCTG 301
A.t-cDNA ATTTTGCATCTTCTTTTTC-TGTAAACAGGAGACAGGTCTTCCCTGCTGTTTTACATCTT 45709
A.t-cDNA -----GAGACAGGTCTTCCCTGCTGTTTTACATCTT 333
***** ** **

```

**Figura 1.6** Alinhamento das seqüências na região 5' de cDNA *jbure-II*, *jbure-IIB* e da urease de *Arabidopsis thaliana* (A.t-cDNA) com DNA genômico (cromossomo 1) de *A. thaliana* (A.t-DNA). Nas caixas: códons de iniciação da tradução. Em itálico e negrito: regiões correspondentes aos íntrons do gene de urease de *A. thaliana*. Nas caixas cinzas: seqüências de consenso em torno dos sítios de junção 5' e 3' em pré-mRNA (5'GU e 3'AG). Sublinhada: região 5' de *jbure-II*, que não possui homologia com cDNA de outras ureases.

C.eII MNLSPREKRLSLINAGLAQKRLRLRGLNYEVALIAAQIIEARDGKRTVALCMGCHLLGRROVLPAVPHLLNIQVEATIPNGTKLTVVHDPANENGDEBALMGSFLPVPV 59  
 C.eIIB MKLSPREKRLSLINAGLAQKRLRLRGLNYEVALIAAQIIEARDGKRTVALCMGCHLLGRROVLPAVPHLLNIQVEATIPNGTKLTVVHDPANENGDEBALMGSFLPVPV 120  
 C.eI MKLSPREKRLSLINAGLAQKRLRLRGLNYEVALIAAQIIEARDGKRTVALCMGCHLLGRROVLPAVPHLLNIQVEATIPNGTKLTVVHDPANENGDEBALMGSFLPVPV 120  
 G.mE MKLSPREKRLSLINAGLAQKRLRLRGLNYEVALIAAQIIEARDGKRTVALCMGCHLLGRROVLPAVPHLLNIQVEATIPNGTKLTVVHDPANENGDEBALMGSFLPVPV 120  
 G.mU MKLSPREKRLSLINAGLAQKRLRLRGLNYEVALIAAQIIEARDGKRTVALCMGCHLLGRROVLPAVPHLLNIQVEATIPNGTKLTVVHDPANENGDEBALMGSFLPVPV 120  
 S.t MKLSPREKRLSLINAGLAQKRLRLRGLNYEVALIAAQIIEARDGKRTVALCMGCHLLGRROVLPAVPHLLNIQVEATIPNGTKLTVVHDPANENGDEBALMGSFLPVPV 120  
 O.s MKLSPREKRLSLINAGLAQKRLRLRGLNYEVALIAAQIIEARDGKRTVALCMGCHLLGRROVLPAVPHLLNIQVEATIPNGTKLTVVHDPANENGDEBALMGSFLPVPV 120  
 A.t MKLSPREKRLSLINAGLAQKRLRLRGLNYEVALIAAQIIEARDGKRTVALCMGCHLLGRROVLPAVPHLLNIQVEATIPNGTKLTVVHDPANENGDEBALMGSFLPVPV 120  
 S.p MKLSPREKRLSLINAGLAQKRLRLRGLNYEVALIAAQIIEARDGKRTVALCMGCHLLGRROVLPAVPHLLNIQVEATIPNGTKLTVVHDPANENGDEBALMGSFLPVPV 118  
 B.p MNLSPREKRLSLINAGLAQKRLRLRGLNYEVALIAAQIIEARDGKRTVALCMGCHLLGRROVLPAVPHLLNIQVEATIPNGTKLTVVHDPANENGDEBALMGSFLPVPV 104  
 K.a MNLSPREKRLSLINAGLAQKRLRLRGLNYEVALIAAQIIEARDGKRTVALCMGCHLLGRROVLPAVPHLLNIQVEATIPNGTKLTVVHDPANENGDEBALMGSFLPVPV 101  
 H.p MNLSPREKRLSLINAGLAQKRLRLRGLNYEVALIAAQIIEARDGKRTVALCMGCHLLGRROVLPAVPHLLNIQVEATIPNGTKLTVVHDPANENGDEBALMGSFLPVPV 104

C.eII LDKFRESKDEHIIIP-----GELICADGRILNPKGKAVPLKVVVNGDRPIQVGSYHYHFEVNPVLPDRRKAYGMRLNIAGGAVRFEPGKHTVNLVLSIGGNKIRGGNIADGPVNIAN 175  
 C.eIIB LDKFRESKDEHIIIP-----GELICADGRILNPKGKAVPLKVVVNGDRPIQVGSYHYHFEVNPVLPDRRKAYGMRLNIAGGAVRFEPGKHTVNLVLSIGGNKIRGGNIADGPVNIAN 236  
 C.eI LDKFRESKDEHIIIP-----GELICADGRILNPKGKAVPLKVVVNGDRPIQVGSYHYHFEVNPVLPDRRKAYGMRLNIAGGAVRFEPGKHTVNLVLSIGGNKIRGGNIADGPVNIAN 236  
 G.mE LDKFRESKDEHIIIP-----GELIYDGRISVILNPKGKAVPLKVVVNGDRPIQVGSYHYHFEVNPVLPDRRKAYGMRLNIAGGAVRFEPGKHTVNLVLSIGGNKIRGGNIADGPVNIAN 236  
 G.mU LDKFRESKDEHIIIP-----GELICADGRILNPKGKAVPLKVVVNGDRPIQVGSYHYHFEVNPVLPDRRKAYGMRLNIAGGAVRFEPGKHTVNLVLSIGGNKIRGGNIADGPVNIAN 236  
 S.t QKRFV-VIPEVSIIP-----GQCFEGCGLIVLNPGRKAVPLKVVVNGDRPIQVGSYHYHFEVNPVLPDRRKAYGMRLNIAGGAVRFEPGKHTVNLVLSIGGNKIRGGNIADGPVNIAN 235  
 O.s LDKFRESKDEHIIIP-----GELICADGRILNPKGKAVPLKVVVNGDRPIQVGSYHYHFEVNPVLPDRRKAYGMRLNIAGGAVRFEPGKHTVNLVLSIGGNKIRGGNIADGPVNIAN 235  
 A.t LDKFRESKDEHIIIP-----GEMKYDGRISVILNPKGKAVPLKVVVNGDRPIQVGSYHYHFEVNPVLPDRRKAYGMRLNIAGGAVRFEPGKHTVNLVLSIGGNKIRGGNIADGPVNIAN 236  
 S.p QKRFV-VIPEVSIIP-----GQCFEGCGLIVLNPGRKAVPLKVVVNGDRPIQVGSYHYHFEVNPVLPDRRKAYGMRLNIAGGAVRFEPGKHTVNLVLSIGGNKIRGGNIADGPVNIAN 238  
 B.p -----NYL-----GQCFEGCGLIVLNPGRKAVPLKVVVNGDRPIQVGSYHYHFEVNPVLPDRRKAYGMRLNIAGGAVRFEPGKHTVNLVLSIGGNKIRGGNIADGPVNIAN 209  
 K.a -----IT-----GQCFEGCGLIVLNPGRKAVPLKVVVNGDRPIQVGSYHYHFEVNPVLPDRRKAYGMRLNIAGGAVRFEPGKHTVNLVLSIGGNKIRGGNIADGPVNIAN 210  
 H.p -----KLV-----GQCFEGCGLIVLNPGRKAVPLKVVVNGDRPIQVGSYHYHFEVNPVLPDRRKAYGMRLNIAGGAVRFEPGKHTVNLVLSIGGNKIRGGNIADGPVNIAN 203

C.eII QRAAGITVIRGEGKDEIASGCTTCPCDCPKAIEEYANVYGPATGDKIRLGDITLAEIKDPAVGDDEVFQGGKVRDGMQOSGEPAPALDVTINSAVIDITGK 294  
 C.eIIB QRAAGITVIRGEGKDEIASGCTTCPCDCPKAIEEYANVYGPATGDKIRLGDITLAEIKDPAVGDDEVFQGGKVRDGMQOSGEPAPALDVTINSAVIDITGK 355  
 C.eI LEARARVIRGEGKDEIASGCTTCPCDCPKAIEEYANVYGPATGDKIRLGDITLAEIKDPAVGDDEVFQGGKVRDGMQOSGEPAPALDVTINSAVIDITGK 355  
 G.mE QRAAGITVIRGEGKDEIASGCTTCPCDCPKAIEEYANVYGPATGDKIRLGDITLAEIKDPAVGDDEVFQGGKVRDGMQOSGEPAPALDVTINSAVIDITGK 353  
 G.mU QRAAGITVIRGEGKDEIASGCTTCPCDCPKAIEEYANVYGPATGDKIRLGDITLAEIKDPAVGDDEVFQGGKVRDGMQOSGEPAPALDVTINSAVIDITGK 353  
 S.t VMLTGAISGEGKDEIASGCTTCPCDCPKAIEEYANVYGPATGDKIRLGDITLAEIKDPAVGDDEVFQGGKVRDGMQOSGEPAPALDVTINSAVIDITGK 352  
 O.s LNEVAKLIRGEGKDEIASGCTTCPCDCPKAIEEYANVYGPATGDKIRLGDITLAEIKDPAVGDDEVFQGGKVRDGMQOSGEPAPALDVTINSAVIDITGK 352  
 A.t WTIVLIRGEGKDEIASGCTTCPCDCPKAIEEYANVYGPATGDKIRLGDITLAEIKDPAVGDDEVFQGGKVRDGMQOSGEPAPALDVTINSAVIDITGK 354  
 S.p TBEIDNIMKIRGEGKDEIASGCTTCPCDCPKAIEEYANVYGPATGDKIRLGDITLAEIKDPAVGDDEVFQGGKVRDGMQOSGEPAPALDVTINSAVIDITGK 352  
 B.p KELLIQRAKILIRGEGKDEIASGCTTCPCDCPKAIEEYANVYGPATGDKIRLGDITLAEIKDPAVGDDEVFQGGKVRDGMQOSGEPAPALDVTINSAVIDITGK 311  
 K.a NDMSN-----RERVAALVYGPATGDKIRLGDITLAEIKDPAVGDDEVFQGGKVRDGMQOSGEPAPALDVTINSAVIDITGK 290  
 H.p KRLIRHRAKIRGEGKDEIASGCTTCPCDCPKAIEEYANVYGPATGDKIRLGDITLAEIKDPAVGDDEVFQGGKVRDGMQOSGEPAPALDVTINSAVIDITGK 322

C.eII DIGIKDGLIISIGKAGNPDMIDPFPNMLICGNTVEIAGEGLIVTAGIDCHVHFICPOLAEISSGITTVGGGTGPASTRATTCTPFAHOKMLIQLSTDFELNFGPTKGN 412  
 C.eIIB DIGIKDGLIISIGKAGNPDMIDPFPNMLICGNTVEIAGEGLIVTAGIDCHVHFICPOLAEISSGITTVGGGTGPASTRATTCTPFAHOKMLIQLSTDFELNFGPTKGN 473  
 C.eI DIGIKDGLIISIGKAGNPDMIDPFPNMLICGNTVEIAGEGLIVTAGIDCHVHFICPOLAEISSGITTVGGGTGPASTRATTCTPFAHOKMLIQLSTDFELNFGPTKGN 473  
 G.mE DIGIKDGLIISIGKAGNPDMIDPFPNMLICGNTVEIAGEGLIVTAGIDCHVHFICPOLAEISSGITTVGGGTGPASTRATTCTPFAHOKMLIQLSTDFELNFGPTKGN 471  
 G.mU DIGIKDGLIISIGKAGNPDMIDPFPNMLICGNTVEIAGEGLIVTAGIDCHVHFICPOLAEISSGITTVGGGTGPASTRATTCTPFAHOKMLIQLSTDFELNFGPTKGN 471  
 S.t DIGIKDGLIISIGKAGNPDMIDPFPNMLICGNTVEIAGEGLIVTAGIDCHVHFICPOLAEISSGITTVGGGTGPASTRATTCTPFAHOKMLIQLSTDFELNFGPTKGN 471  
 O.s DIGIKDGLIISIGKAGNPDMIDPFPNMLICGNTVEIAGEGLIVTAGIDCHVHFICPOLAEISSGITTVGGGTGPASTRATTCTPFAHOKMLIQLSTDFELNFGPTKGN 467  
 A.t DIGIKDGLIISIGKAGNPDMIDPFPNMLICGNTVEIAGEGLIVTAGIDCHVHFICPOLAEISSGITTVGGGTGPASTRATTCTPFAHOKMLIQLSTDFELNFGPTKGN 471  
 S.p DIGIKDGLIISIGKAGNPDMIDPFPNMLICGNTVEIAGEGLIVTAGIDCHVHFICPOLAEISSGITTVGGGTGPASTRATTCTPFAHOKMLIQLSTDFELNFGPTKGN 470  
 B.p DIGIKDGLIISIGKAGNPDMIDPFPNMLICGNTVEIAGEGLIVTAGIDCHVHFICPOLAEISSGITTVGGGTGPASTRATTCTPFAHOKMLIQLSTDFELNFGPTKGN 479  
 K.a DIGIKDGLIISIGKAGNPDMIDPFPNMLICGNTVEIAGEGLIVTAGIDCHVHFICPOLAEISSGITTVGGGTGPASTRATTCTPFAHOKMLIQLSTDFELNFGPTKGN 426  
 H.p DIGIKDGLIISIGKAGNPDMIDPFPNMLICGNTVEIAGEGLIVTAGIDCHVHFICPOLAEISSGITTVGGGTGPASTRATTCTPFAHOKMLIQLSTDFELNFGPTKGN 440

C.eII KPDELHIIKAGMGLKLEDHGWTFAAIDNCLVAVAQHDIQVNHDTLNSGFEVHTIAARERTIHTYHSEGAGGHPADILKVCCKNVLESNTPREFTANTDEHLLDMLMVC 532  
 C.eIIB KPDELHIIKAGMGLKLEDHGWTFAAIDNCLVAVAQHDIQVNHDTLNSGFEVHTIAARERTIHTYHSEGAGGHPADILKVCCKNVLESNTPREFTANTDEHLLDMLMVC 593  
 C.eI KPDELHIIKAGMGLKLEDHGWTFAAIDNCLVAVAQHDIQVNHDTLNSGFEVHTIAARERTIHTYHSEGAGGHPADILKVCCKNVLESNTPREFTANTDEHLLDMLMVC 593  
 G.mE KPDELHIIKAGMGLKLEDHGWTFAAIDNCLVAVAQHDIQVNHDTLNSGFEVHTIAARERTIHTYHSEGAGGHPADILKVCCKNVLESNTPREFTANTDEHLLDMLMVC 591  
 G.mU KPDELHIIKAGMGLKLEDHGWTFAAIDNCLVAVAQHDIQVNHDTLNSGFEVHTIAARERTIHTYHSEGAGGHPADILKVCCKNVLESNTPREFTANTDEHLLDMLMVC 591  
 S.t KPDELHIIKAGMGLKLEDHGWTFAAIDNCLVAVAQHDIQVNHDTLNSGFEVHTIAARERTIHTYHSEGAGGHPADILKVCCKNVLESNTPREFTANTDEHLLDMLMVC 587  
 O.s KPDELHIIKAGMGLKLEDHGWTFAAIDNCLVAVAQHDIQVNHDTLNSGFEVHTIAARERTIHTYHSEGAGGHPADILKVCCKNVLESNTPREFTANTDEHLLDMLMVC 591  
 A.t KPDELHIIKAGMGLKLEDHGWTFAAIDNCLVAVAQHDIQVNHDTLNSGFEVHTIAARERTIHTYHSEGAGGHPADILKVCCKNVLESNTPREFTANTDEHLLDMLMVC 591  
 S.p GSSLLDTPACCKSLKLEDHGWTFAAIDNCLVAVAQHDIQVNHDTLNSGFEVHTIAARERTIHTYHSEGAGGHPADILKVCCKNVLESNTPREFTANTDEHLLDMLMVC 590  
 B.p SIAPFMCDTPACCKSLKLEDHGWTFAAIDNCLVAVAQHDIQVNHDTLNSGFEVHTIAARERTIHTYHSEGAGGHPADILKVCCKNVLESNTPREFTANTDEHLLDMLMVC 549  
 K.a CPDELHIIKAGMGLKLEDHGWTFAAIDNCLVAVAQHDIQVNHDTLNSGFEVHTIAARERTIHTYHSEGAGGHPADILKVCCKNVLESNTPREFTANTDEHLLDMLMVC 526  
 H.p NDASLADTPACCKSLKLEDHGWTFAAIDNCLVAVAQHDIQVNHDTLNSGFEVHTIAARERTIHTYHSEGAGGHPADILKVCCKNVLESNTPREFTANTDEHLLDMLMVC 560

C.eII MNLNPEPDAFASRIIPETIAAEDILHDCGSISSSDQAAGRIGEVISRTWOTADKMKRGRGLOPFGS-----DNDNFRIKRYAKYINPAIANGISQVGSVEVGLADLW 647  
 C.eIIB MNLNPEPDAFASRIIPETIAAEDILHDCGSISSSDQAAGRIGEVISRTWOTADKMKRGRGLOPFGS-----DNDNFRIKRYAKYINPAIANGISQVGSVEVGLADLW 708  
 C.eI MNLNPEPDAFASRIIPETIAAEDILHDCGSISSSDQAAGRIGEVISRTWOTADKMKRGRGLOPFGS-----DNDNFRIKRYAKYINPAIANGISQVGSVEVGLADLW 708  
 G.mE MNLNPEPDAFASRIIPETIAAEDILHDCGSISSSDQAAGRIGEVISRTWOTADKMKRGRGLOPFGS-----DNDNFRIKRYAKYINPAIANGISQVGSVEVGLADLW 706  
 G.mU MNLNPEPDAFASRIIPETIAAEDILHDCGSISSSDQAAGRIGEVISRTWOTADKMKRGRGLOPFGS-----DNDNFRIKRYAKYINPAIANGISQVGSVEVGLADLW 705  
 S.t MNLNPEPDAFASRIIPETIAAEDILHDCGSISSSDQAAGRIGEVISRTWOTADKMKRGRGLOPFGS-----DNDNFRIKRYAKYINPAIANGISQVGSVEVGLADLW 702  
 O.s MNLNPEPDAFASRIIPETIAAEDILHDCGSISSSDQAAGRIGEVISRTWOTADKMKRGRGLOPFGS-----DNDNFRIKRYAKYINPAIANGISQVGSVEVGLADLW 711  
 A.t MNLNPEPDAFASRIIPETIAAEDILHDCGSISSSDQAAGRIGEVISRTWOTADKMKRGRGLOPFGS-----DNDNFRIKRYAKYINPAIANGISQVGSVEVGLADLW 706  
 S.p MNLNPEPDAFASRIIPETIAAEDILHDCGSISSSDQAAGRIGEVISRTWOTADKMKRGRGLOPFGS-----DNDNFRIKRYAKYINPAIANGISQVGSVEVGLADLW 706  
 B.p MNLNPEPDAFASRIIPETIAAEDILHDCGSISSSDQAAGRIGEVISRTWOTADKMKRGRGLOPFGS-----DNDNFRIKRYAKYINPAIANGISQVGSVEVGLADLW 664  
 K.a MNLNPEPDAFASRIIPETIAAEDILHDCGSISSSDQAAGRIGEVISRTWOTADKMKRGRGLOPFGS-----DNDNFRIKRYAKYINPAIANGISQVGSVEVGLADLW 641  
 H.p MNLNPEPDAFASRIIPETIAAEDILHDCGSISSSDQAAGRIGEVISRTWOTADKMKRGRGLOPFGS-----DNDNFRIKRYAKYINPAIANGISQVGSVEVGLADLW 675

C.eII KPSFPGAKPMVIGKGIASAWMDGNASIPTEPEVMRPMVCGLKGAGSIAFVSKAALDGVRLVGLNKRVEAVSNVRLTKLDMKLNALPHTVDEPVTYVADGVELTGF 825  
 C.eIIB KPSFPGAKPMVIGKGIASAWMDGNASIPTEPEVMRPMVCGLKGAGSIAFVSKAALDGVRLVGLNKRVEAVSNVRLTKLDMKLNALPHTVDEPVTYVADGVELTGF 828  
 C.eI KPSFPGAKPMVIGKGIASAWMDGNASIPTEPEVMRPMVCGLKGAGSIAFVSKAALDGVRLVGLNKRVEAVSNVRLTKLDMKLNALPHTVDEPVTYVADGVELTGF 826  
 G.mE KPSFPGAKPMVIGKGIASAWMDGNASIPTEPEVMRPMVCGLKGAGSIAFVSKAALDGVRLVGLNKRVEAVSNVRLTKLDMKLNALPHTVDEPVTYVADGVELTGF 826  
 G.mU KPSFPGAKPMVIGKGIASAWMDGNASIPTEPEVMRPMVCGLKGAGSIAFVSKAALDGVRLVGLNKRVEAVSNVRLTKLDMKLNALPHTVDEPVTYVADGVELTGF 825  
 S.t KPSFPGAKPMVIGKGIASAWMDGNASIPTEPEVMRPMVCGLKGAGSIAFVSKAALDGVRLVGLNKRVEAVSNVRLTKLDMKLNALPHTVDEPVTYVADGVELTGF 822  
 O.s KPSFPGAKPMVIGKGIASAWMDGNASIPTEPEVMRPMVCGLKGAGSIAFVSKAALDGVRLVGLNKRVEAVSNVRLTKLDMKLNALPHTVDEPVTYVADGVELTGF 831  
 A.t KPSFPGAKPMVIGKGIASAWMDGNASIPTEPEVMRPMVCGLKGAGSIAFVSKAALDGVRLVGLNKRVEAVSNVRLTKLDMKLNALPHTVDEPVTYVADGVELTGF 826  
 S.p DFDGFAEBSMVIKGGIASAWMDGNASIPTEPEVMRPMVCGLKGAGSIAFVSKAALDGVRLVGLNKRVEAVSNVRLTKLDMKLNALPHTVDEPVTYVADGVELTGF 826  
 B.p KPSFPGAKPMVIGKGIASAWMDGNASIPTEPEVMRPMVCGLKGAGSIAFVSKAALDGVRLVGLNKRVEAVSNVRLTKLDMKLNALPHTVDEPVTYVADGVELTGF 784  
 K.a KPSFPGAKPMVIGKGIASAWMDGNASIPTEPEVMRPMVCGLKGAGSIAFVSKAALDGVRLVGLNKRVEAVSNVRLTKLDMKLNALPHTVDEPVTYVADGVELTGF 761  
 H.p KPSFPGAKPMVIGKGIASAWMDGNASIPTEPEVMRPMVCGLKGAGSIAFVSKAALDGVRLVGLNKRVEAVSNVRLTKLDMKLNALPHTVDEPVTYVADGVELTGF 795

C.eIIB TVVPLSRNYFLE 840  
 C.eI TVVPLSRNYFLE 840  
 G.mE TVVPLSRNYFLE 838  
 G.mU TVVPLSRNYFLE 837  
 S.t TVVPLSRNYFLE 834  
 O.s TVVPLSRNYFLE 843  
 A.t TVVPLSRNYFLE 838  
 S.p TVVPLSRNYFLE 835  
 B.p TVVPLSRNYFLE 796  
 K.a TVVPLSRNYFLE 773  
 H.p TVVPLSRNYFLE 807

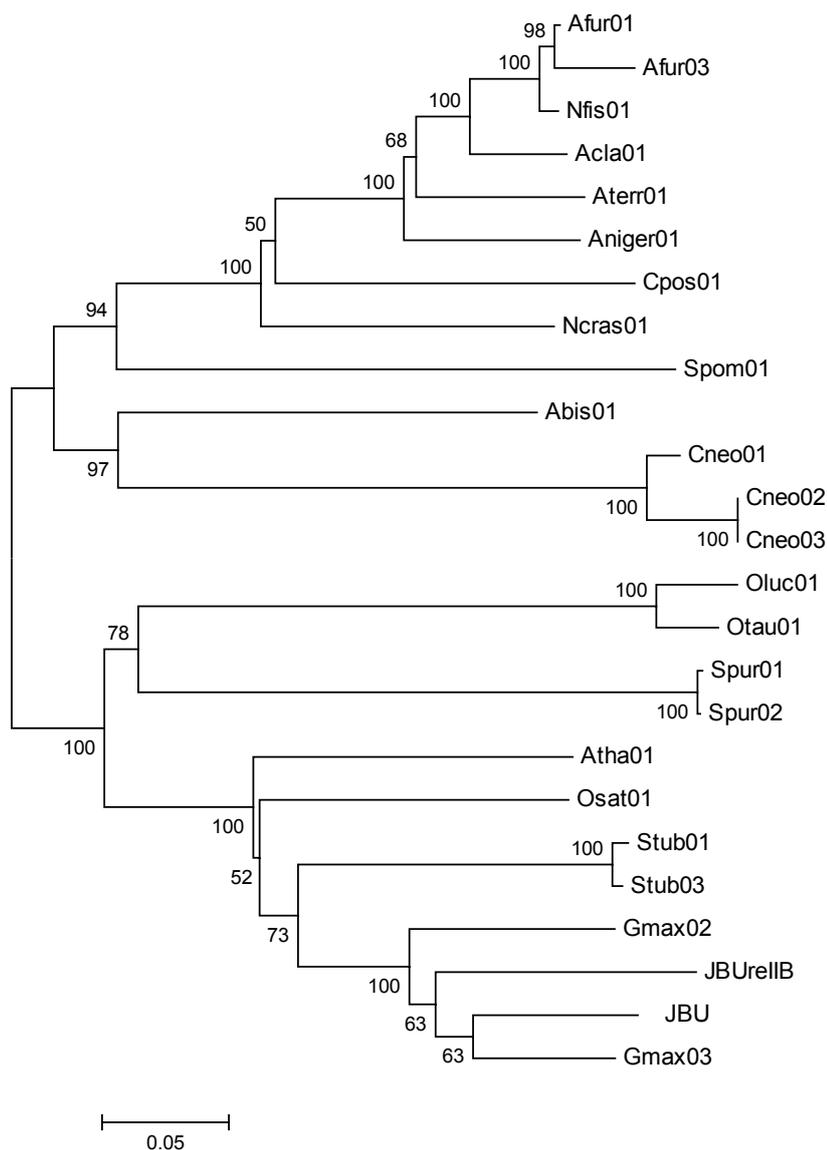
**Figura 1.7 Alinhamento da urease JBURE-IIB de *C. ensiformis* com outras ureases de plantas, fungos e bactérias, utilizando CLUSTALW.** Legenda: C.ell: *Canavalia ensiformis* JBURE-II (AAN08919), C.eIIB: *Canavalia ensiformis* JBURE-IIB, C.eI: *Canavalia ensiformis* JBU (AAA83831), G.mE: *Glycine max* embrião específica (AAO85884), G.mU: *Glycine max* ubíqua (AAO8588), S.t: *Solanum tuberosum* (CAC43860), O.s: *Oriza sativa* (BAB78715), A.t: *Arabidopsis thaliana* (AAG52306), S.p: *Schizosaccharomyces pombe* (CAB52575), B.p: *Bacillus pasteurii* cadeia A, B e C, (P41022, P41021, P41020), K.a: *Klebsiella aerogenes* cadeia A, B e C (AAA25149, AAA25150, AAA25151) e H.p: *Helicobacter pylori* cadeia A e B (AAL86896, AAL77213). Os resíduos que formam o sítio ativo são indicados por um asterisco (\*). Resíduos até 7Å de distância do sítio ativo que são conservados em plantas, mas não conservados em bactérias estão marcados com flechas (↓), enquanto aqueles que diferem apenas na seqüência de JBURE-IIB estão marcados por (∇).

### *Análises de Seqüência e Filogenéticas*

A elevada identidade de seqüência observada para todas as ureases descritas até o momento e a conservação dos resíduos cataliticamente importantes entre ureases eucarióticas e procarióticas indica que estas enzimas possuem estruturas terciárias e mecanismos catalíticos semelhantes e que, provavelmente, todas as ureases sejam variantes de uma mesma proteína ancestral (Mobley & Hausinger, 1989; Jabri *et al.*, 1995).

Enquanto as ureases bacterianas são formadas por 2 ou 3 subunidades, as ureases vegetais e fúngicas são formadas por uma cadeia única, com 3 diferentes domínios. Desta forma, as análises filogenéticas foram concentradas em ureases vegetais e fúngicas, que possuem um ancestral mais próximo.

As análises filogenéticas mostram que a urease de fungo divergiu de uma seqüência comum e está posicionada na parte superior da árvore filogenética (Figura 1.8). As ureases de plantas estão agrupadas na parte inferior da figura, mas parecem possuir um ancestral comum à algumas algas verdes (*Ostreococcus lucimarinus* e *Ostreococcus tauri*) e metazoários (*Strongylocentrotus purpuratus*). A urease JBURE-IIB, como esperado, está intimamente relacionada à urease de *C. ensiformis* JBU e às ureases ubíqua e embrião-específica de soja (*Glycine max*), todas sintetizadas por leguminosas.



**Figura 1.8 Análises filogenéticas de ureases fúngicas e vegetais.** Legenda: Abis01 – *Agaricus bisporus* (CAG34286), Abis02 – *Agaricus bisporus* (CAG34287), Acla01 – *Aspergillus clavatus* (XP\_001269704), Afur01 – *Aspergillus fumigatus* (Q6A3P9), Afur02 – *A. fumigatus* (XP\_750204), Aniger01 – *Aspergillus niger* (XP\_001388785), Atha01 – *Arabidopsis thaliana* (AAG52306), Aterr01 – *Aspergillus terreus* (EAU35550), Cpos01 – *Coccidioides posadasii* (AAC49868), Cneo01- *Cryptococcus neoformans* (Q5KCQ6), Cneo02- *C. neoformans* (AAC62257), Cneo03- *C. neoformans* (O13465), Gmax02 – *Glycine max* ubíqua (AAO85883), Gmax03 – *G. max* embrião específica (AAO85884), JBU – *Canavalia ensiformis* (urease majoritária), JBUreIIb – *Canavalia ensiformis* (isoforma de urease descrita nesse trabalho), Nfis01 – *Neosartoya fisheri* (XP\_001265208), Ncras01 – *Neurospora crassa* (CAE76567), Osat – *Oryza sativa* (BAB78715), Oluc01 – *Ostreococcus lucimarinus* (XP\_001416478), Otau01 – *Ostreococcus tauri* (CAL57594), Spomb01 – *Schizosaccharomyces pombe* (CAB52575), Stub01 – *Solanum tuberosum* (CAC43857), Stub02 – *S. tuberosum* (CAC43859), Spur01 – *Strongylocentrotus purpuratus* (XP\_001180473), Spur02 – *Strongylocentrotus purpuratus* (XP\_788434)

## Modelagem Molecular

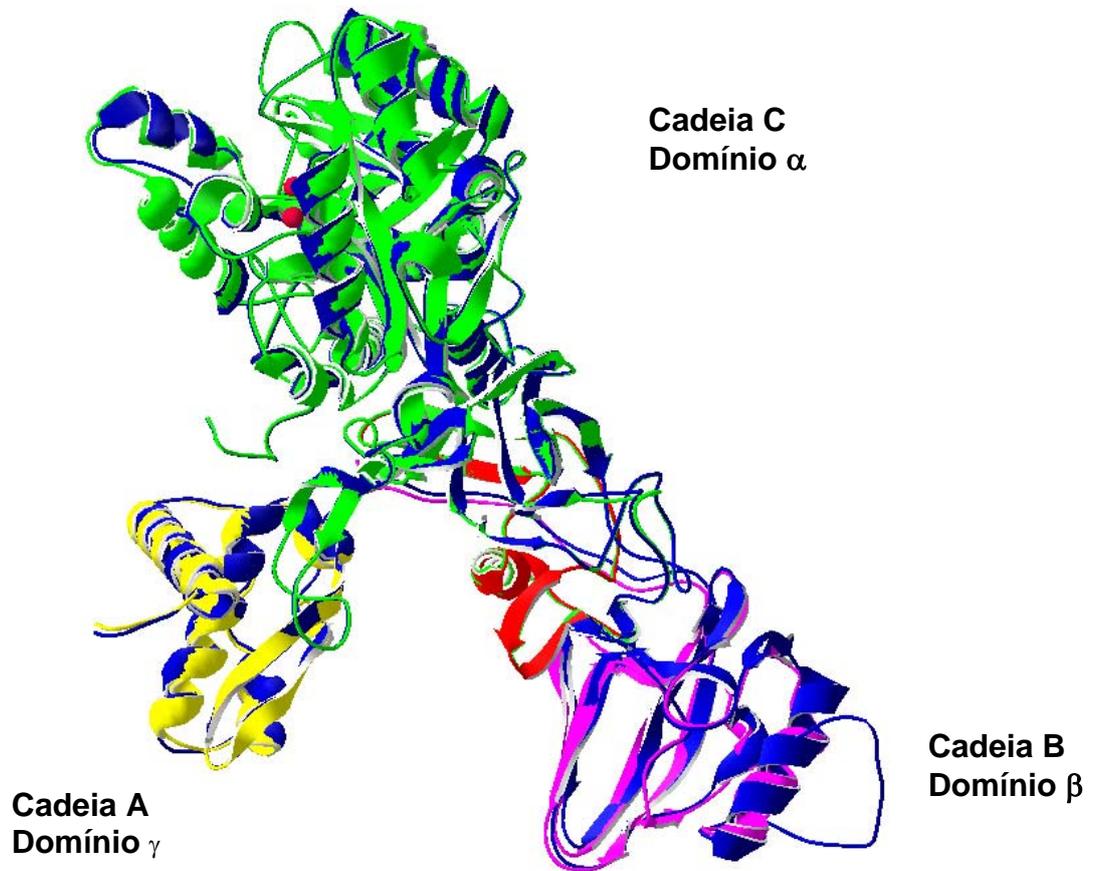
Apesar de a urease de *C. ensiformis* JBU ter sido a primeira enzima a ser cristalizada, até o presente momento, sua estrutura cristalográfica ainda não foi resolvida com sucesso, sendo que apenas algumas ureases bacterianas possuem estrutura cristalográfica tridimensional revelada, como as de *K. aerogenes* (1FWJ), *B. pasteurii* (4UBP) e *H. pylori* (1E9Z).

Ureases são amidohidrolases, caracterizadas pela presença de um barril  $(\alpha\beta)_8$  na região C-terminal, onde o sítio ativo está localizado (Holm & Sander, 1997; Nagano *et al.*, 2002).

A estrutura de JBURE-IIB proposta por modelagem molecular possui uma conformação similar a outras estruturas de ureases determinadas previamente, exceto pela presença de duas regiões conectando os domínios gama e beta e os domínios alfa e beta. No momento, estudos de dinâmica molecular estão sendo realizados, a fim de prever a conformação destas regiões de ligação entre os domínios. O domínio gama é formado por estruturas  $\alpha\beta$ , enquanto o domínio beta é predominantemente formado por estruturas  $\beta$ . O domínio alfa consiste de um barril  $\alpha\beta$  e subdomínios tipo  $\beta$  (Figura 1.9).

Comparações da estrutura proposta para JBURE-IIB com a estrutura cristalográfica 3D descrita para a urease de *K. aerogenes* permitem constatar que os resíduos importantes para atividade ureásica demonstrados experimentalmente ou inferidos estruturalmente para *K. aerogenes* estão presentes na seqüência de JBURE-IIB (Figura 1.10). Os resíduos de aminoácidos envolvidos na coordenação do níquel em *K. aerogenes*, H134, H136, H246, H272 e D360 estão conservados na seqüência de JBURE-IIB e correspondem respectivamente a H407, H409, H519, H545, D633. A lisina K217, carbamilada na urease de *K. aerogenes* (Park & Hausinger, 1993; Jabri *et al.*, 1995), corresponde à lisina K 490 em JBURE-IIB (Figura 1.10).

Outros resíduos cataliticamente importantes na urease de *K.aerogenes* também estão presentes em JBURE-IIB (entre parênteses): H219 (H492), que auxilia na polarização do grupo carbonil da uréia e H320 (H593), provavelmente



**Figura 1.9** Representação do modelo teórico da estrutura tridimensional da urease JBURE-IIB sobreposto à estrutura da urease de *B. pasteurii* (2UBP). Em azul, o modelo teórico de JBURE-IIB, representado por uma cadeia única. Em vermelho, a região correspondente à metade C-terminal do peptídeo jaburetox-2 (descrito no capítulo 3). A urease de *B. pasteurii* está representada por três cadeias: em amarelo, a cadeia A (domínio  $\gamma$ ), em magenta a cadeia B (domínio  $\beta$ ) e em verde, a cadeia C (domínio  $\alpha$ ). Os átomos de níquel estão representados em vermelho. As estruturas secundárias em fita- $\beta$  e  $\alpha$ -hélice são representadas por fitas com cabeça de seta e fitas em espiral, respectivamente.

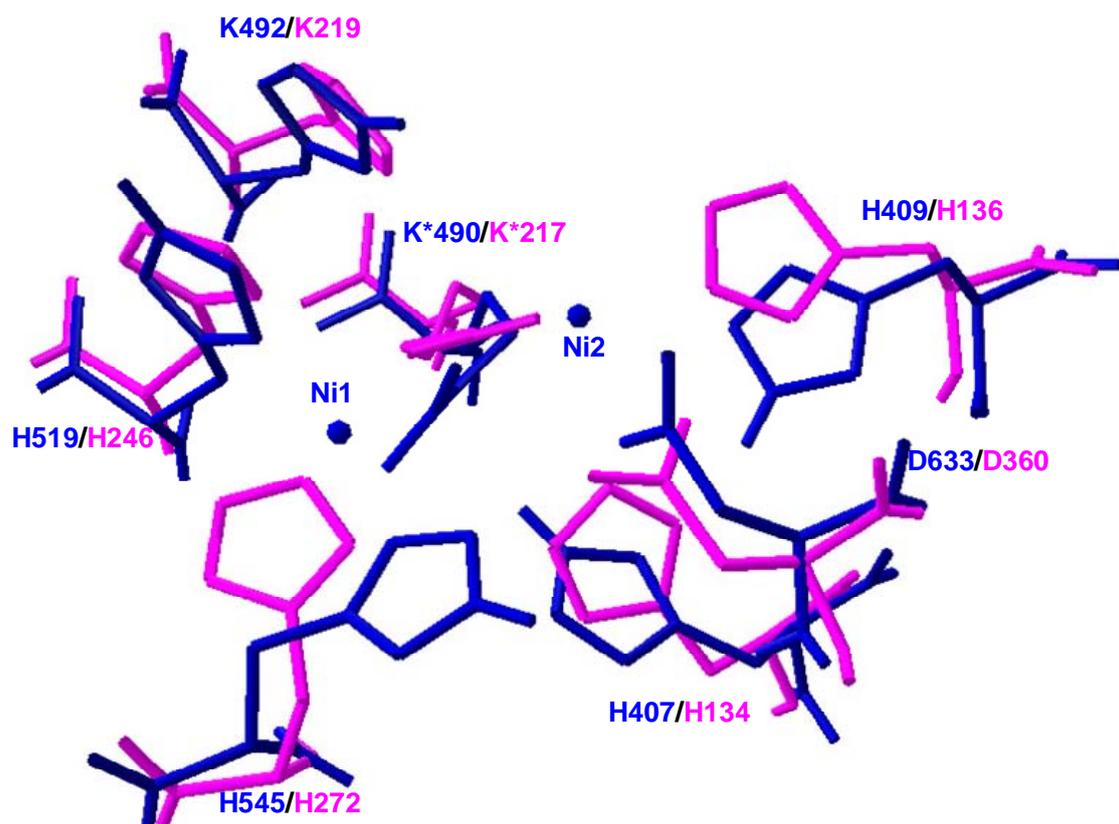


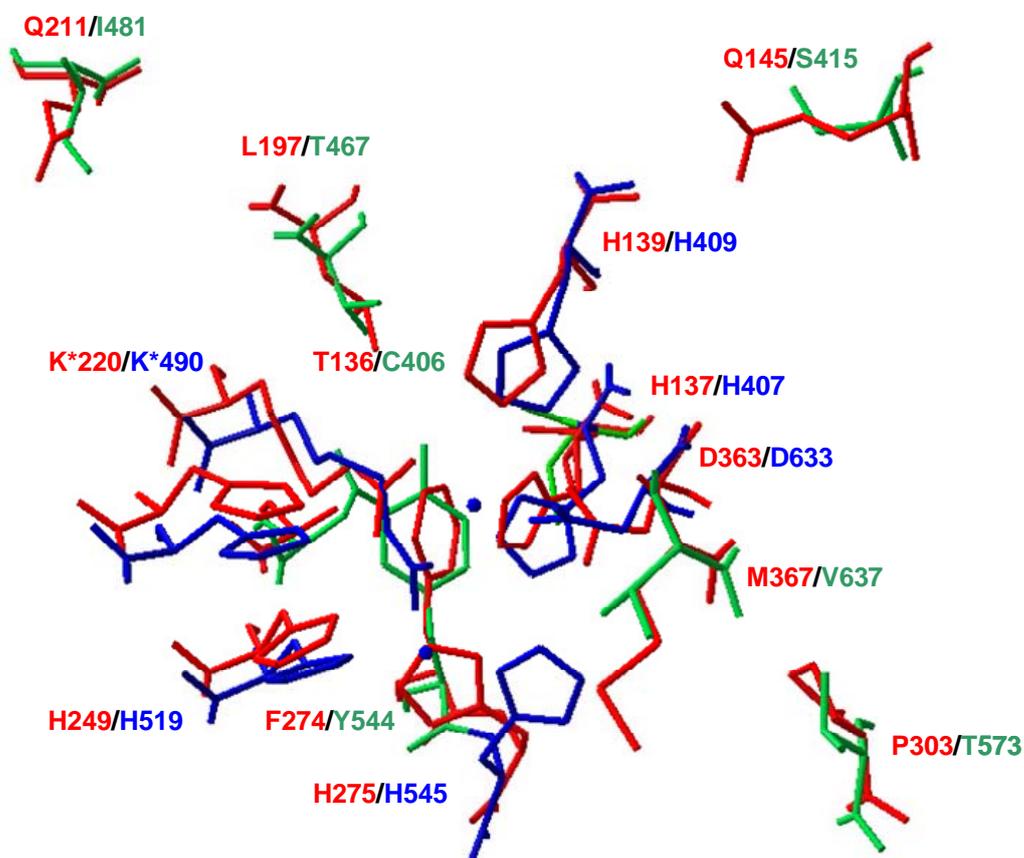
Figura 1.10 Sobreposição dos resíduos envolvidos na coordenação do níquel dos sítios ativos das ureases JBURE-IIB e *K. aerogenes*. Em magenta, urease de *K. aerogenes* (1FWJ) e em azul, o provável sítio ativo de JBURE-IIB. Os dois átomos de níquel estão representados por círculos em azul.

um ácido durante a catálise. D221 (D494) e R336 (R609), envolvidos na modulação da orientação e acidez do H320 (Pearson *et al.*, 2000) e C319 (C592), que foi demonstrado não ser essencial para a atividade catalítica, mas facilita a catálise em pH neutro e básico (Martin & Hausinger, 1992; Pearson *et al.*, 1997). É nesse resíduo de cisteína que se liga o inibidor p-OHB, inibindo estericamente o sítio ativo da enzima.

O modelo proposto para JBURE-IIB também foi comparado ao sítio ativo da estrutura cristalizada da urease de *B. pasteurii* (4UBP). Todos os resíduos do sítio ativo de 4UBP estão presentes em JBURE-IIB em posições similares (H407, H409, K490, H519, H545, D633) (Figura 1. 11).

Porém, algumas diferenças foram observadas nas proximidades do sítio catalítico. Quando todos os resíduos a uma distância de até 7 Å do provável sítio ativo de JBURE-IIB são considerados, alguns diferem de resíduos estritamente conservados nas ureases bacterianas. Q415S, P573T e M637V (sendo que o primeiro resíduo é o conservado, e o número e o segundo resíduo são referentes à seqüência deduzida de JBURE-IIB) diferem de ureases bacterianas e vegetais (Figura 1.7), sugerindo possíveis diferenças na especificidade a substrato ou eficiência da enzima JBURE-IIB. Os resíduos T406C, L467T, Q481I, A517N, F544Y diferem de ureases bacterianas, mas são conservados em todas as ureases vegetais (Figura 1.7). Em concordância com estas observações, três ureases de plantas, JBU, canatoxina e urease embrião-específica de soja apresentam atividades específicas em pH 7,5 de aproximadamente 10-20 U/mg (Follmer *et al.*, 2001; Follmer *et al.*, 2004a), enquanto a enzima de *B. pasteurii* possui atividade ureolítica aproximadamente 20 vezes maior (Olivera-Severo *et al.*, 2006). O Km para uréia das ureases de plantas (JBU: 2–3,5 mM, Follmer *et al.*, 2001; urease embrião específica de soja: 0,2–0,6 mM, Follmer *et al.*, 2004a; urease de ervilha: 3,0 mM, Das *et al.*, 2002) difere consideravelmente quando comparadas à urease de *B. pasteurii*, Km 40–130 (Mobley *et al.*, 1989).

A partir do modelo proposto para JBURE-IIB, podemos postular que esta proteína deve ser enzimaticamente ativa, visto que o centro bi-níquel está corretamente montado.



**Figura 1.11** Sobreposição dos resíduos próximos do sítio ativo da urease de *B. pasteurii* com o modelo molecular de JBURE-IIB. Resíduos do sítio ativo e de suas proximidades da urease de *B. pasteurii* (4BPU), que são conservados em ureases bacterianas, estão ilustrados em vermelho. Os resíduos envolvidos no sítio ativo da proteína hipotética JBURE-IIB estão em azul e, em verde, estão ilustrados os resíduos até 7 Å de distância do provável sítio ativo de JBURE-IIB. Os dois átomos de níquel estão representados por círculos em azul.

## Capítulo 2

**SOBREPOSIÇÃO DOS FRAGMENTOS E CLONAGEM DE *jbure-11B*  
COMPLETO PARA EXPRESSÃO EM SISTEMA HETERÓLOGO**

## Justificativa

A clonagem de cDNAs de ureases vegetais, particularmente de suas isoformas mostrou-se bastante trabalhoso, provavelmente devido a instabilidade do RNA mensageiro, como já sugerido por Witte *et al.* (2005a), bem como sua baixa taxa de expressão e grande tamanho do cDNA. Neste trabalho, realizamos a clonagem de fragmentos de cDNA em 3 etapas, visando obter depois o cDNA completo de *jbure-IIB*. A obtenção do cDNA completo através de sobreposição dos fragmentos clonados constituiu uma etapa importante no estudo das isoformas de urease, sendo o primeiro passo para proceder à expressão heteróloga da proteína codificada. Assim, o desenvolvimento de protocolos alternativos para clonagem de cDNAs de difícil obtenção, oriundos de genes com baixa expressão, tamanho grande e/ou que possuem mRNAs instáveis representa uma etapa crucial nestes estudos.

A expressão heteróloga da proteína codificada pelo cDNA *jbure-IIB* é de grande interesse, tanto para estudos visando elucidar a função destas proteínas em plantas, como do ponto de vista de uso biotecnológico, considerando sua atividade inseticida, já demonstrada para outras isoformas de urease (Follmer *et al.*, 2004a) e para o peptídeo inseticida derivado desta isoforma (Mulinari *et al.*, 2004a,b e 2007-capítulo 3) e antifúngica (Oliveira *et al.*, 1999; Becker-Ritt *et al.*, 2007).

Além disso, a obtenção da proteína recombinante permitirá esclarecer aspectos da relação estrutura *versus* atividade das ureases. Várias das atividades biológicas de ureases independem da sua atividade ureolítica, que por sua vez, é dependente da incorporação de Níquel em seu sítio ativo. Através de expressão heteróloga da proteína em *Escherichia coli*, esperamos obter tanto a apoenzima quanto a holoenzima, viabilizando estudos de seus diversos efeitos, dependentes ou independentes de sua atividade enzimática, como indução de agregação plaquetária, toxicidade em camundongos, etc.

## **Materiais e Métodos**

### *Sobreposição dos fragmentos para obtenção de *jbure-IIB* completo para expressão heteróloga*

A amplificação do cDNA de *jbure-II* foi realizada como descrito no Capítulo 1 desta tese, bem como as amplificações das regiões 5' e 3' do cDNA *jbure-IIB*. Para obter o cDNA completo, foi realizada sobreposição dos fragmentos através de PCR. A reação de sobreposição dos fragmentos foi realizada da seguinte maneira:

### *Obtenção de massa dos fragmentos I, 5' e 3'*

Uma reação de PCR foi realizada em volume final de 50  $\mu$ l, utilizando-se 2,5 U de enzima de alta fidelidade *pfu* (que não acrescenta adenilato na extremidade 3'), contendo 200  $\mu$ M dNTPs, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub> e 400 nM de cada oligonucleotídeo:

Fragmento I: Ure-4: 5' AGTGACAGTTCATGATCCGATT 3' e Ure-3R: 5'CCATTTACTATGGCTGGATT 3'.

Fragmento 3': Ure-7: 5' AAGTTCAAGGGTAAGAGAAC 3' e JBURE-2Rev 5'TCACACTTTGACTCAATATAAACAA 5'

Fragmento 5': CNTX-2: 5' ATGAAGCTGAGTCCTCG 3' e Ure-14R: 5' GATTGGCCTGTCTCCATGGTTGAC 3'.

As condições da PCR foram: desnaturação a 94°C por 2 min, 30 ciclos nas seguintes condições: 94°C de 1 min, 50°C por 45 s e 72°C por 3 min e uma etapa de alongação final a 72°C por 5 min. Os produtos das reações foram separados em gel de agarose, excisados e purificados com o kit Gene Clean, como descrito no item A de "Protocolos gerais" (anexo da tese).

### *Sobreposição dos fragmentos*

Inicialmente, foram sobrepostos os fragmentos I e 3'. Utilizou-se enzima pfu e os oligonucleotídeos Ure-4 e JBURE-2R. As condições da PCR foram: 94°C por 1 min, 80 por 1 min, 72°C por 1 min, 50°C por 1 min, seguido de 30 ciclos a 94°C de 1 min, 72°C por 45 s, 55°C por 45 s e 72°C por 2 min e uma etapa de alongação final a 72°C por 5 min. O produto de reação foi separado em gel de agarose, excisado, purificado (Anexo 1 - Item A) e denominado I+3'.

O material purificado do gel (I+3') foi usado como molde para uma segunda etapa de sobreposição, adicionando o fragmento 5' como segundo molde, os oligonucleotídeos CNTX-2 e JBURE-2Rev, repetindo as mesmas condições da PCR de sobreposição, utilizando a enzima DNA-polimerase Taq Platinum (Invitrogen). O produto de reação, denominado *jbure*-IIB completo foi separado em gel de agarose, excisado, purificado e clonado no vetor pGEMT, seguindo os protocolos descritos nos itens A, B e C de "Protocolos gerais" Anexo 1.

### *Construção do vetor para expressão em E. coli*

Primeiramente, foi realizada uma PCR para obter massa do cDNA *jbure*-IIB completo em um volume final de 25 µl contendo 400 nM de cada oligonucleotídeo (JBURE-101F: 5' CACCATGAAGCTGAGTCCTCG 3' e JBURE-101R: 5'AAAGATGAAGTAATTTTGAGAAAGTGG 3'), 200 µM de dNTPs, tampão 1X para enzima pfu, 2,5 U de DNA polimerase pfu (Stratagene) e 500 ng de pGEMT (Invitrogen), contendo o cDNA completo *jbure*-IIB obtido como descrito previamente. A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) e teve as seguintes condições físicas: desnaturação prévia a 94° C por 1,5 min; 29 ciclos de incubação a 94° C por 30 s (desnaturação), 52° C por 45 seg (anelamento) e 72° C por 2 min (extensão). A fase de extensão final foi realizada a 72° C por 5 min. O produto da PCR foi separado em gel de agarose, seguido de purificação (protocolos gerais - item A).

Os vetores de expressão pET101/D-TOPO (Invitrogen) foram adquiridos na forma linearizada com uma extremidade abrupta e outra coesiva, complementar à

extremidade do inserto. A reação de ligação foi realizada com 5 ng do produto de PCR (1  $\mu$ l em 200 mM de NaCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1  $\mu$ l do vetor pET101). Procedeu-se incubação a temperatura ambiente por 20 min. Células competentes de *E. coli* TOP10 foram transformadas com 3  $\mu$ l do sistema de ligação, por choque térmico. Adicionou-se 10 ng dos vetores de expressão pET/*jbure*-IIB em 200  $\mu$ l das células termocompetentes do kit (pET101/D-TOPO Invitrogen), que foram incubadas no gelo por 30 min. Realizou-se choque térmico por 30 s a 42° C. As células foram colocadas novamente em gelo e adicionou-se 250  $\mu$ l de meio de cultura SOC a temperatura ambiente. Após 30 min de agitação em 200 rpm a 37° C, as células foram semeadas em meio LB ágar, contendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. A seleção das colônias contendo o vetor foi realizada pela resistência a ampicilina. Realizou-se uma PCR de colônia para confirmar a presença do inserto, nas mesmas condições citadas acima, utilizando como molde um pouco de células de *E. coli*. Um clone positivo na PCR de colônia foi utilizado para obtenção de massa de plasmídeo, segundo “protocolos gerais – item B”.

#### *Transformação de células competentes para expressão*

Células competentes de *E. coli* (BL-21 Star) para transformação por choque térmico foram adquiridas juntamente com o kit pET Directional TOPO (Invitrogen). Adicionou-se 10 ng do vetor de expressão pET/*jbure*-IIB em 200  $\mu$ l das células, que foram incubadas no gelo por 30 min. Realizou-se choque térmico por 30 s a 42° C. As células foram colocadas novamente em gelo e adicionou-se 250  $\mu$ l de meio de cultura SOC a temperatura ambiente. Após 30 min em agitação 200 rpm a 37° C, as células foram inoculadas em 10 ml de meio LB líquido contendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Após multiplicação a 16 h em 200 rpm a 37° C as células foram divididas em duas alíquotas: uma foi congelada em nitrogênio líquido e denominada “TT” ou seja, células totais, e outra alíquota de células foi semeada em LB ágar contendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Após crescimento das colônias, foram semeadas 24 colônias em duas placas de meio LB-agar-ampicilina: uma contendo IPTG e outra sem IPTG (controle). Observou-se o crescimento após 5 h de incubação a 37° C. Os clones 1, 4, 6, 11 e 14 foram

utilizados para os próximos ensaios. O controle negativo das reações é realizado com células de *E. coli* transformadas com vetor pET101 contendo cDNA de  $\beta$ -galactosidase que acompanha o kit e expressa uma proteína de 120 kDa.

#### *Expressão de JBURE-IIB em E. coli:*

Colônias de *E. coli* isoladas nas condições descritas acima (transformadas TT, clone 1, clone 6 e controle negativo) foram incubadas em meio LB contendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, a 37° C por 16 h sob agitação, como pré-inóculo. Para 10 ml de meio LB - ampicilina, foram utilizados 0,5 ml de pré-inóculo. Após atingir OD<sub>600</sub> de 0,700, adicionou-se 1 mM de IPTG e após 16h, retirou-se uma alíquota de 500  $\mu$ l, que foi centrifugada a 6000 rpm durante 5 min e o sobrenadante desprezado. Adicionou-se ao precipitado celular volume equivalente de tampão de amostra de eletroforese concentrado 2x, contendo SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol. As amostras foram fervidas e centrifugadas a 14000 rpm 10 min. Aplicou-se 10  $\mu$ l da amostra em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), em seguida submetido a transferência para membrana de PVDF e realizou-se Western-blot. O controle foi realizado nas mesmas condições da amostra. Para verificar as melhores condições de expressão, foram testados vários parâmetros, como tempo de indução, concentração de indutor e temperatura de incubação.

#### *Western-blot*

As proteínas resolvidas SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose. O bloqueio da membrana e todas as etapas posteriores foram realizadas em tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em tampão fosfato salino PBS, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM e 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, pH 7,3, Tween 20 0,05%). Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpos anti-canatoxina produzidos em coelhos (BARCELLOS, *et al.*, 1993), em diluição 1:5.000 (v/v), durante 3 h. Após três lavagens de 2 min cada, a membrana foi incubada com anticorpos secundários anti IgG de coelho com fosfatase alcalina

conjugada (Sigma Chem. Co.) em diluição 1:5.000 (v/v) durante 2 h. A revelação colorimétrica foi feita usando BCIP e NBT.

#### *Dot blot*

Foi realizada indução das células transformadas com *jbure*-IIB “TT” e das células-controle em diferentes temperaturas (15, 28 e 37°C) e concentrações de IPTG (0,1 e 1 mM) durante 16h. 5 ml de células foram centrifugadas e ressuspensas em 250 µl de uréia 8M para extração de proteínas totais. Foi aplicado 1 µl de amostra em membrana de nitrocelulose. Após secagem completa, adicionou-se tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em tampão fosfato salino PBS, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM e 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, pH 7,3).

O ensaio de dot blot foi realizado utilizando-se anticorpo anti-jaburetox-2 (descrito no capítulo 4 desta tese) 1:10.000 (v/v) e anti-IgG de coelho com HRP conjugada 1:10.000 (v/v).

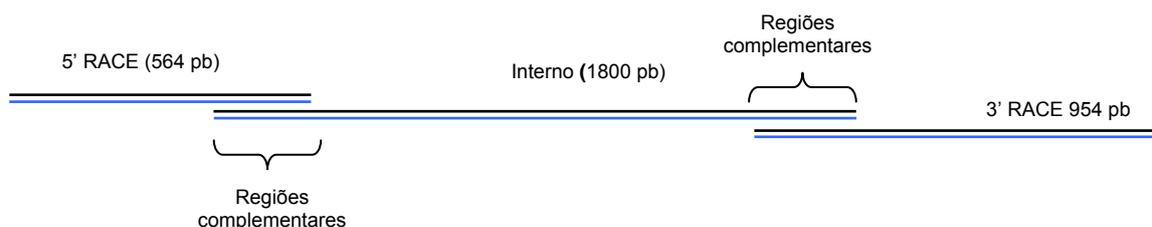
#### *Ensaio de atividade ureolítica em placas de Petri*

Foram preparadas placas de LB ágar contendo: 100 µg/ml de ampicilina, 1 mM de IPTG, 100 µM de NiCl<sub>2</sub>, 0,35 mg/ml de vermelho de cresol e 60 mg/ml de uréia. As colônias 1, 4, 6, 11 e 14 foram semeadas nas placas e deixadas 24 h em estufa a 37°C. O aparecimento de coloração avermelhada em torno das colônias indica atividade ureolítica, sendo que a alcalização do meio é revelada pelo vermelho de cresol. (McGee *et al.*, 1999)

## Resultados e Discussão

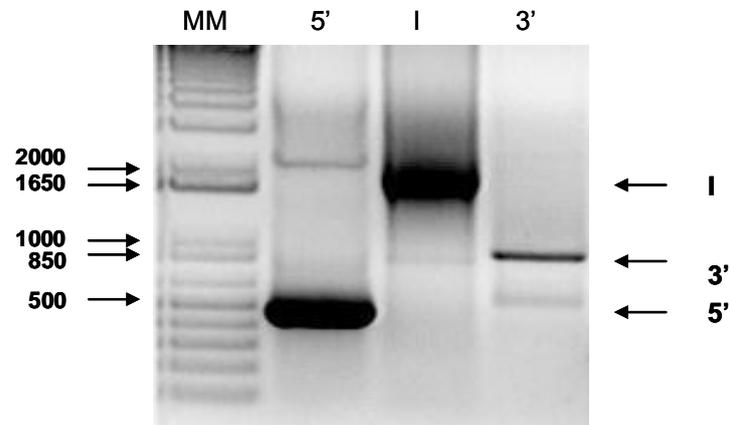
### Clonagem de *jbure-IIB* completo:

Para obter a seqüência completa de *jbure-IIB*, realizou-se sobreposição dos fragmentos obtidos através de clonagem da parte interna do cDNA (I) com os fragmentos obtidos por 3' RACE e 5'RACE, através de PCR ("PCR overlap"). As seqüências possuem regiões de sobreposição, permitindo sobreposição direta, sem necessidade de oligonucleotídeos com âncoras, como ilustrado na Figura 2.1.



**Figura 2.1 Esquema ilustrativo dos fragmentos do cDNA *jbure-IIB*.** A figura ilustra os fragmentos obtidos através da clonagem da região 5', através da técnica 5' RACE, fragmento interno, e região 3', obtida pela técnica 3'RACE. O número entre parênteses indica o tamanho do respectivo fragmento e as regiões complementares aparecem sobrepostas.

Para amplificar cada parte do cDNA de *jbure-IIB*, utilizou-se como molde as respectivas regiões do mesmo, previamente clonadas em pGEMT-easy separadamente, como descrito no "capítulo I A" deste trabalho. Utilizou-se enzima DNA polimerase de alta fidelidade *pfu* (não adiciona A na extremidade 3' da fita amplificada). Os produtos da PCR (Figura 2.2) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose. As bandas foram recortadas com auxílio de um bisturi cirúrgico e o DNA foi purificado.



**Figura 2.2** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação por PCR dos fragmentos do cDNA de *jbure-IIB*. MM: marcador molecular (pb). 5': fragmento correspondente à região 5' de *jbure-IIB*, obtida por 5'RACE. I: região interna do cDNA. 3': fragmento correspondente à região 3' de *jbure-IIB*, obtida por 3'RACE.

A sobreposição das partes do cDNA foi realizada em duas etapas. Primeiramente, foram sobrepostas as regiões Interna (I) e 3'. Esta reação foi seguida de uma PCR convencional, utilizando oligonucleotídeos (URE-4 e JBURE-2R) para aumentar o número de cópias do fragmento Interno sobreposto ao 3', chamado de I+3' (Figuras 2.3 e 2.4).

Foi realizada, em seguida, uma PCR para sobreposição da região 5' do cDNA com o novo segmento I+3' (Figura 2.5). Procedeu-se a amplificação do cDNA completo de *jbure-IIB* com enzima Taq DNA polimerase de alta fidelidade (que acrescenta A na extremidade 3' do produto de PCR), permitindo clonagem em vetor pGEM-T (Figura 2.6). A banda menor observada corresponde ao excesso do fragmento 5' na reação.

Os clones foram submetidos a uma PCR com oligonucleotídeos do vetor e do inserto para verificar a orientação do inserto e então, seqüenciados.

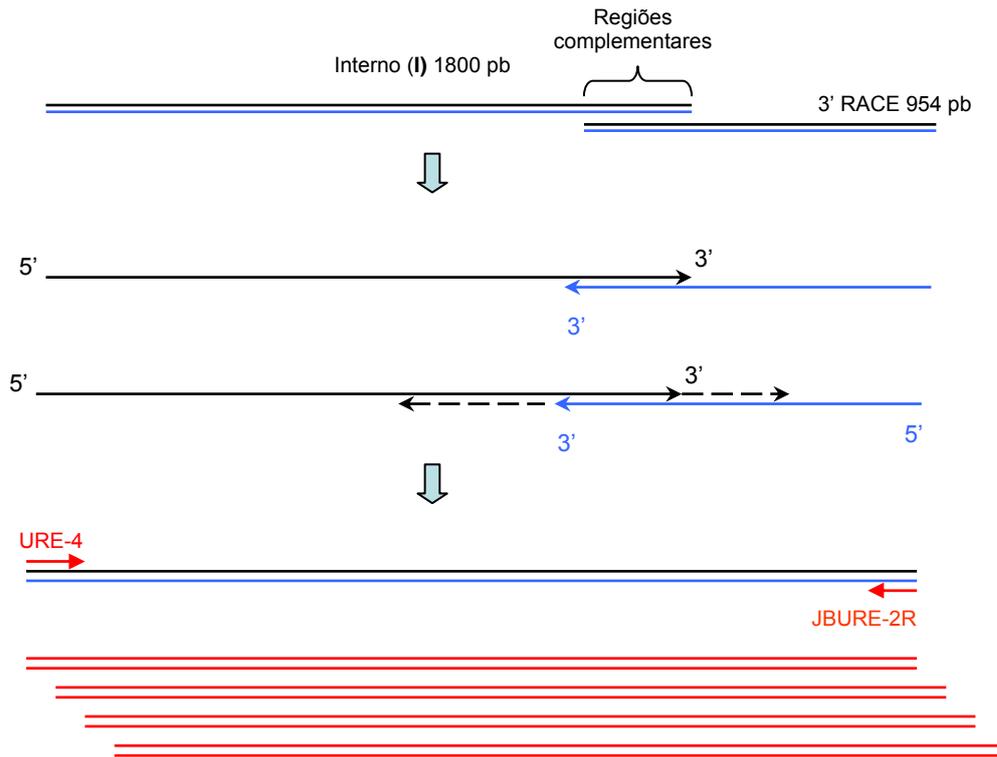


Figura 2.3 Esquema ilustrativo da sobreposição dos fragmentos I e 3' do cDNA *jbure-IIB*.

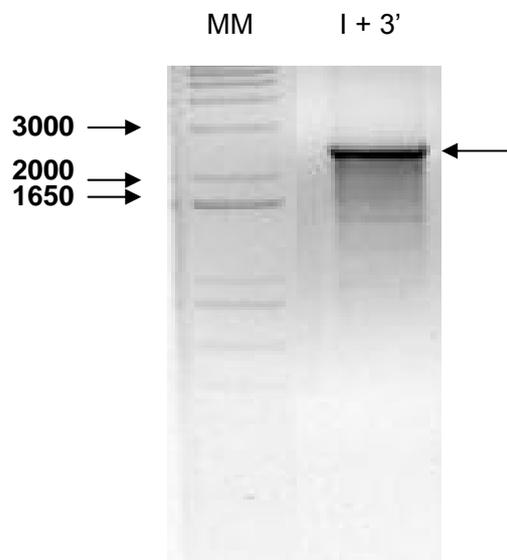


Figura 2.4 Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR de sobreposição dos fragmentos I e 3'. MM: marcador molecular (pb). I+3': amplificação sobrepondo os fragmentos I (região interna do cDNA) e 3' (fragmento 3' de *jbure-IIB*). A seta indica o fragmento I+3' obtido.

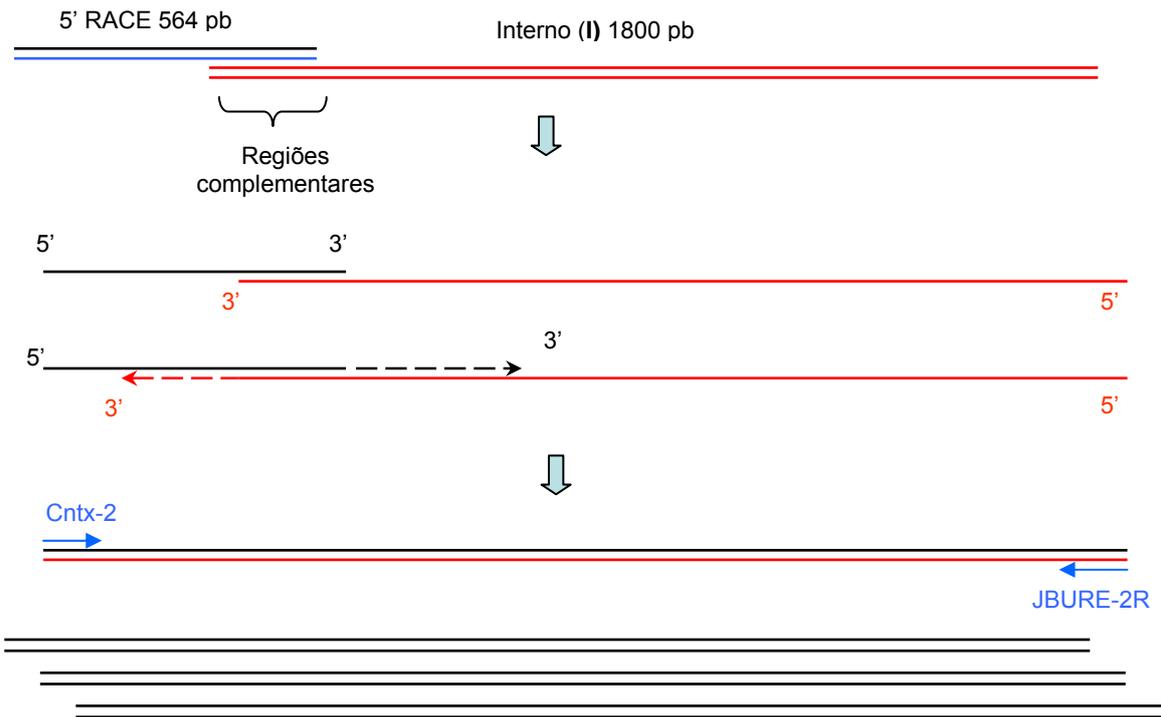


Figura 2.5 Esquema ilustrativo da sobreposição dos fragmentos I+ 3' com o fragmento 5' do cDNA de *jbure-IIB*.

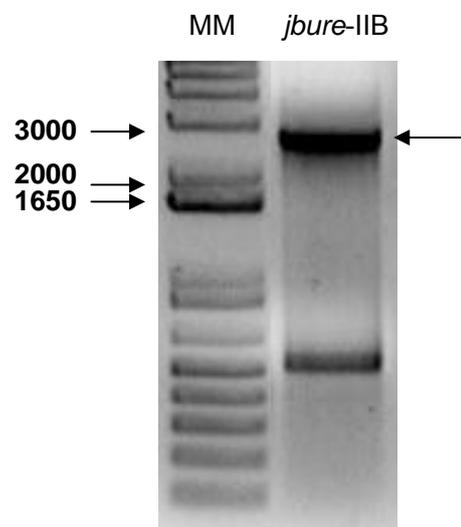


Figura 2.6 Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR de sobreposição dos fragmentos I + 3' e 5'. MM: marcador molecular. *jbure-IIB*: a seta indica a banda correspondente ao cDNA completo de *jbure-IIB*.

Alguns clones obtidos apresentaram seqüências truncadas, podendo ter ocorrido formação de “grampos” na região de sobreposição e assim, as regiões correspondentes não foram amplificadas. Porém, seqüências completas foram obtidas, que foram confirmadas por seqüenciamento e utilizadas para construção de vetores de expressão, apresentados a seguir.

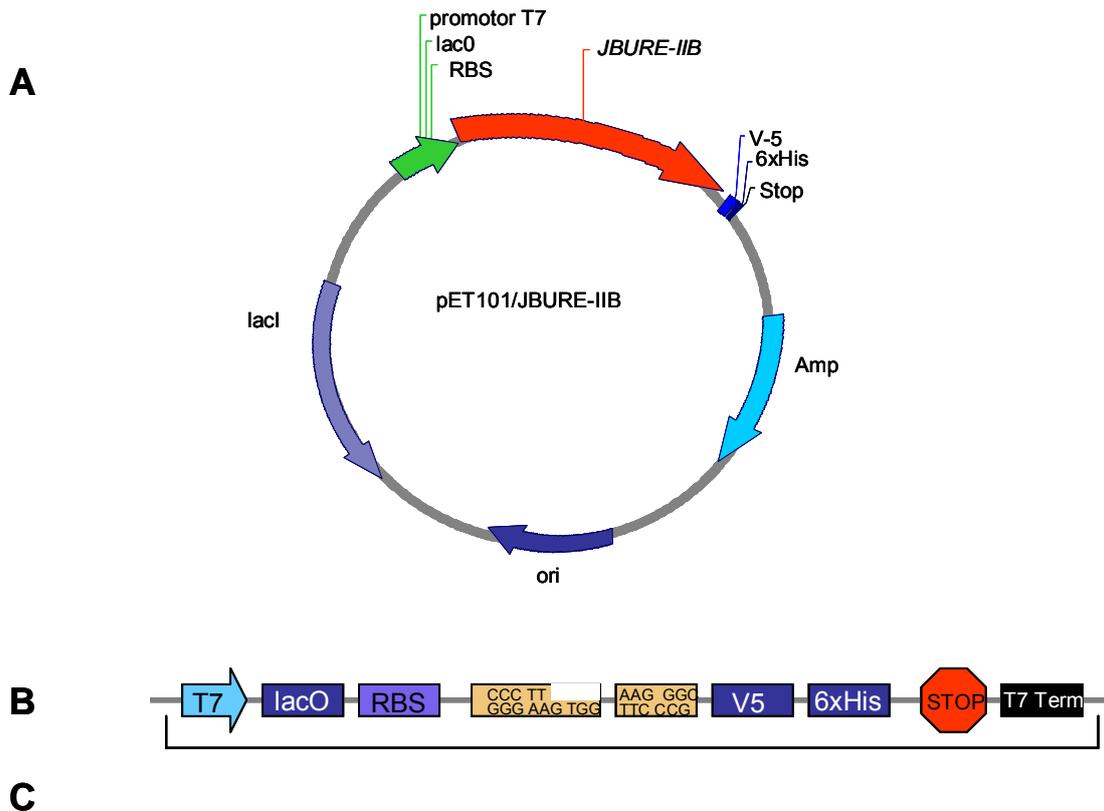
A metodologia de sobreposição de fragmentos de DNA através da técnica de “overlap PCR” está bem descrita, consistindo na projeção de oligonucleotídeos contendo regiões de sobreposição adicionadas à seqüência. Esta técnica pode ser utilizada para diversos fins, como por exemplo, a obtenção de anticorpos humanizados (Fiorentini *et al.*, 1997), retirada dos introns para obtenção de regiões codificadoras de proteínas através de seqüência genômica (Naested *et al.*, 2006), união do DNA codante de proteínas ou domínios distintos (Kim *et al.*, 2007) ou para mutagênese sítio-dirigida (Shen *et al.*, 2004). Em todos os casos, visa à obtenção de DNA codante de proteínas de fusão, baseado em oligonucleotídeos contendo âncoras para sobreposição das seqüências de aproximadamente 20 nucleotídeos.

Neste trabalho, realizamos uma técnica modificada, através da sobreposição de fragmentos do mesmo cDNA, sem utilização de oligonucleotídeos-âncoras. As regiões de sobreposição são bastante extensas, de 204 nucleotídeos na região inicial (5') e 249 nucleotídeos na região final (3') do cDNA, em comparação com as seqüências de sobreposição utilizadas na técnica de “overlap PCR”. Assim, a hibridização foi obtida com um gradiente de temperatura, para garantir a sobreposição das regiões complementares. Esta metodologia pode ser uma alternativa para obtenção de cDNAs completos, quando a clonagem convencional é dificultada por fatores como tamanho do cDNA, instabilidade de mRNA, genes com baixos níveis de expressão, entre outros. Apresenta a vantagem de não necessitar de obtenção de novos oligonucleotídeos para cada região de sobreposição, podendo ser utilizada diretamente após clonagem de fragmentos de cDNAs através de técnicas de 5' e 3' RACE, que são muito utilizadas e produzem segmentos com regiões de sobreposição.

### **Expressão heteróloga de JBURE-IIB**

A expressão heteróloga de JBURE-IIB foi obtida em células de *E. coli* transformadas com o vetor pET101. Para tal, projetamos oligonucleotídeos baseados na seqüência de *jbure*-IIB previamente clonada em pGEMT, acrescido da seqüência 5' CACC 3' na extremidade 5', seguido do códon de iniciação da tradução e na extremidade 3'. Foi retirado o códon de terminação da tradução do oligonucleotídeo reverso, para possibilitar a expressão da proteína recombinante fusionada ao epítipo V-5 e uma cauda de 6 histidinas, cuja seqüência codificadora está presente no vetor pET101 (Figura 2.7). Realizou-se a PCR para amplificação do cDNA completo, excisão do gel, purificação e ligação com o vetor, seguida de transformação de células *E. coli* TOP 10 por choque térmico. As células foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina, seletivo para as bactérias transformadas, pois o vetor possui gene de resistência à ampicilina. As colônias foram submetidas a uma PCR de colônia, para confirmação dos clones positivos e descartar a possibilidade de contaminação. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose. Uma colônia PCR-positiva foi submetida à minipreparação de DNA plasmidial, com a qual procedeu-se à transformação de células *E. coli* BL 21 Star (DE3) por choque térmico.

As células competentes de *E. coli* BL-21 Star para expressão heteróloga, transformadas com a construção pET101/*jbure*-IIB, foram multiplicadas em meio seletivo LB-ágar com ampicilina e uma alíquota foi armazenada a -80° C (denominada CT – células totais). Foram plaqueadas 100 µl de células em meio LB sólido contendo ampicilina e após crescimento das mesmas, foram repicadas 24 colônias em duas placas: uma contendo meio LB-ágar e ampicilina e outra contendo LB-ágar, ampicilina e IPTG 1 mM, para verificação do crescimento das colônias nos dois meios de cultura. Observou-se que todas as colônias cresceram visivelmente menos no meio de cultura contendo IPTG em relação ao meio controle, sem IPTG. Isto indica que as células podem estar expressando a proteína heteróloga, visto que desta forma, o crescimento das mesmas diminui.



**Promotor T7:** Permite elevada transcrição induzida por IPTG em cepas de *E. coli* expressando a RNA polimerase T7.

**Operador *lac* (*lacO*):** Sítio de ligação para o repressor *lac*, que reduz a expressão basal da proteína recombinante.

**RBS:** sítio de ligação do ribossomo em distância ótima do sítio de clonagem para uma eficiente tradução do inserto.

**Sítio de clonagem TOPO (direcional):** permite rápida clonagem do produto de PCR para expressão em *E. coli*.

**Epitopo V5:** (Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr): permite detecção da proteína recombinante com anticorpos anti-V5

**6His no C-terminal:** permite purificação da proteína recombinante com resinas metal acoplado. Em adição, permite detecção com anticorpos anti-His.

**Terminador T7:** seqüência do bacteriófago T7 que permite terminação da transcrição eficiente.

**Promotor *bla*:** permite expressão do gene de resistência a ampicilina.

**Gene de resistência a ampicilina ( $\beta$ -lactamase):** permite seleção do plasmídeo em *E. coli*.

**Origem de replicação pBR322 (*ori*):** permite replicação e manutenção do plasmídeo em *E. coli*.

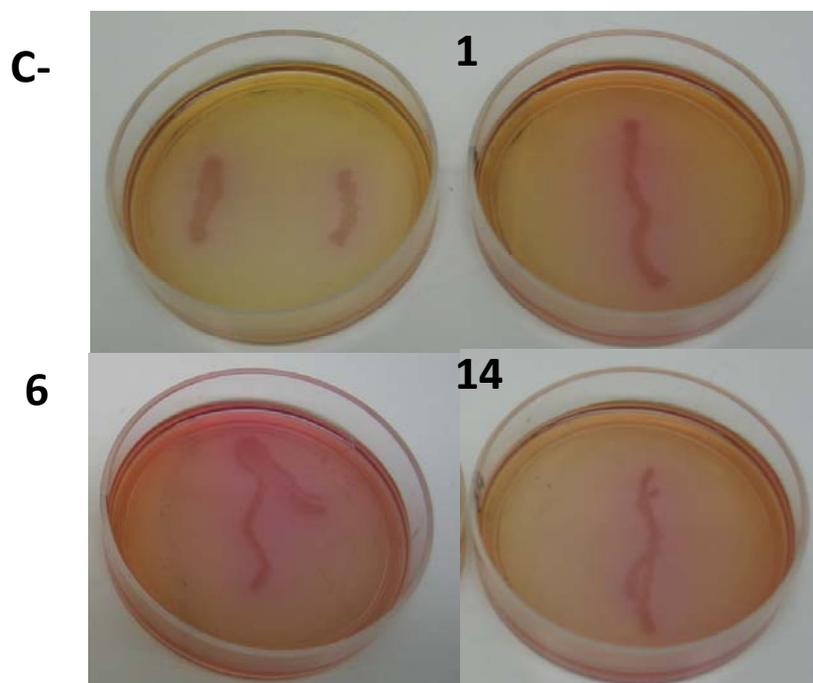
***lacI* ORF:** codifica o repressor *lac*, que liga-se ao promotor T7lac para bloquear transcrição basal do gene de interesse e do promotor *lacUV5* no cromossomo da bactéria, para reprimir a transcrição da RNA polimerase

**Figura 2.7 Representação esquemática do vetor pET 101.** A: Representação esquemática do vetor pET 101 (Invitrogen), contendo o inserto *jbure-IIB*. B: Detalhe da região compreendida entre os sítios de iniciação e terminação da transcrição. C: Descrição detalhada dos componentes do vetor pET 101.

Foram selecionadas as cinco colônias (1, 4, 6, 11 e 14) que apresentaram maior variação de crescimento entre as duas placas (com e sem IPTG), no intuito de buscar as colônias que provavelmente apresentavam melhor expressão.

Realizou-se um ensaio de atividade ureásica em placa com as colônias recombinantes escolhidas. O meio de cultura possui  $\text{NiCl}_2$ , importante para a atividade ureolítica, IPTG para induzir a expressão da proteína heteróloga, uréia como substrato da mesma e um indicador de pH, o vermelho de cresol, para verificar um aumento de pH, proveniente de liberação de amônia, pela possível degradação da uréia pela urease. Verificou-se que as colônias 1, 6 e 14 apresentaram um halo rosado ao redor da colônia, indicando uma provável expressão de JBURE-IIB na forma ativa (Figura 2.8). A atividade da urease em *E. coli*, em princípio, não era esperada, visto que necessitaria, teoricamente, da presença de enzimas acessórias para incorporação de níquel no sítio ativo. Apesar de algumas enterobactérias como *K. aerogenes* possuírem o operon da urease e serem urease-positivas, *E. coli* geralmente não possui atividade ureolítica (Mobley *et al.*, 1995). Witte *et al.*, (2005b) demonstrou a ausência de atividade ureásica em extratos de *E. coli* BL21 Star (DE3). Porém, no mesmo trabalho, quando se transformou *E. coli* com os cDNAs codificantes de urease e enzimas acessórias de *A. thaliana*, houve expressão da urease ativa. Neste caso, na ausência de co-transformação com proteínas acessórias, esperava-se obter a apoenzima. Porém, a ativação de urease pode ser feita incubando-se a mesma com altas concentrações de níquel ( $\text{NiCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ ). Ainda que apenas 15% da proteína seja ativada nestas condições (Park & Hausinger, 1996; Yamaguchi *et al.*, 1999), poderia ser o suficiente para hidrolisar a uréia e alcalinizar o meio de cultura.

Foram realizados ensaios de expressão em meio de cultura LB líquido, com os clones 1, 6 e o “pool” de células, obtidas diretamente da transformação das células e seleção em meio líquido, denominado CT (células totais), como descrito anteriormente.



**Figura 2.8 Ensaio de atividade ureásica em placas.** As células transformadas com vetor PET101/ *jbure*-IIB (clones 1, 6 e 14) ou PET101/ $\beta$ -galactosidase (controle negativo) foram multiplicadas em placas de Petri, contendo ampicilina 100  $\mu\text{g/ml}$ , 1 mM de IPTG (indutor da expressão), 60 mg/ml de uréia (substrato da urease), 100  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{NiCl}_2$  e 0,35 mg/ml de vermelho de cresol (indicador de pH). A cor amarela indica pH neutro e a cor rosada significa aumento de pH (atividade da urease sobre uréia libera dióxido de carbono e amônia, elevando o pH). C-: controle negativo (células de *E. coli* transformadas com vetor controle PET101/ $\beta$ -galactosidase). 1, 6 e 14: indicam os respectivos clones de células de *E. coli* transformadas com vetor controle PET101/*jbure*-IIB.

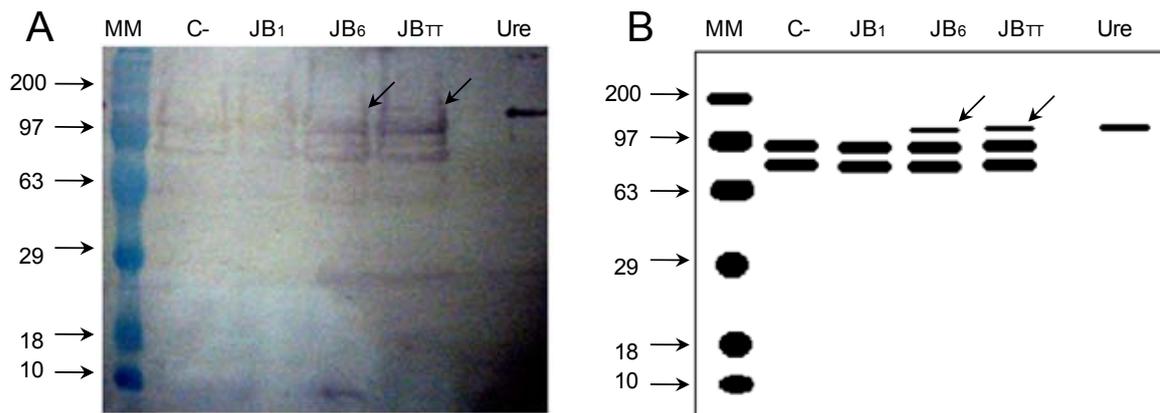
As células foram induzidas com IPTG 1 mM por 18 h e submetidas a gel de poliacrilamida. Não foi possível observar banda de indução do tamanho esperado para JBURE-IIB diretamente no gel. Realizou-se então um Western blot, utilizando anticorpos anti-canatoxina (Barcellos *et al.*, 1993) no qual verificou-se a presença de uma banda de indução de aproximadamente 90 kDa, no clone 6 e na amostra TT, em relação ao controle negativo (Figura 2.9). Bandas inespecíficas foram observadas em todas as amostras, de aproximadamente 60 kDa.

Na tentativa de melhorar os níveis de expressão da proteína JBURE-IIB, foram realizadas induções em diferentes condições de temperatura, associada a diferentes concentrações do indutor. Através de dot-blot com anticorpos anti-jaburetox-2Ec (reage com um peptídeo interno da JBURE-II, descrito no capítulo IV desta tese) concluímos que a melhor condição testada foi a de 0,1 mM de indutor IPTG, a 37° C, 16 h (Figura 2.10). Observa-se que quando se utilizou o anticorpo anti-jaburetox-2Ec, não há reação cruzada do mesmo com as proteínas do extrato das células controle (Figura 2.10, C-) nas condições testadas, podendo ser utilizado para acompanhamento da expressão de JBURE-IIB em ensaios de escalonamento da produção.

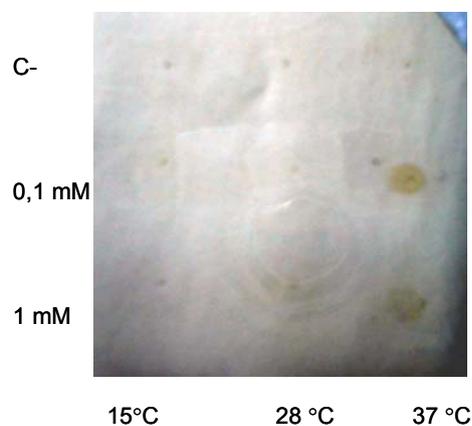
Observou-se assim, a expressão heteróloga da proteína codificada por *jbure-IIB* em células de *E. coli*. Este é um passo importante no estudo desta família gênica, visto que já foram descritos o cDNA e a proteína JBU, a proteína canatoxina e os cDNAs *jbure-II* e *jbure-IIB*.

Porém, ainda não foi esclarecido se algum destes cDNAs codifica a enzima canatoxina, visto que os dados de seqüenciamento de fragmentos de canatoxina obtidos anteriormente (Follmer *et al.*, 2001) não permitiram certificar nesse trabalho se algum dos cDNAs caracterizados codifica essa proteína. Os fragmentos seqüenciados são muito pequenos, alguns ocorrem em regiões de seqüências idênticas entre as ureases de diferentes origens ou com diferenças apenas na região C-terminal do fragmento, que são menos confiáveis (Figura 2).

Além disso, permitirá a obtenção de quantidades suficientes para realização de diversos ensaios biológicos, com a proteína pura, livre de contaminação com sua isoforma, cuja separação através de metodologias cromatográficas convencionais, apesar de estabelecido (Follmer *et al.*, 2004b), é



**Figura 2.9 Análises de Western blot da expressão heteróloga de JBURE-IIB em células de *E. coli* com anticorpos anti-CNTX.** Painel A: cópia de western blot original. Painel B: esquema do wester blot apresentado no painel A. MM: marcador molecular (kDa); C-: Controle negativo; JB1: indução do clone isolado 1 (transformado com pET 101/*jbure-IIB*); JB6: indução do clone isolado 6; JBTT: indução de células transformadas totais. Ure: urease de *C. ensiformis* JBU (Sigma). O anticorpo anti-canatoxina foi utilizado na diluição 1:5.000, seguido do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina na diluição 1:5.000. As setas indicam a banda correspondente à JBURE-IIB recombinante.



**Figura 2.10 Teste de temperatura X Concentração de IPTG para expressão de JBURE-IIB recombinante em células de *E. coli*.** O dot-blot foi realizado com extrato total de células induzidas com 0,1 ou 1 mM de IPTG para as células transformadas com *jbure-IIB* e 1 mM IPTG, para as células controle (transformadas com vetor controle do kit). As temperaturas testadas foram de 15, 28 e 37 °C. O anticorpo anti-jaburetox-2Ec foi utilizado na diluição 1:10.000, seguido do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à HRP 1:10.000.

bastante trabalhosa, além de obter-se baixo rendimento com certo grau de contaminação. Além disso, permitirá obtenção da apoenzima, através de expressão em meio de cultura sem adição de níquel.

Por outro lado, devido aos baixos níveis de expressão obtidos para a proteína JBURE-IIB, em um segundo momento, será necessário escalar a produção para biorreatores. A obtenção de maior quantidade de massa da proteína recombinante possibilitará a realização de ensaios de outras atividades biológicas, como indução de agregação plaquetária (dose efetiva de 10 a 20  $\mu\text{g}$  proteína/mL para plaquetas de coelho), ou ainda, toxicidade intraperitoneal em camundongos (dose letal de 30 a 50  $\mu\text{g}$  por animal), por enquanto uma atividade descrita unicamente para a canatoxina.

Esses dados, juntamente com informações adicionais de seqüências de fragmentos internos da canatoxina (em andamento no grupo) permitirão esclarecer a relação entre essa proteína e os cDNAs de isoformas de ureases identificados até então na *C. ensiformis*.

## Capítulo 3

**PEPTÍDEO INSETICIDA (JABURETOX-2) DERIVADO DE UMA ISOFORMA DE  
UREASE DE *Canavalia ensiformis*: EXPRESSÃO HETERÓLOGA,  
BIOENSAIOS E MODELAGEM MOLECULAR**

**3A. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis***

“Peptides 28 (2007) 2042 – 2050”

**3B. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity**

“Enzyme and Microbial Technology 41 (2007) 821–827”

**3C. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae)**

“Toxicon 45 (2005) 753–760”

## Justificativa

A liberação do peptídeo inseticida a partir de digestão da canatoxina por enzimas digestivas do tipo catepsinas de alguns insetos foi demonstrada por Carlini *et al.* (1997) e Ferreria-Da-Silva *et al.* (2000). Um peptídeo inseticida obtido por hidrólise *in vitro* da proteína, denominado pepcanatox foi isolado e purificado, tendo sido a sua seqüência N-terminal determinada por Gombarovits (1999). Porém, a obtenção do mesmo, partindo de enzimas isoladas dos insetos e purificação do peptídeo por métodos cromatográficos, além de trabalhosa e dispendiosa, gerava pouca quantidade de material, com um grau de pureza relativamente baixo.

Devido ao interesse no seu uso biotecnológico como bioinseticida, tornou-se necessário desenvolver metodologias para obtenção de grandes quantidades do peptídeo em elevado grau de pureza, permitindo realização de diversos ensaios, como toxicidade contra diferentes grupos de insetos, suscetíveis e não suscetíveis à canatoxina e de toxicidade em camundongos, entre outros. A idéia de produção de um peptídeo equivalente ao pepcanatox, a partir do cDNA de uma isoforma de urease, permitiria não só obter material suficiente, em elevado grau de pureza, mas também confirmaria o mecanismo de produção de peptídeo a partir da urease/canatoxina, como mencionado acima.

Os mecanismos de ação inseticida das ureases e peptídeos derivados estão sendo investigados. A modelagem molecular é uma ferramenta auxiliar na investigação do possível mecanismo de ação, através de analogia de estrutura X atividade, direcionando os estudos para os possíveis mecanismos propostos.

**Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis***

**Mulinari F.<sup>a</sup>, Stanisçuaski F.<sup>a</sup>, Bertholdo-Vargas L.R.<sup>a,b</sup>, Postal M.<sup>a</sup>,  
Oliveira-Neto O.B.<sup>c</sup>, Rigden D.J.<sup>d</sup>, Grossi-de-Sá M.F.<sup>a,c\*</sup> & Carlini C.R.<sup>a,e</sup>**

<sup>a</sup> Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>b</sup> Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil

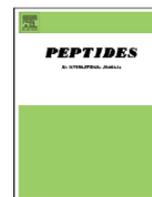
<sup>c</sup> Cenargen/EMBRAPA, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 02372, Brasília-DF CEP 70.770-900, Brasil

<sup>d</sup> Escola de Ciências Biológicas, Universidade de Liverpool, Liverpool L69 7ZB, UK

<sup>e</sup> Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

## Resumo

Canatoxina, uma isoforma de urease de sementes de *Canavalia ensiformis* apresenta atividade inseticida contra diferentes espécies de insetos. Sua toxicidade depende da liberação de um peptídeo interno de 10 kDa (pepcanatox), produzido pela hidrólise da canatoxina por catepsinas presentes no sistema digestivo dos insetos suscetíveis. Neste trabalho, baseado na seqüência N-terminal de pepcanatox, desenhamos oligonucleotídeos para amplificar um fragmento de 270 pb correspondente ao pepcanatox, utilizando como molde o cDNA de JBURE-II (uma das isoformas de ureases clonadas de *C. ensiformis*, com elevada identidade com JBU, a urease clássica). Este produto de amplificação, denominado *jaburetox-2* (jackbean urease toxin 2) foi clonado no vetor pET101 para obtenção da expressão heteróloga da proteína recombinante em células de *Escherichia coli*, em fusão com um epitopo V-5 e seis histidinas na extremidade C-terminal do peptídeo. *Jaburetox-2Ec* (expresso em células de *E. coli*) foi purificado em resina Níquel-NTA e testado contra insetos-modelo. Ninfas de *Dysdercus peruvianus* foram alimentadas com dietas de farinha de algodão contendo *jaburetox-2Ec* 0.01% (m/m) e após 11 dias, todos os insetos estavam mortos. *Jaburetox-2Ec* também foi testado contra larvas de *Spodoptera frugiperda* e causou 100% de mortalidade. Em contraste, altas doses de *jaburetox-2Ec* foram inócuas quando injetadas ou ingeridas por camundongos e ratos neonatos. A modelagem molecular de *jaburetox-2Ec*, em comparação com outras estruturas de peptídeos, revelou um motivo de grampo-beta proeminente, consistente com a atividade inseticida baseada em neurotoxicidade ou permeabilidade celular.

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/peptides](http://www.elsevier.com/locate/peptides)

## Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*

F. Mulinari<sup>a</sup>, F. Stanisçuaski<sup>a</sup>, L.R. Bertholdo-Vargas<sup>a,b</sup>, M. Postal<sup>a</sup>,  
O.B. Oliveira-Neto<sup>c</sup>, D.J. Rigden<sup>d</sup>, M.F. Grossi-de-Sá<sup>a,c,\*</sup>, C.R. Carlini<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup>Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Institute of Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

<sup>c</sup>Cenargen/EMBRAPA, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, National Centre of Genetic Resources and Biotechnology, CP 02372, Brasília-DF CEP 70.770-900, Brazil

<sup>d</sup>School of Biological Sciences, University of Liverpool, Liverpool L69 7ZB, UK

<sup>e</sup>Department of Biophysics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 June 2007

Received in revised form

2 August 2007

Accepted 3 August 2007

Published on line 17 August 2007

#### Keywords:

Canatoxin

Insecticide

*Spodoptera frugiperda*

*Dysdercus peruvianus*

Molecular modeling

Heterologous expression

### ABSTRACT

Canatoxin, a urease isoform from *Canavalia ensiformis* seeds, shows insecticidal activity against different insect species. Its toxicity relies on an internal 10 kDa peptide (pepcanatoxin), released by hydrolysis of Canatoxin by cathepsins in the digestive system of susceptible insects. In the present work, based on the N-terminal sequence of pepcanatoxin, we have designed primers to amplify by PCR a 270-bp fragment corresponding to pepcanatoxin using JBURE-II cDNA (one of the urease isoforms cloned from *C. ensiformis*, with high identity to JBURE-I, the classical urease) as a template. This amplicon named jaburetox-2 was cloned into pET 101 vector to obtain heterologous expression in *Escherichia coli* of the recombinant protein in C-terminal fusion with V-5 epitope and 6-His tag. Jaburetox-2Ec was purified on Nickel-NTA resin and bioassayed in insect models. *Dysdercus peruvianus* larvae were fed on cotton seed meal diets containing 0.01% (w/w) Jaburetox-2Ec and, after 11 days, all individuals were dead. Jaburetox-2Ec was also tested against *Spodoptera frugiperda* larvae and caused 100% mortality. In contrast, high doses of Jaburetox-2Ec were innocuous when injected or ingested by mice and neonate rats. Modeling of Jaburetox-2Ec, in comparison with other peptide structures, revealed a prominent  $\beta$ -hairpin motif consistent with an insecticidal activity based on either neurotoxicity or cell permeation.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Canatoxin, a toxic protein isolated from *Canavalia ensiformis* seeds [5], and more recently identified as an isoform of urease [13], displays insecticidal properties when fed to insects that

relay on cathepsins as their main digestive enzymes as the kissing bug *Rhodnius prolixus*, the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus*, the Southern green soybean stinkbug *Nezara viridula* and the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* [4,7,31]. The major form of *C. ensiformis* urease and the soybean seed urease

\* Corresponding author. Tel.: +55 61 3448 4705/+55 61 3448 4902; fax: +55 61 3340 3658.

E-mail address: [fatimasa@cenargen.embrapa.br](mailto:fatimasa@cenargen.embrapa.br) (M.F. Grossi-de-Sá).

URL: <http://www.cenargen.embrapa.br/laboratorios/LIMPP/index.htm>, <http://www.ufrgs.br/laprotox>

Abbreviations: CNTX, canatoxin; IPTG, isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside; JBURE-I, jack bean urease I (classical urease); JBURE-II, jack bean urease isoform II; LB, Luria-Bertani medium.

0196-9781/\$ – see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.peptides.2007.08.009

also have entomotoxic activity suggesting that this property may be common to all plant ureases [14].

The entomotoxic effect of urease is independent of its ureolytic activity [14] and requires proteolytic processing of the protein by insect enzymes [7,12]. Previous studies have shown that the entomotoxicity of canatoxin relies on an internal peptide (pepcanatox), which could be produced in vitro by hydrolyzing the protein with cathepsins obtained from susceptible insects [12,17].

To fully understand the biological activity and mode of action of urease-derived peptides would require large amounts of pepcanatox, which would be difficult to accomplish given the low yield of the production methods available [6].

In this report, we describe a method for production of a recombinant peptide equivalent to pepcanatox. For that, we have amplified a pepcanatox-like cDNA fragment from JBURE-II, a gene encoding one of the urease isoforms from *C. ensiformis* [26]. This amplicon, named *Jaburetox-2* (Jack bean urease toxin), was subcloned into an expression vector to produce recombinant *Jaburetox-2Ec* in *Escherichia coli* [25]. The entomotoxic effect of this recombinant peptide was demonstrated using the cotton stainer bug *D. peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae), a model insect that utilizes cathepsins as the main digestive enzymes and features an acidic gut [28], as well as the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), a model insect displaying serine proteinases and an alkaline digestive system [11,13,28].

The mode of insecticidal action of plant ureases or derived peptides has not been studied in detail so far. In *Rhodnius prolixus* impairment of diuresis and symptoms suggestive of neurotoxicity, such as incoordinated movements of limbs and antenna and reversible paralysis in sub-lethal doses [17], are seen following a meal of urease or pepcanatox. In this work, the molecular modeling of *Jaburetox-2Ec* was proposed to aid the identification of possible motifs, which could be involved in entomotoxic activity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Primer design and polymerase chain reaction

The JBURE-II fragment corresponding to pepcanatox was identified by alignment of the pepcanatox N-terminal sequence with the deduced amino acid sequence of JBURE-II (Genbank Accession number AF468788). The CCAC sequence and an ATG start codon were added to the 5'-end of the forward primer (5'-CACCATGGGT CCAGTTAATGAAGCC-3'). The reverse primer was designed based on JBURE-II sequence and the predicted size of the entomotoxic peptide (10 kDa), corresponding to 81 amino acid residues (Fig. 1, 5'-ATAACTTTCCACCTCC-3'). PCR amplification of *Jaburetox-2Ec* fragment from JBURE-II gene was performed in a 25 µl reaction, containing 500 ng of pGEMT-easy/JBURE-II as the template DNA, 400 nM of each primer, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), and 2.5 U Pfu DNA polymerase (Stratagene) in buffer. The reaction was carried out in a programmable thermocycler using the following reaction cycles: initial denaturation at 94 °C for 1.5 min followed by 30 consecutive cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing for 45 s at 54 °C, and extension at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 5 min. The size (270 bp) and amount of the *Jaburetox-2Ec* amplicon was monitored on 1.5% agarose gel.

### 2.2. *Jaburetox-2Ec* amplicon cloning

The PCR product was purified from agarose gel using the GenClean kit (BIO 101) and cloned into the pET 101 D/TOPO vector (Invitrogen), using 5 ng of the PCR product in a reaction containing 200 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> and pET 101 vector. Chemically competent *E. coli* (TOP 10) cells were transformed with 3 µl of the ligation reaction and grown overnight in LB medium containing 100 µg/ml ampicillin. The positive transformants were analyzed by PCR, using whole colonies as a source for DNA template. The amplification of *Jaburetox-2Ec*

```

ATGGTCCAGTTAATGAAGCCAATTGTAAGCAGCTATGGAGATTGTGTGCAGAAGGGAA 60
M G P V N E A N C K A A M E I V C R R E 20
TTTGGACATAAGGAAGAAGAAGATGCAAGTGAGGGTGTACCACAGGAGACCCCTGATTGT 120
F G H K E E E D A S E G V T T G D P D C 40
CCTTTCACCAAAGCCATTCTCTGTAAGAATATGCTAACAAGTATGGTCCGACTATTGGT 180
P P T K A I P R E E Y A N K Y G P T I G 60
GACAAAATCCGCTCTGGTGACACTGATTTGATTGCTGAAATGAAAAGGATTTGCCCTT 240
D K I R L G D T D L I A E I E K D F A L 80
TATGGTGATGAAAGTGTTTTGGAGGTGAAAAGTTATAAAGGGCGAGCTCAATTCGAAG 300
Y G D E S V F G G G K V I k g e l n s k 100
CTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCAT 360
l e g k p i p n p l l g l d s t r t g h 120
CATCACCATCACCATTGA
h h h h h *
125 378

```

Fig. 1 – Nucleotide and its deduced amino acid sequence of a cDNA for the *Jaburetox-2Ec*. The deduced amino acid sequence is shown below their respective codons. Nucleotide and amino acid numbers of *Jaburetox* sequence are indicated on the right side. The box indicates an additional start codon. The primers regions are underlined. The *Jaburetox* sequence is shown in uppercase letters and fusion V-5 epitope and polyhistidine vector sequence is shown in lowercase letters.

was monitored by agarose gel electrophoresis with DNA stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml). Three recombinant plasmids containing insert of expected size were purified from recombinant colonies (mini-preparations) and sequenced on ABI 3700 automated sequence analyzer (Applied Biosystems, Perkin-Elmer), using T7 forward primer to confirm the presence, correct DNA sequence and insert orientation.

### 2.3. Expression of recombinant Jaburetox-2Ec and polyacrylamide gel electrophoresis

A pET 101/Jaburetox-2Ec recombinant plasmid was transformed into chemically competent *E. coli* BL21 Star (DE3) and inoculated into 10 ml of LB containing 100 µg/ml ampicillin. Cultures were incubated at 37 °C until OD<sub>600</sub> reached 0.6–0.8. IPTG was added to a final concentration of 0.75 mM and 0.5 ml of culture was sampled after 1 h after induction. Cultures without induction served as control. Cells were centrifuged (5000 × g, 10 min), resuspended into SDS-PAGE sample buffer and analyzed by Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 12% (SDS-PAGE) according to Laemmli [20] and stained with Coomassie Blue R-250.

### 2.4. Purification of Jaburetox-2Ec using Ni-NTA agarose

For isolation and purification of Jaburetox-2Ec, 250 ml of LB medium containing 100 µg/ml ampicillin were inoculated with 5 ml of the above culture. The cells were grown 2 h at 37 °C under shaking (OD<sub>600</sub> = 0.7) and then IPTG was added to 1 mM. After 2 h, the cells were harvested by centrifugation and resuspended in 10 ml of lysis buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% (v/v) glycerol, 0.5% (v/v) Triton X-100 and 10 mM imidazole), sonicated, centrifuged (14,000 × g, 20 min) and 10 µl of supernatant or 5 µl of the pellet sample were analyzed by SDS-PAGE. The supernatant was loaded onto a 2 ml Ni affinity column (Ni-NTA—QIAGEN), which was previously equilibrated with the equilibration buffer (50 mM sodium phosphate buffer pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole). After 30 min, the column was washed with 20 ml of the same buffer, containing 20 mM imidazole. The protein was eluted with the equilibration buffer containing 200 mM imidazole and quantified by the Bradford method [2]. The samples were dialyzed against deionized water.

### 2.5. Western blot analysis

This was done according to the Towbin method [32]. Purified Jaburetox-2Ec was electrophoresed and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane, then immersed in blocking buffer, consisting of 5% nonfat dry milk in phosphate-buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl and 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 7.3), and 0.05% Tween. After washing, the membrane was incubated with a rabbit IgG anti-canatoxin antibody [13], diluted 1:5000 in blocking buffer, with gentle shaking for 3 h at room temperature, followed by a 2 h incubation with anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma Chem. Co., 1:5000 dilution) as secondary antibody. The colorimetric detection was carried out by using BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate *p*-toluidine salt) and NBT (nitro-blue tetrazolium chloride).

### 2.6. Insect bioassays

#### 2.6.1. Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec in *D. peruvianus*

The bioassay was carried out according to Stanisquaski et al. [31]. Third instars *D. peruvianus* were fed on artificial cotton seeds, consisting of gelatin capsules (size 2 or 3, Elli Lilly Co.) containing cotton seed flour and 0.01% (w/w) freeze-dried Jaburetox-2Ec or canatoxin (purified according Follmer et al. [15]). The purified Jaburetox-2Ec was exhaustively dialyzed against 5 mM sodium phosphate pH 7.5 buffer and the last change of dialysis buffer was used as control in the bioassay. Groups of 30 insects were tested in triplicates and monitored for survival during 15 days.

#### 2.6.2. Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec in *S. frugiperda*

Three groups of six third instar *S. frugiperda* were reared on *Phaseolus vulgaris* leaves. The insects were kept in individual plastic cups closed with silkscreen tissue at 26 °C, 85% humidity, 12-h dark–12-h light cycles. At days 0, 2 and 4, drops (20 µl) of a phosphate buffered solution containing 16.3 µg Jaburetox-2Ec were air-dried onto the surface of foliar discs (30.5 mm<sup>2</sup>) and fed to each larva. Control larvae received foliar discs containing 20 µl air-dried dialysis buffer. The mortality in the group and individual weight gain were measured daily.

### 2.7. Toxicity of Jaburetox-2Ec in mammalian models

Adult Swiss mice (males, 20 g) or neonate Wistar rats from the central animal facility of Universidade Federal do Rio Grande do Sul were used for these experiments. Groups of six animals each were injected by intraperitoneal route or received orally (intra-gastric tubing) a single dose of canatoxin [15] (3 mg/kg, equivalent to 1.5 LD<sub>50</sub> [13]) or Jaburetox-2Ec (10 mg/kg) in phosphate buffered saline. The animals were kept in individual cages, except neonate rats which were returned to their mother's, and observed daily during the next 5 days. The experimental protocols were designed according to approved institutional protocols for animal experimentation.

### 2.8. Statistical analysis of bioassays

Unpaired Student t-test was applied to the bioassay data and *p* < 0.05 was considered significant.

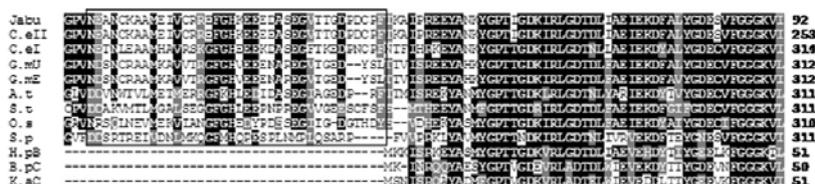
### 2.9. Ab initio modeling of Jaburetox-2Ec

ROSETTA was used for *ab initio* model building using default protocols: 2000 individual models were constructed from 3- and 9-residue segments using Monte Carlo substitution and optimization protocols [29,30]. These were clustered based on RMSD calculations [27] and visualized and compared with PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net>).

## 3. Results

### 3.1. Jaburetox-2Ec cloning

The Jaburetox-2Ec fragment was amplified by PCR from the JBURE-IIB gene, previously cloned in pGEMT-easy by Pires-



**Fig. 2 – Alignment of Jaburetox-2Ec with other ureases.** Alignment of Jaburetox-2Ec with plant, fungal and bacterial ureases using CLUSTAL W. The sequences are from *Canavalia ensiformis* JBURE-I (GenBank Accession no. AAA83831) C.eI, *Canavalia ensiformis* JBURE-II (AA08919) C.eII, *Glycine max* embryo-specific (AA085884) G.mE, *Glycine max* ubiquitous (AA08583) G.mU, *Arabidopsis thaliana* (AAG52306) A.t, *Solanum tuberosum* (CAC43860) S.t, *Oriza sativa* (BAB78715) O.s, *Schizosaccharomyces pombe* (CAB52575) S.p, *Helicobacter pylori* chain B (AAL86896) H.pB, *Bacillus pasteurii* chain C (4UBPC) B.pC and *Klebsiella aerogenes* chain C (AAA25149) K.aC. The box indicates the region between beta and alpha domains (bacterial UreB and UreC).

Alves et al. [26] and introduced into pET 101 vector using primers that inserted an initiation codon (Fig. 1). The sequence was cloned in frame to V-5 epitope and a poly-Histidine tag. The Jaburetox-2Ec sequence was compared with other sequences from Databanks using BLASTp and showed identity ranging from 53 to 73% to plant ureases (*Oriza sativa* and JBURE-I isoform from *C. ensiformis*, respectively). The alignments in Fig. 2 show that Jaburetox-2Ec is located between the beta and alpha domains being partially absent in all microbial ureases sequenced so far.

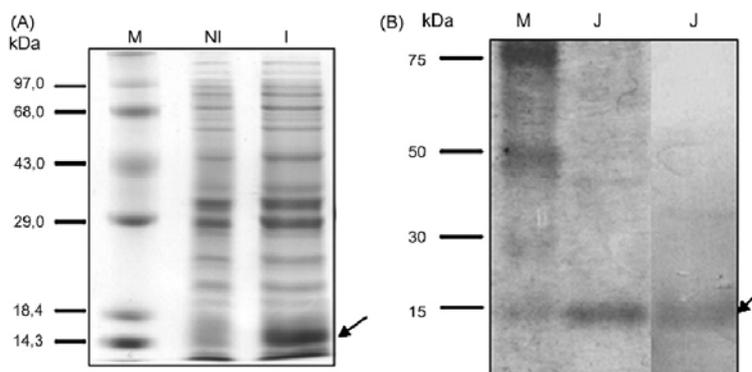
**3.2. Expression of V5-6His tagged recombinant Jaburetox-2Ec in E. coli and purification**

The pET/Jaburetox-2Ec vector was transformed into *E. coli* strain BL21 Star (DE3). The resulting *E. coli* BL21 (pET101/Jaburetox-2Ec) strain produced V5-His6 tagged recombinant Jaburetox-2Ec, driven by the IPTG-inducible T7 promoter. A differential band, corresponding to the expected 13 kDa (10 kDa of Jaburetox-2 and 3 kDa of V-5 epitope and 6 His

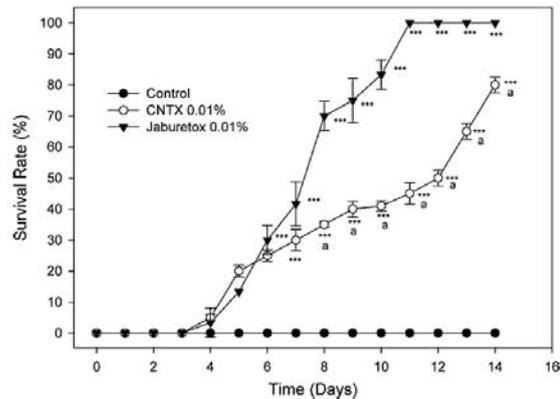
tag) recombinant protein was observed in SDS-PAGE for the *E. coli* BL21 (pET101/Jaburetox-2Ec) total lysate after IPTG induction (Fig. 3A). This band was absent from the control (not induced) total lysate. The expression conditions were optimized to increase the yield of Jaburetox-2Ec and the best results were obtained after induction with 1 mM IPTG at 37 °C for 2 h. Using this condition, Jaburetox-2Ec was purified from 250 ml *E. coli* (pET 101/Jaburetox-2Ec) culture. The bulk of recombinant protein remained soluble after sonication of the cells, allowing the purification of the native protein by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography (Fig. 3B). The final yield of purified Jaburetox-2Ec was estimated as 6.3 mg/L of *E. coli* culture. The recombinant Jaburetox-2Ec was recognized by anti-canatoxin polyclonal antibodies (Fig. 3B).

**3.3. Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec**

The entomotoxic effect of recombinant Jaburetox-2Ec was tested against third instar *D. peruvianus*, fed on artificial cotton seeds containing 0.01% (w/w) freeze-dried purified Jaburetox-



**Fig. 3 – Production of recombinant Jaburetox-2Ec.** (A) SDS-PAGE analysis of the recombinant Jaburetox-2Ec in cell lysates. Lane NI, without induction. Lane I, 1-h induction with 0.75 mM IPTG. (B) SDS-PAGE analysis of purified Jaburetox-2Ec. Lane J: 10 µg protein eluted from the Ni<sup>2+</sup> affinity column chromatography. Right side: Western blot analysis of recombinant Jaburetox-2Ec with anti-canatoxin antibodies and anti-rabbit IgG alkaline phosphate conjugates. In all panels: lane M, molecular markers. The numbers on the left indicates molecular mass of markers in kDa. The gels were stained with Coomassie blue.



**Fig. 4 – Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec on *D. peruvianus*.** Third instar nymphs fed on artificial seeds containing 0.01% (w/w) Jaburetox-2Ec. Surviving insects were counted daily. Results are expressed as mean mortality and S.E.M. of three independent experiments in triplicates. Level of significance in the t-test in comparison to control insects (\*\* $p < 0.001$ ) or between the experimental groups (\* $p < 0.001$ ) are indicated.

2Ec. For comparison, canatoxin was fed to insects at the same dose. The insects were observed for mortality during 15 days. As shown in Fig. 4, the lethal effect of Jaburetox-2Ec was time dependent, with a lag phase of 3–4 days and 100% mortality being reached after 11 days. Mortality of canatoxin-fed insects showed a slower rate with 20% insects still alive at the end of the experiments.

In order to test the insecticidal activity against insects with trypsin-based digestion and alkaline midguts, which are insensitive to intact ureases [7], third instars *S. frugiperda* received a diet of *P. vulgaris* foliar discs containing air-dried Jaburetox-2Ec. The larvae were given 16.3  $\mu\text{g}$  of Jaburetox-2Ec on days 0, 2 and 4. On the second day, the mean weight of

larvae feeding Jaburetox-2Ec was approximately 30% smaller than the controls (Fig. 5A). A lag phase of 2 days was observed before lethality of the insects and on sixth day, after ingesting a total of 47  $\mu\text{g}$  jaburetox-2Ec, all larvae were dead (Fig. 5B).

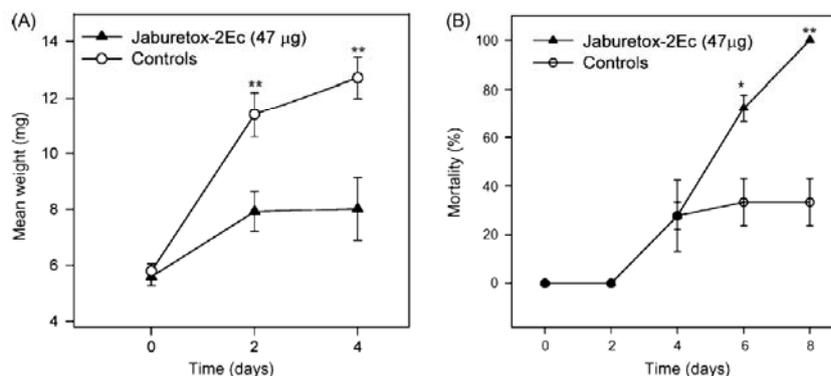
### 3.4. Toxicity of Jaburetox-2Ec to mice and neonate rats

Mice and neonate rats injected with a single dose of 10 mg/kg of Jaburetox-2Ec were alive and showed no signs of toxicity 5 days after the injection, contrasting to animals that received intraperitoneally 3 mg/kg of canatoxin (equivalent to 1.5 LD<sub>50</sub> [13]), which died within 12 h after injection. The toxic effects of canatoxin in mice and rats have been previously described [5,8]. When Jaburetox-2Ec or canatoxin were given by oral route at the same dose, all animals survived with no symptoms of intoxication.

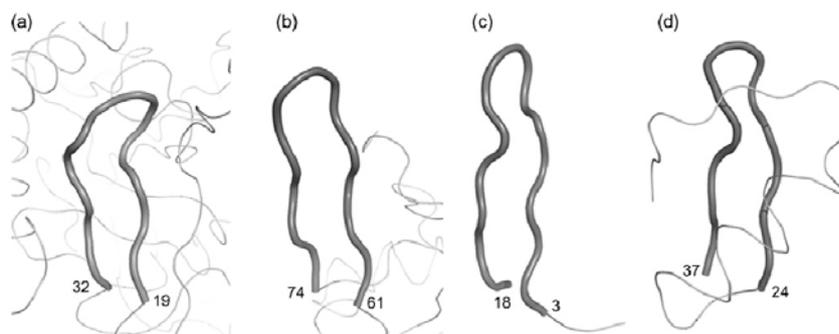
### 3.5. Modeling of Jaburetox-2Ec

Modeling was carried out in order to see if the structural properties of Jaburetox-2Ec offered any clues as to its mode of action. As shown in Fig. 2, the N- and C-terminal portions of the peptide are homologous to regions of different chains of bacterial ureases, potentially providing templates for modeling of Jaburetox-2Ec. For example, the Jaburetox-2Ec sequence could be aligned with residues 204 onwards of chain A of the *H. pylori* urease crystal structure [18] (PDB code 1e9y) and the first 51 residues of chain B of the same structure. However, these regions have few contacts in the crystal structure, within themselves and between the chains—evidently once the Jaburetox-2Ec sequence is cleaved from its parent enzyme it must undergo significant structural reorganization.

We therefore employed the emerging technology of *ab initio* protein modeling to the Jaburetox-2Ec sequence. We used the Rosetta program [27,29,30] which assembles many different models from protein fragments and ranks them according to how many times similar models emerge from independent trials and are clustered together. In this case, no particular model emerged as appearing favorable with the top 10 models



**Fig. 5 – Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec on *S. frugiperda*.** Three groups of six third instars *S. frugiperda* received at days 0, 2 and 4, a foliar (*P. vulgaris*) disc containing 16.3  $\mu\text{g}$  air-dried Jaburetox-2Ec. (A) Weight gain of individual insects at days 0, 2 and 4. (B) Mortality (%) of larvae in each group was registered on days 0, 2, 4, 6 and 8. Data are expressed as mean and S.E.M. of one experiment out of three. Asterisks indicate level of significance in the t-test ( $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ) in comparison to control insects.



**Fig. 6 – Ab Initio modeling of Jaburetox-2Ec and comparison to other  $\beta$ -hairpin motifs.**  $\beta$ -Hairpin motifs (shown as cartoon representation in darker color) in (a) the intact *H. pylori* urease [24] (PDB code 1e9y), (b) one of the top 10 *ab initio* models of Jaburetox-2Ec, (c) protegrin [1] (PDB code 1pg1) and (d) charybdotoxin [21] (PDB code 2crd). The termini of the motifs are labeled with residue numbers.

all representing clusters of similar size. Nevertheless, although differing significantly in the packing of  $\alpha$ -helices, with a single exception, they contained a large, generally exposed,  $\beta$ -hairpin structure (Fig. 6b). Since this feature was near-ubiquitous among the model set, and also present in the known crystal structures of urease (Fig. 6a), it was viewed as a reliable predictor with possible implications for function as discussed below.

#### 4. Discussion

Plant genetic transformation with exogenous genes encoding factors of resistance to phytophagous insects is an interesting strategy to reduce crop losses due to insect attack. Efforts have been focused on studies of different insecticidal proteins [4].

In this work, we have expressed in *E. coli* a peptide derived from JBURE-II, an isoform of urease from *C. ensiformis*, and demonstrated its insecticidal effect. The conditions for expression of the pET 101/Jaburetox-2Ec amplicon were optimized and a satisfactory yield was obtained. Jaburetox-2Ec was recognized by anti-canatoxin polyclonal antibodies (Fig. 2B) and the sequence of recombinant Jaburetox-2Ec was determined by mass spectrometry, confirming the correct translation of the recombinant peptide (data not shown).

The entomotoxicity observed for this recombinant peptide, derived from the JBURE-II urease isoform, corroborates the hypothesis that plant ureases are protoxins able to release entomotoxic peptide(s) upon limited proteolysis, as demonstrated for canatoxin [12]. As reported for canatoxin [7], the insecticidal activity of Jaburetox-2Ec occurs at very low doses at 0.01–0.1% (w/w), as compared to other plant-derived entomotoxic proteins [4]. The mortality observed against *D. peruvianus* after 10 days on diet containing Jaburetox-2Ec was two times higher than that observed for canatoxin under the same conditions. Calculations of doses effectively administered to the insects are difficult in the conditions of our bioassay (30 insects feeding on a single artificial seed during 15 days). Since the same w/w proportion of Jaburetox-2Ec (12.6 kDa) and canatoxin (monomer, 90 kDa) were present in

the artificial seeds, the amount of processed/entomotoxic peptide released from canatoxin would be 7.5-fold lower, therefore the lower lethality could be related to a lower dose of active peptide in the insects. Additionally the increased lag phase observed for the entomotoxic effect of canatoxin could also reflect the need for proteolytic activation of the intact protein to release the active peptide. In a previous work, insects relying on serine-proteinases as their main digestive enzymes, including lepidopterans such as *S. frugiperda* [11,10], were shown to be resistant to canatoxin's insecticidal effect. This resistance was attributed to an extensive hydrolysis of canatoxin by this class of proteolytic enzymes [7]. Here we demonstrated that young forms of *S. frugiperda* are also susceptible to the entomotoxic activity of Jaburetox-2Ec. Other insects with trypsin-based digestion such as the soybean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*, the German cockroach *Blattella germanica* and the termite *Cornitermis cumulans*, are also susceptible to Jaburetox-2Ec but not to canatoxin or urease (unpublished data). Thus, it appears that the species-specificity of plant ureases insecticidal activity is mainly related to the ability of the insect's digestive enzymes to adequately process the protein into an active entomotoxic peptide. If this step is not necessary, either by exposure to a preformed or a recombinant peptide, a broader range of insects is expected to be effectively controlled by this class of compounds.

Feeding trials have shown that the major isoform of *C. ensiformis* urease JBURE-I was as lethal as canatoxin against the kissing bug *R. prolixus* [4] and *D. peruvianus*, whereas both jackbean ureases were three-fold more potent than the soybean embryo specific urease [14]. The variation in entomotoxicity among plant ureases already studied is probably related to differences in the sequences corresponding to the Jaburetox peptide or inter-domain regions. In fact the N-terminal region of Jaburetox shares only 51% identity with the same region in soybean ureases, which is significantly lower than the overall identity of plant ureases, for instance, the beta (about 80% identity) or the alpha (about 83% identity) domains of JBURE-II as compared to soybean ureases (Fig. 2). Since the sequence corresponding to Jaburetox in ureases is not involved either in the enzymatic activity or in

subunit association, as shown by its absence in bacterial ureases, it probably diverged at a faster rate. Thus, variations of the biological properties of these sequences among plant ureases can be expected.

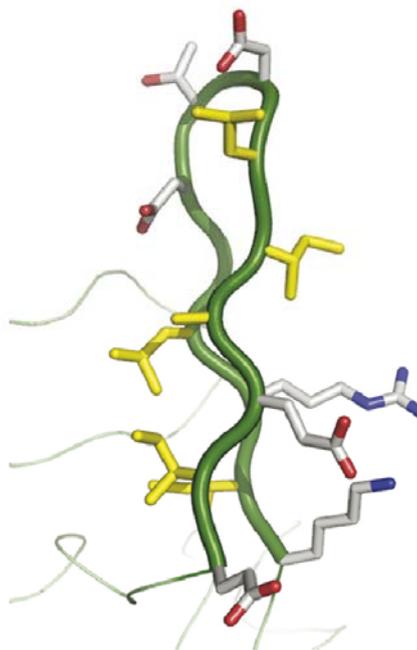
This internal sequence is also not responsible for the toxicity of canatoxin as Jaburetox-2Ec was innocuous at a 20-fold higher protein mass/body weight ratio than the LD<sub>50</sub> for mice and rats [5,8], either by intraperitoneal injection or by oral route (neonatal rats were chosen because of the increased permeability of their digestive tract).

Examination of the bacterial urease structures makes clear that there must be significant rearrangement of the Jaburetox portion post-cleavage, ruling out conventional model building by homology. *Ab initio* models were therefore constructed with ROSETTA. These were used to provide clues as to the possible molecular mode(s) of insecticidal action of the peptide. It was already known that Jaburetox is not an inhibitor of insect digestive enzymes [7,17]. After Jaburetox ingestion, the insects were momentarily paralyzed and show uncoordinated movements of antennae preceding death, suggesting that it might act as a neurotoxin or lead to cell death by affecting membrane permeability.

Peptides capable of forming pores in cell membranes are a very diverse group, divided into classes based on size and other characteristics [3]. Some insecticidal proteins, the Cry  $\delta$ -endotoxins, form pores by insertion of an  $\alpha$ -helical hairpin (two  $\alpha$ -helices lying antiparallel) into the membrane [22]. In the set of Jaburetox models this motif was absent, ruling out this mode of action. Single amphiphilic helices such as the antibiotic peptide melittin [33] or peptides derived from the apoptosis regulator Bax can form membrane pores [16] but none of the predicted helices of Jaburetox are amphiphilic in nature. Equally, there is no sign in the Jaburetox sequence of five consecutive hydrophobic residues forming a  $\beta$ -turn, the motif responsible for membrane insertion of the toxin aerolysin [19].

In contrast, nine of the 10 proposed *ab initio* models of Jaburetox contained  $\beta$ -hairpin structures, formed from residues whose counterparts in bacterial urease structures also form this motif (Fig. 7). Intriguingly, this motif is common (Fig. 7) to both a class of pore-forming peptides [3] and to a type of neurotoxin [23], represented by charybdotoxin [1], whose toxicity arises from binding to and inhibition of membrane ion (K<sup>+</sup>) channels. In this context it is noteworthy to mention that neurotoxic symptoms (such as paralysis and uncoordinated movements of limbs and antenna) are seen in *R. prolixus* intoxicated by Jaburetox-2Ec. In a study to be published somewhere else, we showed that very low concentrations (10<sup>-12</sup> M) of Jaburetox-2Ec inhibit in a [K<sup>+</sup>]-dependent manner the serotonin-stimulated diuresis of Malpighian tubules isolated from *R. prolixus* which probably is the cause of the impaired water excretion observed in intact insects after receiving a canatoxin meal [7].

In the above cases, a majority of natural peptides contain disulphide bridges but active cysteine-free analogues can be produced [21] and it is easy to imagine that the rest of the Jaburetox toxin folds so as to reproduce the role of the bridges in stabilizing the  $\beta$ -hairpin motif in the free peptide. The absence of the N-terminal part of the Jaburetox sequence in bacterial ureases would compromise this



**Fig. 7 – The amphiphilic character of the  $\beta$ -hairpin motif in one of the top 10 *ab initio* models of Jaburetox-2Ec. Hydrophobic residues (yellow carbon) predominate on the left face while hydrophilic residues (white carbon) form the majority of the other face. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)**

stabilization and no such structure would exist excised from the whole molecule, in agreement with our previous observation that *B. pasteurii* urease is not lethal to *D. peruvianus* [14].

In the case of protegrins, a class of pore-forming antimicrobial peptides, the  $\beta$ -hairpin motif has a pronounced amphiphilic character [9]. *Ab initio* models of Jaburetox contain  $\beta$ -hairpins with similar characteristics (Fig. 7). In summary, while it was unrealistic to expect modeling alone to produce a definitive mode of action prediction, it was certainly capable of clearly ruling several out of consideration. As a working hypothesis the modeling suggests that a  $\beta$ -hairpin motif present in Jaburetox may be responsible for its insecticidal property through either ion channel inhibition or pore-forming activity.

## 5. Conclusions

In conclusion, in this paper we described the heterologous expression of a new insecticidal peptide, derived from an internal sequence of JBURE-II urease isoform. This result corroborates the hypothesis that plant ureases are protoxins, and can be related to plant arsenal of defenses against insects. The molecular modeling suggested activity based on

neurotoxicity or cell permeation. The insecticidal properties at low doses and the lack of acute toxicity to mammals emphasize the potential use of this protein in the control of insect pests.

### Acknowledgements

We are grateful to Maria Martha Guedes Chaves for preparation of Canatoxin and Jaburetox-2Ec. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Cooperação Acadêmica—Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Procad-CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-MCT).

### REFERENCES

- [1] Bontems F, Gilquin B, Roumestand C, Menez A, Toma F. Analysis of side-chain organization on a refined model of charybdotoxin: structural and functional implications. *Biochemistry* 1992;31:7756–64.
- [2] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [3] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005;3:238–50.
- [4] Carlini CR, Grossi-de-Sá MF. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 2002;40:1515–39.
- [5] Carlini CR, Guimarães JA. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concaivalin-A. *Toxicon* 1981;19:667–76.
- [6] Carlini CR, Ferreira-Da Silva CT, Gombarovits MEC. Peptídeo Entomotóxico da Canatoxina: Processo de Produção. Patent No. 0003334-0. Rio de Janeiro, Brazil: Instituto Nacional de Propriedade Industrial; 2000.
- [7] Carlini CR, Oliveira AE, Azambuja P, Xavier-Filho J, Wells MA. Biological effects of canatoxin in different insect models. Evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. *J Econ Entomol* 1997;90:340–8.
- [8] Carlini CR, Gomes CB, Guimarães JA. Central nervous effects of the convulsant-protein canatoxin. *Acta Pharmacol Toxicol* 1984;54:161–6.
- [9] Fahrner RL, Dieckmann T, Harwig SS, Lehrer RI, Eisenberg D, Feigon J. Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chem Biol* 1996;3:543–50.
- [10] Ferreira C, Capella AN, Sitnik R, Terra WR. Digestive enzymes in midgut cells, endo- and ectoperitrophic contents, and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Arch Insect Biochem Physiol* 1994;26:299–313.
- [11] Ferreira C, Capella AN, Sitnik R, Terra WR. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Comp Biochem Physiol* 1994;107A:631–41.
- [12] Ferreira-DaSilva CT, Gombarovits ME, Masuda H, Oliveira CM, Carlini CR. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch Insect Biochem Physiol* 2000;44(4):162–71.
- [13] Follmer C, Barcellos GB, Zingali RB, Machado OL, Alves EW, Barja-Fidalgo. et al. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem J* 2001;360:217–24.
- [14] Follmer C, Real-Guerra R, Wassermann GE, Oliveira-Severo D, Carlini CR. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur J Biochem* 2004;271:1357–63.
- [15] Follmer C, Wassermann GE, Carlini CR. Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Sci* 2004;167:241–6.
- [16] Garcia-Saez AJ, Coraiola M, Serra MD, Mingarro I, Muller P, Salgado J. Peptides corresponding to helices 5 and 6 of Bax can independently form large lipid pores. *FEBS J* 2006;273:971–81.
- [17] Gombarovits MC. Peptídeos Entomotóxicos gerados a partir da CNTX: obtenção, isolamento, propriedades biológicas e caracterização físico-química. M.Sc. Dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil; 1999.
- [18] Ha NC, Oh ST, Sung JY, Cha KA, Lee MH, Oh BH. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol* 2001;8:505–9.
- [19] Iacovache I, Paumard P, Scheib H, Lesieur C, Sakai N, Matile S, et al. A rivet model for channel formation by aerolysin-like pore-forming toxins. *EMBO J* 2006;25:457–66.
- [20] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [21] Lai JR, Huck BR, Weisblum B, Gellman SH. Design of non-cysteine-containing antimicrobial beta-hairpins: structure-activity relationship studies with linear protegrin-1 analogues. *Biochemistry* 2002;41:12835–42.
- [22] Leetachewa S, Katzenmeier G, Angsuthanasombat C. Novel preparation and characterization of the alpha4-loop-alpha5 membrane-perturbing peptide from the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba delta-endotoxin. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:270–7.
- [23] Menez A. Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? *Toxicon* 1998;36:1557–72.
- [24] Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 1995;59:451–80.
- [25] Mulinari F, Freitas-silva MA, Grossi-de-Sá MF, Moraes MG, Kurtenbach E, Carlini CR. Toxina Praguicida, Construção Gênica e Método de Controle de Pragas. Patent INPI-RS, No. 001120/RS; 2004.
- [26] Pires-Alves M, Grossi-de-Sá MF, Barcellos GBS, Carlini CR, Moraes MG. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. *Plant Cell Physiol* 2003;44(2):139–45.
- [27] Shortle D, Simons KT, Baker D. Clustering of low-energy conformations near the native structures of small proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;111:58–62.
- [28] Silva CP, Terra WR. Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect Biochem Mol Biol* 1994;24(5):493–505.
- [29] Simons KT, Kooperberg C, Huang E, Baker D. Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and Bayesian scoring functions. *J Mol Biol* 1997;268:209–25.
- [30] Simons KT, Ruczinski I, Kooperberg C, Fox BA, Bystroff C, Baker D. Improved recognition of native-like protein

- structures using a combination of sequence-dependent and sequence-independent features of proteins. *Proteins* 1999;34:82-95.
- [31] Stanisçuaski F, Ferreira-DaSilva CT, Mulinari F, Pires-Alves M, Carlini CR. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 2005;45:753-60.
- [32] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.
- [33] Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* 2001;81:1475-85.

**Enzyme and Microbial Technology 41 (2007) 821–827**

**Expression kinetics and plasmid stability of recombinant  
*E. coli* encoding urease-derived peptide with  
bioinsecticide activity**

**Geizecler Tomazetto<sup>a</sup>, Fernanda Mulinari<sup>a</sup>, Fernanda Stanisçuaski<sup>a</sup>, Beatriz  
Settembrini<sup>b</sup>, Célia Regina Carlini<sup>c</sup>, Marco Antônio Záchia Ayub<sup>d</sup>**

<sup>a</sup> Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>b</sup> Faculdade de Ciências Biomédicas, Universidad Austral, Pilar, Argentina

<sup>c</sup> Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, CP 15090, CEP 91570-901, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>d</sup> Instituto de Tecnologia de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## Resumo

A seqüência nucleotídica codificadora de um peptídeo inseticida derivado do cDNA de urease de *Canavalia ensiformis jbure-II* (AF 468788) foi clonada para expressão em sistema PET101/ *Escherichia coli*. O cultivo bacteriano em agitador usando lactose como indutor produziu 1,26 µg de peptídeo recombinante/mg de proteína, após 8h de crescimento. A estabilidade do plasmídeo e a expressão do peptídeo recombinante foram estudadas em biorreator. A expressão do peptídeo recombinante é altamente afetada pelo pH da cultura, com um decréscimo de mais de 50% quando a acidificação foi livremente permitida. Da mesma forma, a produção do peptídeo e a estabilidade do plasmídeo mostraram-se afetadas pela aeração e agitação, ambos decrescendo para altos valores de razões de transferência de massa de oxigênio. Apesar destas dificuldades, em culturas produzidas em biorreatores com controle de pH, baixas taxas de transferência de massa de oxigênio e utilizando lactose como indutor, fomos capazes de obter uma produção total de peptídeo de 7,14 µg/mg de proteína, o que representa aproximadamente 2% da proteína celular total. O peptídeo purificado foi utilizado em bioensaios em insetos modelo. O peptídeo administrado a ninfas de *Dysdercus peruvianus* produziu 100% de mortalidade após 11 dias, iniciando as mortes após uma fase lag de 3-4 dias, confirmando que o peptídeo produzido em biorreator mantém sua atividade biológica.



## Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity

Geizecler Tomazetto<sup>a</sup>, Fernanda Mulinari<sup>a</sup>, Fernanda Stanisçuaski<sup>a</sup>, Beatriz Settembrini<sup>b</sup>,  
Célia Regina Carlini<sup>c</sup>, Marco Antônio Záchia Ayub<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Cellular & Molecular Biology Post-Graduation Program, Center of Biotechnology, IB, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, Pilar, Argentina

<sup>c</sup> Department of Biophysics, IB, Federal University of Rio Grande do Sul State, Av. Bento Gonçalves, 9500,  
P.O. Box 15090, ZC 91570-901 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul State, Av. Bento Gonçalves,  
9500, P.O. Box 15090, ZC 91570-901 Porto Alegre, RS, Brazil

Received 27 March 2007; received in revised form 5 July 2007; accepted 6 July 2007

### Abstract

The nucleotide sequence encoding for an insecticidal peptide derived from the *Canavalia ensiformis* urease gene *jbureII* (AF 468788), was cloned and expressed in the pET101/*Escherichia coli* expression system. Bacterial cultivation in shaker with lactose as inducer produced 1.26 µg of recombinant peptide/mg protein, after 8 h of growth. The plasmid stability and the expression of the recombinant peptide were studied in bioreactor. Expression of the recombinant peptide was strongly affected by pH of cultures, with a decrease of more than 50% when acidification was freely allowed. Likewise, peptide production and plasmid stability were shown to be affected by aeration and agitation speed, both decreasing for higher values of oxygen mass transfer rates. Despite these difficulties, in bioreactor cultures carried out with controlled pH, low oxygen mass transfer rates and using lactose as inducer, we were able to achieve a total peptide production of 7.14 µg/mg protein, which represents approximately 2% of total cell protein. Bioassays were carried out using the purified peptide on insect models. The peptide fed to *Dysdercus peruvianus* nymphs produced 100% mortality after 11 days, deaths starting with a lag phase of 3–4 days, confirming that the bioreactor-produced peptide retained its biological activity.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Plasmid stability; Recombinant *E. coli*; Bioreactor cultivation; Canatoxin; Bioinsecticide

### 1. Introduction

Canatoxin, a variant form of urease isolated from *Canavalia ensiformis* (Leguminosacea) seeds [1], was the first plant urease for which we have demonstrated insecticidal properties [2,3]. This toxicity is caused by an internal peptide (~10 kDa) released from ureases by proteolytic hydrolysis by insect cathepsin-like digestive enzymes [4], which was further confirmed in bioassays on *Dysdercus peruvianus*, a pest of cotton cultures [5]. The use of this recombinant peptide as bioinsecticide has emerged as an attractive biotechnological tool for the application in the control of insect pests of several crop cultures [6].

*Escherichia coli* is one of the most frequently used host system for recombinant protein production, mainly because it is such a well-characterized system [7]. Despite the extensive knowledge on the genetics and molecular biology of *E. coli*, there is always an uncertainty on whether a recombinant protein will accumulate in this bacterium [8]. Expression is a product of genetics of the host microorganism and process engineering, both being essential parts in the development of a successful bioprocess [9]. As very often observed, high yields of recombinant proteins generally impose metabolic burdens to cells, negatively impacting plasmid stability during cultivation, with significant losses in productivity [10,11].

The *lac*, *tac* and *trc* promoters, which are induced by isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG), are frequently used in basic molecular biology research. However, due to its toxicity, IPTG should be considered unsuitable for the production of therapeutic proteins for human uses, besides being expensive, which

\* Corresponding author. Tel.: +55 51 33086685; fax: +55 51 33087048.  
E-mail address: [mazayub@ufrgs.br](mailto:mazayub@ufrgs.br) (M.A.Z. Ayub).

is a serious drawback for the large-scale production of recombinant protein. As an alternative, lactose could be employed as a much cheaper and safer inducer, and can be metabolized as carbon and energy source by many bacteria [12].

In this work, we studied the production of an insecticidal peptide, encoded by a truncated cDNA derived from the *jbureII* gene (AF 468788) coding for an isoform of *C. ensiformis* urease characterized in previous studies [13,14], and the stability of pET101-based plasmids expressing this gene in the commercial *E. coli* BL 21 system. Despite the plasmid instability, we were able to produce the recombinant peptide in a bioreactor culture, under controlled conditions regarding oxygen mass transfer rates, pH control and the use of lactose as inducer, instead of IPTG. The purified peptide was bioassayed to investigate its bioinsecticide activity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strain and plasmid

The construction of the expression system in *E. coli* BL 21 (DE) is described elsewhere [13]. Briefly, this strain was transformed with plasmid pET101, which was constructed by inserting a nucleotide sequence of 270 bp derived from the *jbureII* gene (AF 468788) encoding the entomotoxic peptide Jaburetox-2Ec (81 aminoacids starting from G169) cloned in frame to V-5 epitope and a poly-histidine tag, resulting in a 270 bp insert. Expression of this sequence was under the control of the T7 promoter.

### 2.2. Cultivation experiments in shaker

Shake flask experiments with BL 21 pET101/Jaburetox-2Ec were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks filled with 50 mL Luria Bertini (LB) medium supplemented with 150 µg/mL ampicillin, incubated at 37 °C, 100 rpm. Cultures were inoculated with 0.5% (v/v) of an overnight preculture grown to 0.7 OD<sub>600</sub>. Two concentrations of lactose were tested for induction: 10 and 20 g/L. Samples were taken at 1 h interval time after lactose induction and were analyzed for the production of recombinant peptide.

### 2.3. Bioreactor experiments

Pre-inoculae were prepared as follows. One hundred-millilitre Erlenmeyers containing 25 mL LB supplemented with 150 µg/mL ampicillin were inoculated from a single colony and incubated at 37 °C, 100 rpm for 18 h. These cultures were transferred to 500 mL flasks containing 150 mL LB (150 µg/mL ampicillin) and incubated under the same conditions as above. These cultures were grown to OD<sub>600</sub> of 1.0 and the whole volume (150 mL) was used to inoculate the bioreactors. Batch cultivations were performed using 2-L Braun bioreactors (B. Braun, Germany), fully equipped for temperature, aeration and pH control, with an initial medium volume of 1350 mL LB with 150 µg/mL ampicillin, and temperature was kept constant at 37 °C. The pH was controlled at 7.0 by phosphoric acid (5%, v/v) and sodium hydroxide (10%, v/v). In all batches, when the concentration of exponentially growing cells reached OD<sub>600</sub> 0.7, protein was induced by the addition of 45 g of lactose dissolved in 500 mL LB (150 µg/mL ampicillin). Batch experiments using mineral medium (MM) were carried out in the 2-L bioreactors with an initial working volume of 1350 mL medium, containing (in g/L): glucose, 10; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3; NaCl, 0.5; NH<sub>4</sub>Cl, 1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 12.8; bacto-peptone, 10; 150 µg/mL ampicillin; 1 mL/L of filtered sterilized trace metal solution (of 1 M solutions): FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.8; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 2; CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.8; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.5; CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.2; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.3. Glucose was sterilized separately. The culture temperature was kept constant at 37 °C and pH was controlled at 7.0 as described above. Aeration (L air/L medium/min, expressed as vvm) and agitation speed (rpm) were controlled either at 4 vvm and 400 rpm or 5 vvm and 500 rpm in order to produce different oxygen mass transfer rates (k<sub>1a</sub>), which was measured by the dynamic

gassing out method described by Doran [15]. Dissolved oxygen level in the broth was measured using a polarographic electrode and was expressed as percentage of O<sub>2</sub> saturation. The culture entering stationary phase was induced with lactose dissolved in the same medium (500 mL, supplemented with 150 µg/mL ampicillin). The pre-inoculae and inoculae were prepared with the same medium.

Samples of 10 mL were taken at frequent intervals in order to measure cell density, total reducing sugars, plasmid stability, total soluble protein and recombinant peptide.

### 2.4. Purification of the recombinant peptide

The cells were harvested by centrifugation and the pellet was suspended in 10 ml of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% (v/v) glycerol, 0.5% (v/v) Triton X-100, 10 mM imidazole, sonicated and centrifuged (14,000 × g, 20 min). The supernatant was loaded onto a 2 mL Ni affinity column (Ni-NTA-QIAGEN), equilibrated in 50 mM sodium phosphate buffer pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole. After 30 min, the column was washed with 20 mL of the same buffer, containing 20 mM imidazole. The protein was eluted with 200 mM imidazole and quantified by the Bradford method.

#### 2.4.1. Analytical procedures

Biomass concentration was determined as optical density (OD) at 600 nm and converted to dry cell weight using a standard curve calibration. The total cell lysates were analyzed by SDS-PAGE on 12.5% (w/v) polyacrylamide gels stained with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250. Total soluble protein was analyzed by the Bradford method and the amount of recombinant peptide was analyzed by ELISA assay, calibrated in 0.2–10 µg/mL concentration range of the recombinant peptide purified on Ni-NTA agarose [12]. Plasmid stability of cultures was determined by statistical colony counting on agar LB plates with and without ampicillin. After incubation at 37 °C for 24 h, plasmid stability was determined by calculating the percentage of colonies resistant to ampicillin. Reducing sugars were determined by the DNSA method [6].

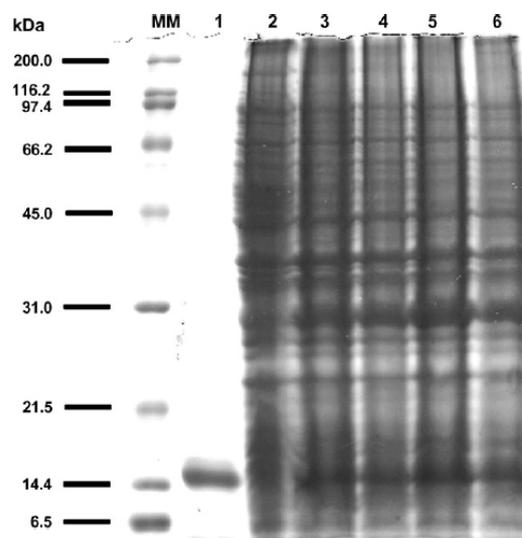


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of recombinant peptide Jaburetox-2Ec induction in *E. coli* BL 21 with the addition of 10 g/L of lactose. Lane 1: purified recombinant peptide; Lane 2: total cell extract without induction; Lanes 3–6: cell extracts after 2, 4, 6 and 8 h of induction, respectively. M, molecular weight mass standard. Arrows indicate the recombinant peptide.

### 2.5. Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec

For the bioassays the purified Jaburetox-2Ec was exhaustively dialyzed against 5 mM sodium phosphate pH 7.5 buffer and the last change of dialysis buffer was used as control. Bioassays were carried out using as insect models the cotton stainer bug *D. peruvianus* [5] and the kissing bugs *Rhodnius prolixus* [4] and *Triatoma infestans*. Third instars *D. peruvianus* were fed on artificial cotton seeds, consisting of gelatin capsules filled with cotton seed flour and 0.01% (w/w) freeze-dried recombinant peptide. Groups of 30 insects were tested and monitored for survival during 15 days. Alternatively, *R. prolixus* (4th instars) and *T. infestans* (5th instars and adults) received 0.02–0.1  $\mu\text{g}$  recombinant peptide/g body weight by intrathoracic injection with a Hamilton syringe. Control insects were injected an equivalent volume of buffer. Survival was followed up for 2 days.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Peptide induction with lactose

The *pet* vectors family is designed to be used with IPTG as inducers. In a previous study [13], the peptide was induced with IPTG, with a final yield of purified Jaburetox-2Ec estimated as 0.6  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein. We also observed that the time course

of Jaburetox-2Ec expression did not change after 1, 2, 3 and 6 h after IPTG-induction [13]. In order to investigate whether lactose could substitute IPTG for induction, several different experiments in shaker were run. Fig. 1 shows the SDS-PAGE pattern of cell protein after different regimes of induction. Results demonstrated that the production of recombinant peptide in presence of 10 g/L of lactose reached 1.26  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein, while using a concentration of 20 g/L of lactose the accumulation of peptide was much lower (0.76  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein, gel not shown) showing that 10 g/L was not only sufficient for expression, but also avoided substrate-induced protein repression, somehow contrasting with results from a previous work, when Gombert and Kilikian [12] suggested a concentration of 20–55 g/L lactose for the induction of the troponin C in *E. coli* BL 21. These discrepancies of data suggest that ideal lactose concentrations for the induction of different proteins will vary under specific culture conditions.

### 3.2. Influence of pH on induction and plasmid stability

The influence of pH on plasmid stability and peptide expression was studied in batch bioreactor cultures (agitation speed and

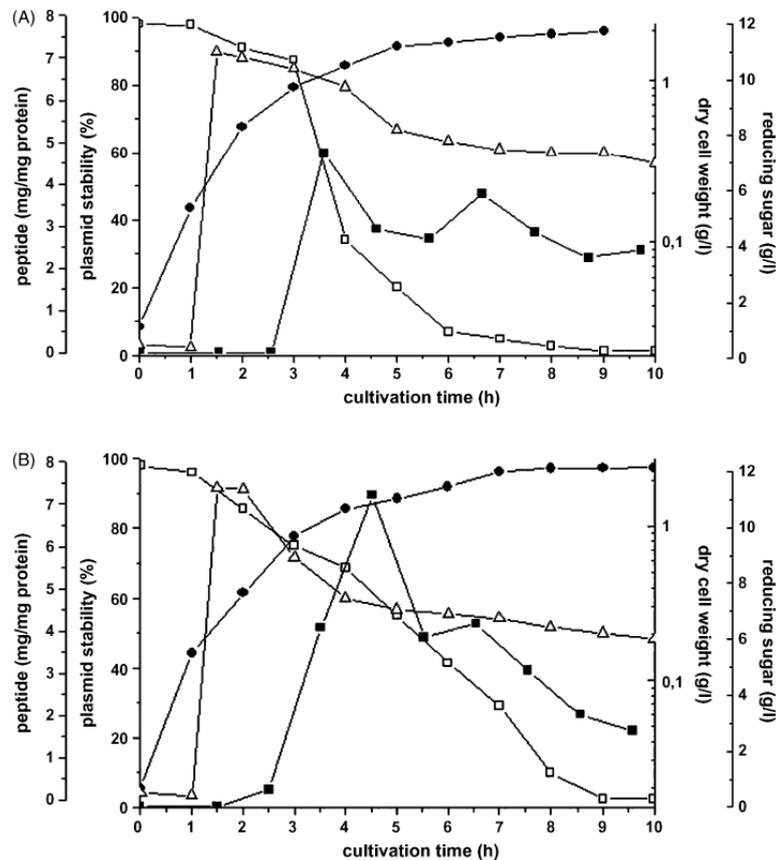


Fig. 2. Effect of pH on recombinant *E. coli* BL 21 pET101/Jaburetox-2Ec in batch cultures. (A) Uncontrolled pH; (B) pH controlled at 7. Dry cell weight (●), plasmid stability (□), recombinant peptide (■) and reducing sugar (△). Results are presented as the mean of two experiments.

air flow rate set at 400 rpm and 2 vvm) and results are shown in Fig. 2(A and B). It can be observed that in the free varying pH batch, pH dropped from 7 to 5 and this variation was followed by decreased plasmid stability and decreased protein expression ( $4.74 \mu\text{g}/\text{mg}$  protein), while in the controlled pH experiments, an increase of 50% of expression was achieved ( $7.15 \mu\text{g}/\text{mg}$  protein, Fig. 2B). Gupta et al. [16] reported that a variation of pH in the range of 5–8 had no significant effect on stability of the recombinant plasmid, pCPPS-31, in *E. coli* DH5 $\alpha$ , contrasting with our results. A pH variation could account for some loss of protein activity. However, in a previous work [4], we showed that the peptide is stable for pH in the range of 4.0–7.0.

### 3.3. Influence of aeration on induction and plasmid stability

In this series of batch experiments, with the purpose of establishing the influence of oxygen over plasmid stability and peptide expression, two sets of agitation speed and air flow rates were tested: 400 rpm, 2 vvm (Fig. 3(A)) and 500 rpm, 5 vvm

(Fig. 3(B)). The volumetric mass transfer rates for oxygen ( $k_{\text{La}}$ ) for these two conditions were  $17.2$  and  $41.3 \text{ h}^{-1}$ , respectively. The pH was controlled and kept constant at 7. Under the higher oxygenation condition (500 rpm, 5 vvm), the expression of the recombinant peptide reached values  $1 \mu\text{g}/\text{mg}$  of total protein, representing a seven-fold decrease when compared with batch under 400 rpm and 2 vvm ( $5.9 \mu\text{g}/\text{mg}$  of total protein). De León et al. [17] reported similar results for recombinant penicillin acylase activity in *E. coli*. In their work, decreased dissolved oxygen tension had a positive effect on protein production.

### 3.4. Degradation of the peptide

Despite the fact that *E. coli* BL 21 has been reported to be protease-deficient (Novagen), in all batches shown in Figs. 2 and 3, after maximum expression of the recombinant peptide, there were always a decrease on its concentration, probably due to protein degradation. It might be possible that the rapid and massive expression of the recombinant protein imposed a

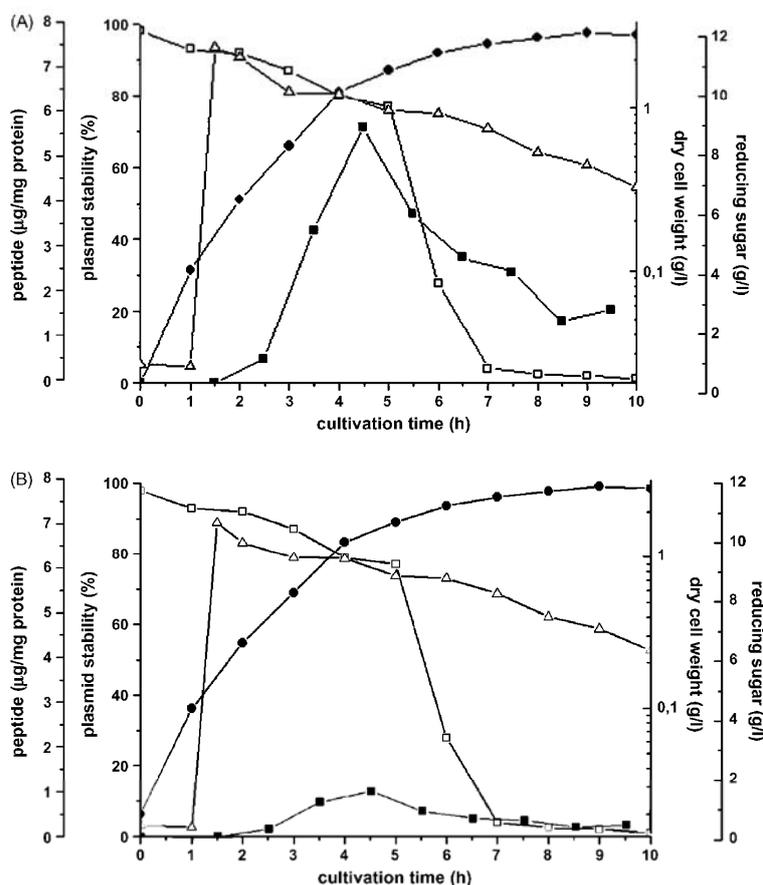


Fig. 3. Effect of aeration on recombinant *E. coli* BL 21 pET101/Jaburetox-2Ee in batch cultures: (A) pH controlled at 7, agitation speed of 400 rpm and aeration of 2 vvm ( $k_{\text{La}} = 17.2 \text{ h}^{-1}$ ); (B) pH controlled at 7, agitation speed of 500 rpm and aeration of 5 vvm ( $k_{\text{La}} = 41.3 \text{ h}^{-1}$ ). Dry cell weight (●), plasmid stability (□), recombinant peptide (■) and reducing sugar (Δ). Results are presented as the mean of two experiments.

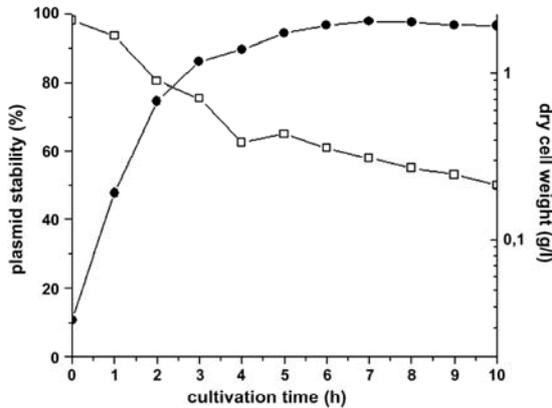


Fig. 4. Behavior of recombinant *E. coli* BL 21 pET101/Jaburetox-2Ec in batch cultures without the addition of lactose as inducer. Dry cell weight (●) and plasmid stability (□). Results are presented as the mean of two experiments.

metabolic burden to the host cells, and increased the synthesis of the proteases in order to release amino acids from existing protein for incorporation into essential proteins [18].

### 3.5. Influence of peptide expression on plasmid stability

In order to further investigate the influence of expression over plasmid stability, a batch run without induction under the best condition for expression (controlled pH, 400 rpm, 2 vvm), was performed with results shown in Fig. 4. After 10 h of cultivation, there are still close to 50% of plasmid-harboring cells, compared to almost 0% in the previous batches with induction, further demonstrating that expression of the recombinant peptide imposed metabolic burden on the host cells, and can be one of the causes of plasmid instability. Sunitha et al. [19] described similar results, arguing that plasmid stability decreased with

increased phytase activity after induction, and concluded that a shorter expression time for higher protein productivity is necessary due to the instability of the plasmid upon longer cultivation times.

### 3.6. Influence of medium composition on induction and plasmid stability

According to Shiloach and Fass [20], growth of *E. coli* in Luria Bertani (LB) medium under controlled temperature, pH and oxygen can produce up to 1 g/L cell density. In this work, with different batch conditions, the cell density in LB medium reached in between 2 and 3 g/L, which represents a reasonable improvement of the process. However, in an attempt to increase both biomass and the expression of the recombinant peptide, we run an experiment where LB was replaced by defined mineral medium (MM) containing 10 g/L of glucose as carbon source. In these experiments, we followed the strategy of Ou et al. [21], who reported the induction with lactose after stationary phase was reached, which proved to be a better strategy for production of recombinant protein. In the results shown in Fig. 5, the cell density reaches 5.2 g/L, twice as much as obtained before, with 50% glucose conversion into biomass. Although lactose was able to induce the recombinant protein, the increased biomass formation did not represent any improvement in the specific amount of the recombinant peptide, which peaked around 1.4 μg/mg protein at the end of the run, approximately four times lower than obtained for the cells growing in LB (Figs. 2 and 3). Plasmid stability observed after 14 h of cultivation was higher than 60% of plasmid-harboring cells. This higher stability observed in the minimal medium is probably due to lowest growth rate of cells ( $\mu = 0.22 \text{ h}^{-1}$ ) when compared to their growth rate in LB broth ( $\mu = 0.67\text{--}0.84 \text{ h}^{-1}$ ), with at least two mechanisms possibly involved: first, the lack of growth rate advantage for the plasmid-free cells over the plasmid-harboring cells and second, synchronized cell division and plasmid segregation [16].

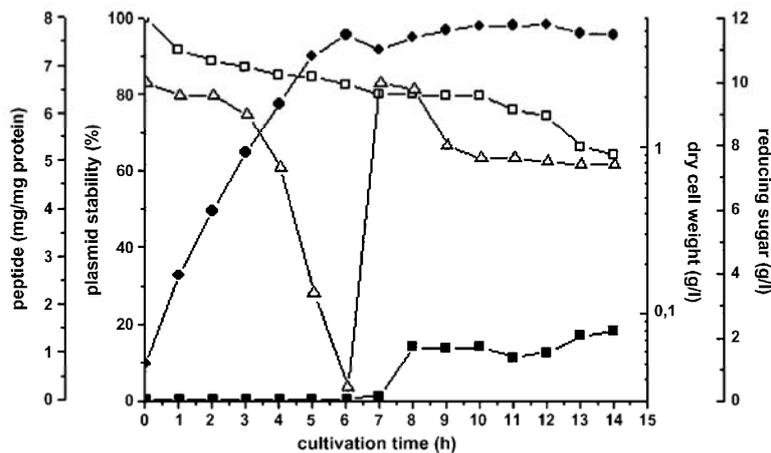


Fig. 5. Kinetics of batch cultures of recombinant *E. coli* BL 21 pET101/Jaburetox-2Ec growing in MM and glucose as carbon source. Conditions: pH controlled at 7; agitation speed 400 rpm; aeration 2 vvm. Lactose (10 g/L) was added as inducer at 6 h. Dry cell weight (●), plasmid stability (□), recombinant peptide (■) and reducing sugar (△). Results are presented as the mean of two experiments.

Table 1  
Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec

Insect model (N)	Route–dose of purified peptide	Time for 100% lethality <sup>a</sup>
<i>D. peruvianus</i> 3rd instars (N = 30)	Oral–peptide added to diet at 0.01% (w/w)	11 days
<i>R. prolixus</i> 4th instars (N = 5)	Injection–0.026 mg/g	2 days
<i>T. infestans</i> 5th instars (N = 5)	Injection–0.1 mg/g	15 h
<i>T. infestans</i> adult (N = 5)	Injection–0.1 mg/g	20 h

<sup>a</sup> There was no significant lethality of control insects within the same period of time. The experiments were repeated at least three times with similar results.

### 3.7. Residual lactose concentration

Our results showed that there was always a residual concentration of lactose, which was not metabolized by cells. According to Gombert and Kilikian [12], lactose residue has an important role in the induction process of the expression of troponin C. Menzella et al. [22] have introduced two genetic modifications into *E. coli* BL 21, to allow this new strain an efficient use of lactose as inducer and carbon source. In their work, they showed that the complete metabolization of lactose had a clear positive effect on the final synthesis rate and concentration of recombinant protein.

### 3.8. Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec

Table 1 shows the lethal effect of the purified peptide Jaburetox-2Ec produced in the bioreactor in three different insects. As already described [5], the peptide fed to *D. peruvianus* nymphs produced 100% mortality after 11 days, deaths starting with a lag phase of 3–4 days. We previously reported the lack of effect of the intact urease/canatoxin from which the peptide is derived when fed to adult bugs [4,5] or when injected into the insect [23]. In contrast, the recombinant peptide killed either *R. prolixus* nymphs or nymphs and adults of *T. infestans* upon injection of 0.1 µg/g of insect body weight.

## 4. Conclusions

In this work, we were able to show that IPTG can be satisfactorily substituted by lactose for the induction and production of encoding canatoxin-derived peptide by recombinant *E. coli* BL 21 strain. Controlled bioreactor conditions were successful for increasing protein expression in shaker from 1.26 to 7.15 µg/mg total protein, representing an increase of six times in production. This is an important result, considering that most of the research on gene expression described in the literature is done by growing cells under uncontrolled shaker conditions. The insecticidal activity of Jaburetox-2Ec purified peptide occurs at very low doses, as compared to other plant-derived entomotoxic proteins, being the peptide active either given orally or by injection to the insects. Despite of excellent optimization of production of the peptide, plasmid instability remains a major setback for further studies aiming to scale up protein production. Moreover, the

concentration of the peptide did not remain constant throughout batch runs, probably due to cell protease activities causing degradation of the recombinant peptide. All these observations strongly suggest that the *E. coli* BL 21/pET101-based system expression is not suitable for commercial applications granting further studies aiming the biotechnological production of this newly identified bioinsecticide.

## Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq, CAPES and FAPERGS for their financial support of this research.

## References

- [1] Follmer C, Barcellos GBS, Zingali RB, Machado OLT, Alves EW, Barja-Fidalgo C, et al. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem J* 2001;360: 217–24.
- [2] Carlini CR, Grossi-de-Sá MF. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 2002;40:1515–39.
- [3] Follmer C, Real-Guerra R, Wassermann GE, Olivera-Severo D, Carlini CR. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur J Biochem* 2004;271:1357–63.
- [4] Ferreira-DaSilva CT, Gombarovits ME, Masuda H, Oliveira CM, Carlini CR. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch Insect Biochem Physiol* 2000;44:162–71.
- [5] Stanisquaski F, Ferreira-DASilva CT, Mulinari F, Pires-Alves M, Carlini CR. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 2005;45:753–60.
- [6] Chaplin MF, Kennedy JF. Carbohydrate analysis: a practical approach. 2nd ed. Oxford: IRL Press; 1994.
- [7] Lee SY. High cell-density cultures of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 1996;14:98–105.
- [8] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:411–21.
- [9] Andersson L, Yang S, Nuebauer P, Enfors SO. Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 1996;46:255–63.
- [10] Nayak DP, Vyas V. Improved stability and expression of recombinant shuttle plasmid in *Escherichia coli* during fedbatch cultivation. *World J Microbiol Biotechnol* 1999;15:65–71.
- [11] Khalilzadeh R, Shojasadatí SA, Bahrami A, Maghsoudi N. Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 2003;25:1989–92.
- [12] Gombert AK, Kilikian BV. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. *J Biotechnol* 1998;60:47–54.
- [13] Mulinari F, Freitas-Silva MA, Grossi-De-Sá MF, Moraes MG, Kurtenbach E, Carlini CR. Toxina Praguicida, Construção Gênica e Método de Controle de Pragas. Patent registered at National Institute for Intellectual Property (INPI). Brazil; 08/04/2004 [protocol 001120/RS].
- [14] Pires-Alves M, Grossi-de-Sá M, Barcellos GBS, Carlini CR, Moraes MG. Characterization and expression of a novel member (JBURE II) of the urease gene family from jackbean (*Canavalia ensiformis* DC). *Plant Cell Physiol* 2003;44:139–45.
- [15] Doran PM. Mass transfer. In: Doran PM, editor. *Bioprocess engineering principles*. London: Academic Press Limited; 2000. p. 190–217.
- [16] Gupta R, Sharma P, Vyas VV. Effect of growth environment on the stability of a recombinant shuttle plasmid, pCPPS-31, in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 1995;41:29–37.
- [17] De León A, Hernández V, Galindo E, Ramirez OT. Effects of dissolved oxygen tension on the production of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 2003;33:689–97.

- [18] Ramchuran SO, Karlsson EN, Velut S, de Maré L, Hagander P, Holst O. Production of heterologous thermostable glycoside hydrolases and the presence of host-cell proteases in substrate limited fed-batch cultures of *Escherichia coli* BL 21 (DE3). *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;60:408–16.
- [19] Sunitha K, Kim YO, Lee JK, Oh TK. Statistical optimization of seed and induction conditions to enhance phytase production by recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Eng J* 2000;5:51–6.
- [20] Shliaoach J, Fass R. Growing *E. coli* to high cell density—a historical perspective on method development. *Biotechnol Adv* 2005;23:345–57.
- [21] Ou J, Wang L, Ding X, Du J, Zhang Y, Chen H, et al. Stationary phase protein overproduction is a fundamental capability of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:174–80.
- [22] Menzella HG, Cecarelli EA, Gramajo HC. Novel *Escherichia coli* strain allows efficient recombinant protein production using lactose as inducer. *Biotechnol Bioeng* 2003;82:809–17.
- [23] Carlini CR, Oliveira AE, Azambuja P, Xavier-Filho J, Wells MA. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. *J Econ Entomol* 1997;90:340–8.

Toxicon 45 (2005) 753–760

**Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug  
*Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae)**

**Stanisçuaski F.<sup>a</sup>, Ferreira-DaSilva C.T.<sup>a</sup>, Mulinari F.<sup>a</sup>, Pires-Alves M.<sup>a</sup> & Carlini C.R.<sup>b\*</sup>**

<sup>a</sup> Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, CP 15090, CEP 91570-901, Porto Alegre, RS, Brasil

## Resumo

Canatoxina (CNTX) é uma forma variante de urease isolada de sementes de *Canavalia ensiformis* (Leguminosaea). Um possível papel na defesa da planta foi proposto para CNTX, devido a sua toxicidade sobre o besouro *Callosobruchus maculatus* alimentado com a proteína e o inseto hematófago *Rhodnius prolixus*. O efeito tóxico é causado por um peptídeo derivado da CNTX (10 kDa), formado pelas enzimas digestivas do tipo catepsinas dos insetos. Visando investigar seu potencial como bioinseticida, os efeitos de CNTX e seu peptídeo foram avaliados contra o inseto hemíptero *Dysdercus peruvianus*, uma praga da cultura do algodoeiro. Nos bioensaios, os insetos foram alimentados em cápsulas de gelatina contendo pó de sementes de algodão, misturado com a proteína congelada ou outros materiais-testes e foi observada a taxa de sobrevivência, ganho de peso e muda. A ingestão da CNTX ou do peptídeo recombinante derivado desta afetou severamente as formas jovens dos insetos, retardando seu desenvolvimento ou ocasionando a sua morte. Em contraste, os adultos foram insensíveis a dietas contendo altas doses de canatoxina. Proteinases do tipo catepsinas predominam nos homogenatos de intestino dos insetos, que apresentam um padrão distinto de atividade enzimática, de acordo com o seu estágio de desenvolvimento, um fato que pode explicar a diferença na suscetibilidade das ninfas comparadas aos adultos de *D. peruvianus*. Os dados apresentados confirmam o potencial uso de proteínas tipo-canatoxina e seus peptídeos derivados como bioinseticidas.

## Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae)

F. Stanisçuaski<sup>a</sup>, C.T. Ferreira-DaSilva<sup>a</sup>, F. Mulinari<sup>a</sup>, M. Pires-Alves<sup>a</sup>, C.R. Carlini<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, IB, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Department of Biophysics, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, CEP 91.501-970, Brazil

Received 23 June 2004; revised 21 January 2005; accepted 25 January 2005

### Abstract

Canatoxin (CNTX) is a variant form of urease isolated from *Canavalia ensiformis* (Leguminosae) seeds. A possible role in the plant defense was proposed for CNTX, due to its toxicity upon feeding to the beetle *Callosobruchus maculatus*, and the hematophagous bug, *Rhodnius prolixus*. The toxic effect is caused by a canatoxin-derived peptide (~10 kDa) formed by insect cathepsin-like digestive enzymes. In order to evaluate their potential as bioinsecticides, the effects of CNTX and its peptide were evaluated on a phytophagous hemipteran insect *Dysdercus peruvianus*, a pest of cotton culture. For the bioassays, the insects fed on gelatin capsules containing powdered cotton seeds, mixed with the freeze-dried protein and other test materials and were observed for survival rate, weight gain and molting. Ingestion of canatoxin, or a recombinant 10 kDa peptide derived from it, severely affected young forms of the insects, delaying their development or leading to their death. In contrast, adults were insensitive to diets containing higher concentrations of canatoxin. Cathepsin-like proteinases predominated and showed distinct pattern of enzymatic activities in midguts homogenates according to the developmental stage of the insect, a fact which may explain the different susceptibility of nymphs as compared to adult *D. peruvianus*. The data presented confirm the potential use of canatoxin-like proteins and derived peptides as bioinsecticides.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Canavalia ensiformis*; Canatoxin; *Dysdercus peruvianus*; Insecticide; Proteolytic enzymes

### 1. Introduction

Canatoxin (CNTX) is a toxic protein accounting for 0.5% dry weight of the jackbean *Canavalia ensiformis* (L.) DC seed. When injected intraperitoneally, the toxin induces convulsions and death (LD<sub>50</sub> 1–2 µg/g) in mice and rats; however, it is inactive if given orally to these animals (Carlini and Guimarães, 1981, 1991). Recently, CNTX was characterized as a variant form of jackbean urease

(EC 3.5.1.5), consisting of a noncovalently linked dimer of a 95,000 acidic polypeptide chain (Follmer et al., 2001).

The widespread presence of canatoxin-like proteins in leguminous seeds and their accumulation pattern during seed maturation have suggested a protective role in the plant (Carlini et al., 1988; Barcellos et al., 1993). In previous works it was found that CNTX displays fungicidal (Oliveira et al., 1999) and insecticidal properties (Carlini et al., 1997, Carlini and Grossi-de-Sá, 2002). We have shown that CNTX is lethal when fed to insects relying on cathepsins as their main digestive enzymes such as the hematophagous kissing bug, *Rhodnius prolixus* (Stål) (Hemiptera: Reduviidae), and the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.)

\* Corresponding author. Tel.: +55 51 3316 7606; fax: +55 51 3316 7003.

E-mail address: ccarlini@ufrgs.br (C.R. Carlini).

(Coleoptera:Bruchidae). In contrast, insects with trypsin-based digestion were not affected by ingestion of canatoxin. Subsequently, the proteolytic 'activation' of CNTX by insect cathepsins was demonstrated by interfering in the toxin's effect with the enzyme inhibitors, E-64 and/or pepstatin A and by the in vitro formation of entomotoxic peptides (Ferreira-DaSilva et al., 2000). Jackbean urease also displays insecticidal activity although it is less potent than CNTX (Follmer et al., 2004).

Considering the potential use of CNTX or its peptide as an insecticide, it became important to investigate its effects in other insects economically important as crop pests. The cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Ménéville) (Hemiptera: Pyrrhocoridae) feeds on the cotton seeds, resulting in damage to the seed and stains on the cotton fibers, besides being a vector for phytopathogenic bacteria and fungi, and may cause heavy losses in cotton plantations (Gallo, 1988). Previous studies by Silva and Terra (1994) have shown the presence of a major E-64 inhibitable cysteine proteinase in midgut homogenates of *D. peruvianus*, prompting us to test the effects of canatoxin on this model of a phytophagous hemipteran insect. Our results demonstrated the potent insecticidal effect of CNTX and of a peptide derived from it, for the cotton culture pest *D. peruvianus*, confirming the potential use of these compounds as bioinsecticides.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Dextran Blue (Amersham, Pharmacia Lot 0168), sodium azide (Merck, Lot 108). From Sigma Chem. Co: casein, bovine hemoglobin, dithiothreitol, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pepstatin A, E-64 [*L-trans*-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino)-butane], PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride).

### 2.2. Canatoxin

CNTX was prepared as described by Carlini and Guimarães (1981), with the modifications introduced by Follmer et al. (2001). Briefly, a 10% wt:vol crude extract of *C. ensiformis* seeds prepared in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 was combined with ice-cold ethanol (30% vol:vol) to form a precipitate, and the supernatant was subsequently fractionated with ammonium sulfate at 0.35–0.55 saturation. The toxic material thus obtained was submitted to an ion exchange chromatography in DEAE-cellulose, equilibrated in 25 mM Tris-HCl–100 mM NaCl, pH 7.5. The toxin adsorbed to the resin was eluted with Tris buffer containing 200 mM NaCl and then gel-filtered in a Sephacryl S-300 column. The last purification step consisted of an immobilized metal affinity chromatography in a Zn<sup>2+</sup>-chelate resin, being the highly purified canatoxin eluted with Tris buffer

containing 10 mM EDTA. For the tests with insects, canatoxin's solutions were previously dialyzed against 25 mM Tris-HCl to remove EDTA.

### 2.3. *Dysdercus peruvianus*

A colony of *D. peruvianus* was established from individuals kindly supplied by Dr Carlos Peres Silva, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil. *D. peruvianus* were reared at a medium temperature of 23 °C (Milano et al., 1999), 75% relative humidity, with a 16 h light–8 h dark cycle. *D. peruvianus* life cycle is about 30–35 days from eggs to adult insects. Each female lays up to 100–200 eggs over the seeds. The eggs hatch after 6–9 days and the insects develop through five nymphal stages in about 20–25 days.

The insects were kept in transparent plastic pots, covered with screen tissue, with a layer (2 cm) of autoclaved sand in the bottom. The insects were fed with cotton seeds (*Gossypium hirsutum*) and had free access to water, stored in plastic flasks, located inside the pots. The seeds were put inside the pots during the mating and posture period, up to first instar. From the second instar on, the insects were transferred to a clean pot once a week and the seeds were kept over the tissue that closes the pots. This procedure avoids the contact of the seeds with insect feces and facilitates cleaning the pots.

### 2.4. Cotton seeds (*Gossypium hirsutum*)

Cotton seeds harvested from agrototoxic-free plantations were obtained from Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária—Algodão (IAC—Instituto Agronômico de Campinas). To make cotton seed flour, after opening the seed's shells, the cotyledons were removed and lyophilized for 5 h to decrease the water content. The cotyledons were then processed in an analytical mill, the flour obtained was sifted and stored at –20 °C.

### 2.5. Artificial seeds

Gelatin Capsules (size 2 or 3, Eli Lilly Co.) were manually filled with cotton seed flour, containing or not added substances, to make artificial seeds. When testing a substance, solutions of this compound were rapidly mixed the cotton flour, the mixture was then frozen and freeze-dried, being the resulting powder used to make the artificial seeds. Concentrations of the tested substances were expressed as percentage of mass of the cotton flour. Control artificial seeds were prepared in the same way, with the equivalent volume of diluents used for the tested substances.

### 2.6. Insect bioassay

For the tests, groups of 20 insects in triplicates were used for each experimental condition. Control insects fed on cotton

seeds or artificial seeds containing cotton meal alone or the diluents of the tested compounds. The mean weight of insect groups was recorded before the experiments. The insects were observed daily for survival and molting, and the mean weight of surviving insects was recorded at given intervals.

### 2.7. Midgut homogenates

For determination of proteolytic activities in the digestive tracts of *D. peruvianus*, homogenates of whole intestines were used. For that, fourth instars or adults with no previous starving period were immobilized in ice and immersed in an ice-cold dissection solution (1.4 M sucrose, 0.1 M HEPES-Tris, pH 7.0, 2.5 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF). The whole intestines were removed and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 50% v/v glycerol in water, in the proportion of 20 intestines per ml. For preparing the homogenates, the material was thawed, homogenized manually with an ice-cold Potter pestle, centrifuged at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  at 4000g (twice, 10 min each) and then at 12,000g for 5 min. The final supernatants were kept frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until used for the enzymatic assays.

### 2.8. Enzymatic assays

The midgut homogenates (final concentration, 1.0  $A_{280}$  units of protein per ml) were tested for proteolytic activity

upon casein or hemoglobin (Lemos et al., 1990; Terra et al., 1988; Silva and Xavier-Filho, 1991). One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme releasing 0.001  $A_{280}$  of acid-soluble peptides per hour at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The pH was varied in the range 2.6–9.0, using 30 mM citrate-phosphate buffer (pH 2.6–6.6) or Tris-HCl (pH 7.0–9.0). To identify the classes of proteinases (Barret, 1998) present in the homogenates, aliquots were pre-incubated overnight at  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  with each of different inhibitors at the specific final concentration and then tested for hemoglobinolytic activity: 8  $\mu\text{M}$  E-64, 8  $\mu\text{M}$  pepstatin A, 3 mM PMSF or 6.5 mM EDTA.

### 2.9. Statistical analysis

Unpaired Student *t*-test was applied to the data and  $p < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Lethal effect of canatoxin fed to *Dysdercus peruvianus*

To test the adequateness of the method developed to feed insecticidal compounds to the cotton sucker bug *D. peruvianus*, third instars and male adults were given artificial cotton seeds containing the polysaccharide dextran

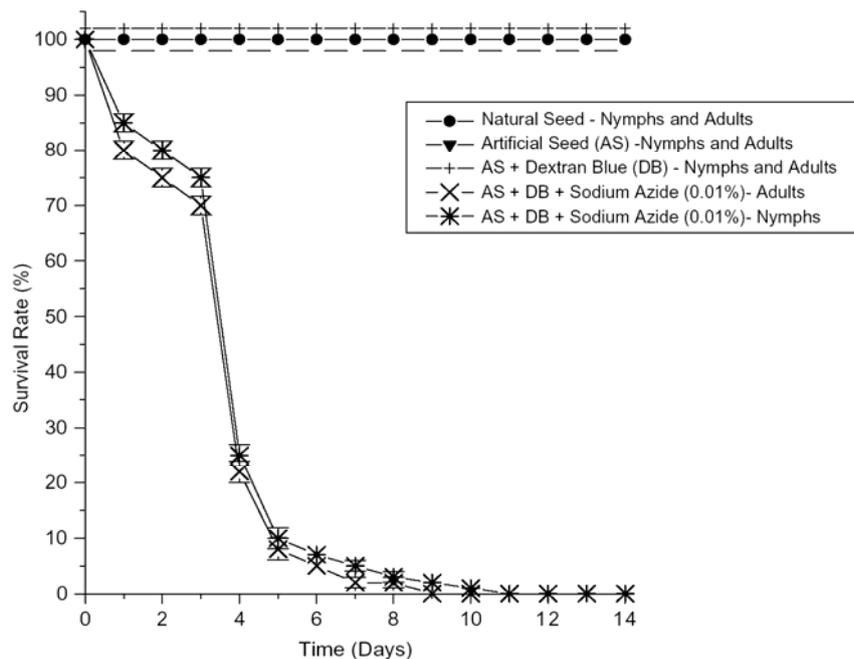


Fig. 1. Test of the artificial feeding method for *Dysdercus peruvianus*. Nymphs (third instar) and adults were fed on artificial seeds consisting of gelatin capsules filled with cotton flour alone or with addition of Dextran Blue (0.05% w/w) or Sodium Azide (0.01% w/w). A control group fed on natural cotton seeds. Surviving insects were counted daily. Results are expressed as means and standard deviations of three independent experiments, with points in triplicates.

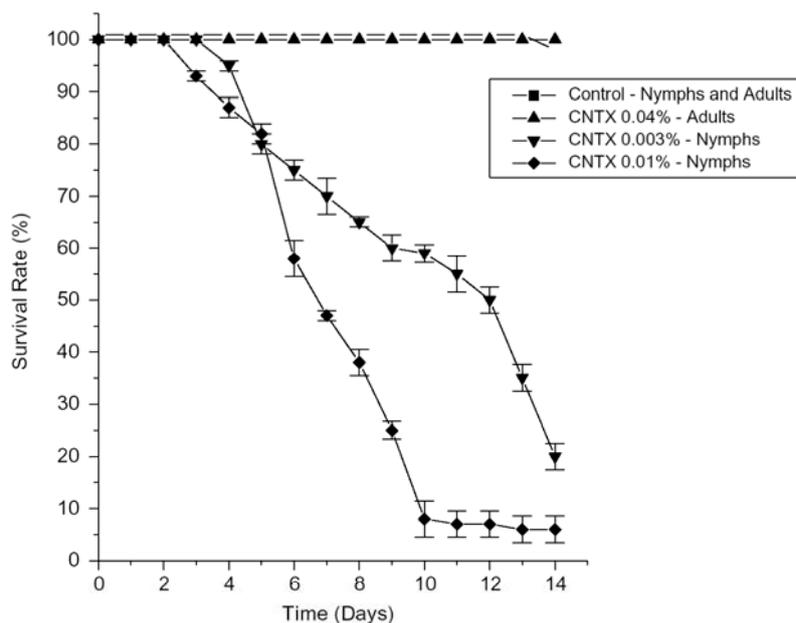


Fig. 2. Insecticidal effect of CNTX on *Dysdercus peruvianus*. Nymphs (third instar) or adults fed on artificial seeds containing CNTX in different concentrations. Surviving insects were counted daily. Results are expressed as means and standard deviations of three independent experiments, with points in triplicates.

blue (0.05% w/w, in water) or sodium azide (0.01% w/w, in water). Fig. 1 shows that no lethality was seen for control insects feeding on artificial seeds made only of cotton meal or those containing dextran blue, which was visible inside the nymphs, indicating the insects had ingested the polysaccharide. On the other hand, as expected a high mortality rate was observed for insects that fed on seeds containing sodium azide, with no survivals after 8–9 days.

Fig. 2 illustrates the potent insecticidal effect of feeding canatoxin to third instar *D. peruvianus*. The effect was time dependent with a lag phase of 4–5 days, reaching 90–100% mortality after 10 days. Second or fourth instars were as sensitive to the toxic effects of CNTX as third instars (not shown). In contrast, 100% of the adults survived 14 days ingesting a concentration of CNTX 4-fold higher than that which killed almost all nymphs after 10 days. The adult insects, however, were as susceptible to sodium azide as the young forms.

Lethality was not the only toxic effect seen for CNTX-fed young *D. peruvianus*. The weight gain of nymphs which had survived 14 days on a CNTX-containing diet was significantly smaller (Fig. 3) and the duration of their larval stages increased (Table 1).

Midgut homogenates of adults and fourth instars were assayed for proteolytic activity upon hemoglobin and casein in the absence and in the presence of the inhibitors pepstatin A (aspartic proteinase and/or cathepsin D like enzymes), E-64 (cystein proteinases and/or cathepsins B like

enzymes), PMSF (trypsin-like enzymes) and EDTA (metalloproteinases). Fig. 4 illustrates typical patterns of proteolytic activity for midgut homogenates of nymphs and adult *D. peruvianus* as well as their residual activity in the presence of different enzyme inhibitors. It could be seen that acidic proteinases predominate either for young or adult insects although the proteolytic activity upon both substrates showed a shift to higher pH for the adults. Thus the midgut homogenates of nymphs showed maximal activities for casein (not shown) and hemoglobin at pH 3.5–4.0 while for adults the maximal activity was found at pH 4.5–5.0. Moreover, a second peak of activity upon hemoglobin at alkaline pH (pH 8.5) was found only in homogenates of adult midguts.

Fig. 4 also shows the decrease in the hemoglobinolytic activity of adult and nymph midgut homogenates after pre-incubation with different inhibitors. E-64 and pepstatin A inhibited substantially the proteolytic activity of nymph midguts, indicating the prevalence of cathepsin-like type B and D enzymes, respectively. In contrast, only pepstatin A inhibited significantly (about 70%) the hemoglobinolytic activity of adult midguts, pointing to a minor participation of the cystein proteinase(s) present in young insects. Metalloproteinase(s) are present in the midgut of nymphs and adults insects. A serine proteinase (trypsin-like) active in pH 8.5 was seen only in the midgut of adults.

In another experiment, third instar nymphs were fed on artificial seeds containing a recombinant peptide (0.01% w/w,

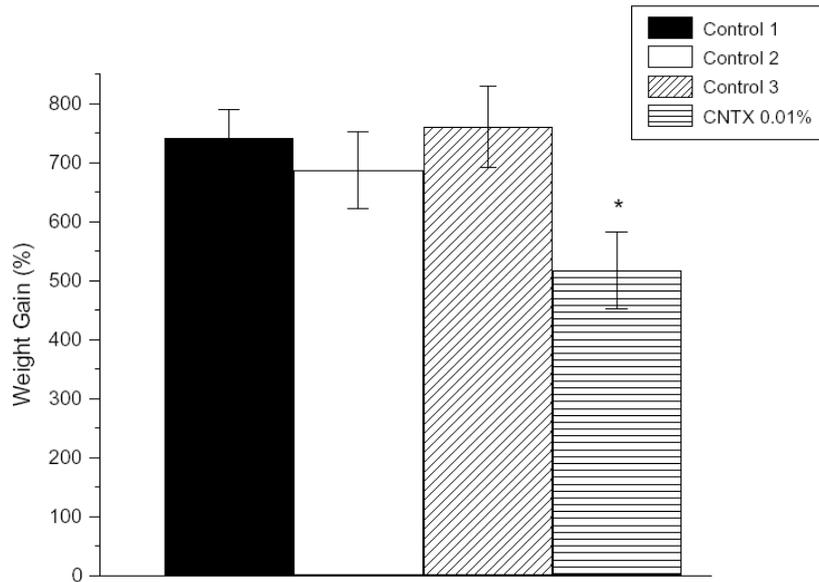


Fig. 3. Weight gain of Nymphs after 14 days on a CNTX-containing Diet. Control 1: Nymphs fed on natural seed; Control 2: Nymphs fed on artificial seed; Control 3: Nymphs fed on artificial seed containing Dextran Blue; CNTX: Nymphs fed on artificial seed containing CNTX 0.01% w/w. The mean weight of each insect group was recorded on day zero and for the surviving insects, after 14 days. Results are expressed as means and standard deviations of three independent experiments, with points in triplicates. (\* $p < 0.05$ ).

obtained by heterologous expression in *E. coli*), corresponding to the amino acid sequence of a canatoxin-derived entomotoxic peptide obtained by hydrolyzing the protein in vitro with *C. maculatus* digestive enzymes (Ferreira-DaSilva et al., 2000; Mulinari et al., unpublished results, patent pending). Fig. 5 shows that the recombinant peptide induced a more rapid entomotoxic effect when fed to the insects than did the intact protein. Thus after a 5–10 days feeding period, the mortality rate of insects fed on a diet containing 0.01% w/w recombinant peptide was about threefold higher than that of the group feeding on a canatoxin diet.

#### 4. Discussion

In this work, we describe details of a new methodology developed for using the hemipteran bug *D. peruvianus*, a pest of cotton culture, as a model for testing insecticidal compounds active by oral route. This model system allowed us to demonstrate the potent insecticidal effect of canatoxin, and of a peptide derived from it, when added to the insect's diet. On weight basis, CNTX is about 25 times more toxic to *D. peruvianus* than to the cowpea weevil *C. maculatus* making this protein one of the most active insecticidal protein of plant origin known so far (Carlini et al., 1997; Carlini and Grossi-de-Sá, 2002).

In previous studies, it was shown that a single meal containing CNTX was lethal to nymphs (third and fourth instars) of the hematophagous hemipteran bug *R. prolixus*,

in a dose- and time-dependent manner, with a lag-phase of at least 24 h (Carlini et al., 1997; Ferreira-DaSilva et al., 2000). In contrast, adults *R. prolixus* receiving high doses of canatoxin in their diets showed no signs of intoxication and no lethality was seen up to 10 days after the meal. Differences in the fragmentation pattern of CNTX by adults and nymphs of *R. prolixus* resulted in distinct pattern of immunoreactive peptides in their hemolymph, as seen in Western blot analysis with anti-canatoxin antibodies. The permeability of midgut membranes to proteins (immunoglobulins) also differed in young forms as compared to adult *R. prolixus* (Ferreira-DaSilva et al., 2000).

Table 1

Duration of developmental stages in days

	Third stage	Fourth stage	Fifth stage
Control 1	6.5 ± 0.7	6 ± 1.4	6 ± 1.4
Control 2	6.5 ± 0.7	7 ± 1.4	6.5 ± 2.1
Control 3	6 ± 1.4	6 ± 1.4	6 ± 1.4
CNTX	10 ± 2.8	11 ± 1.4*	10 ± 1.4*

Note: *D. peruvianus* nymphs (third instar) fed on different diets and the number of insects undergoing ecdysis in each group was counted during 14 days. Control 1: Nymphs fed on natural seed; Control 2: Nymphs fed on artificial seed; Control 3: Nymphs fed on artificial seed containing Dextran Blue; CNTX: Nymphs fed on artificial seed containing CNTX 0.01% w/w. Results are expressed as means and standard deviations of the time required for molting of all the insects in each group. Data from three independent experiments, with points in triplicates. (\* $p < 0.05$ ).

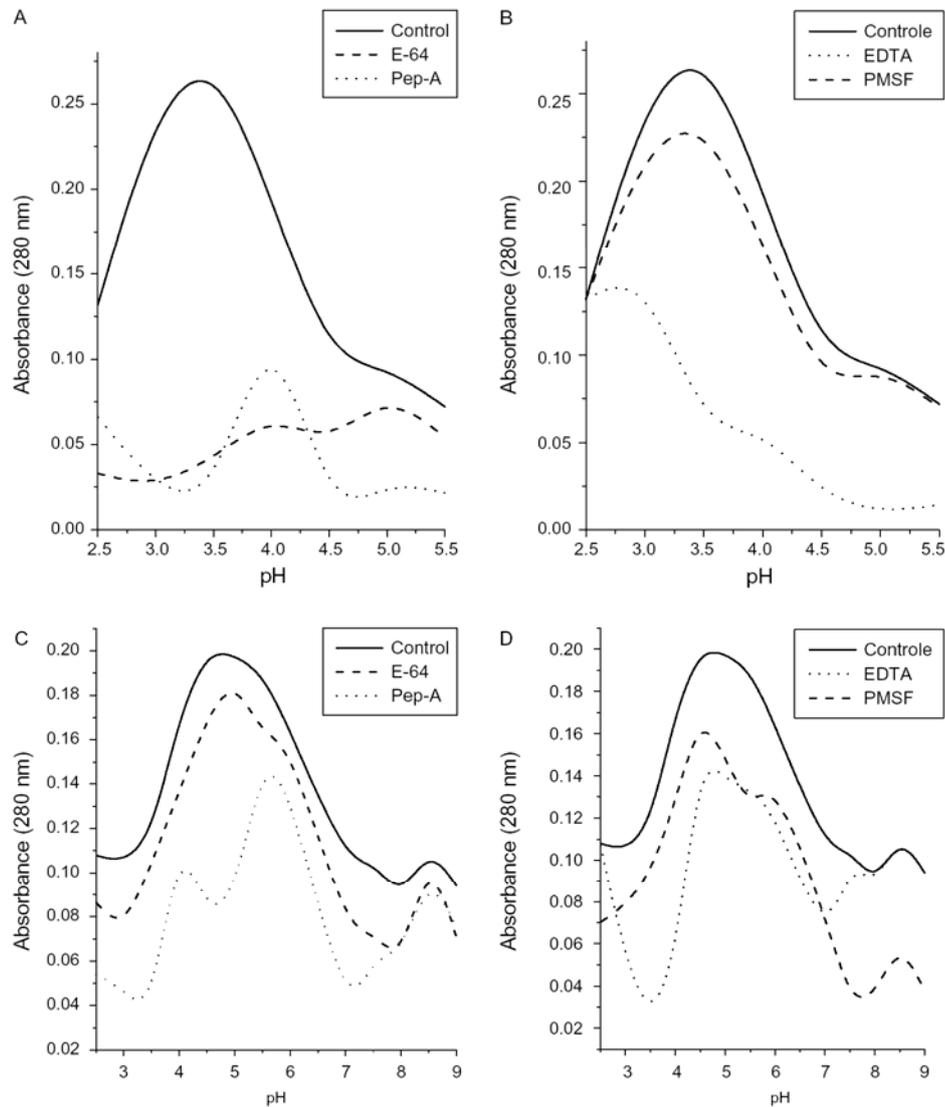


Fig. 4. Effect of different inhibitors upon the hemoglobinolytic activity of midgut homogenates of (A–B) nymphs or (C–D) adults of *Dysdercus peruvianus*. The results are shown as absorbance of acid-soluble peptides released after incubation of midgut homogenates and substrate for 3 h at 37 °C, in the absence or in the presence of the indicated inhibitors. Final concentrations: E-64 (8  $\mu$ M), Pepstatin-A (8  $\mu$ M), EDTA (6.5 mM) and PMSF (3 mM). The curves show typical results of at least three independent experiments.

Here we describe the lethal effect of CNTX in young forms of *D. peruvianus*, and show that adults were not affected at 4-fold higher doses. Thus the lack of susceptibility of adult hemipteran insects to ingested CNTX is not related to their food preference, since it was observed for both hematophagous (*R. prolixus*) and phytophagous species. Additional studies revealed distinct proteolytic activities in the intestines of young and adult *D. peruvianus*, which may result in different proteolytic fragmentation of

the protein. Differences in several physiological aspects during the life cycle of insects are well known. Similar to our results with CNTX in *R. prolixus* and *D. peruvianus*, increased resistance of late larval stages of *Spodoptera littoralis* to *Bacillus thuringiensis* endotoxins (CryIC) as compared to young larvae has been described and attributed to different enzymatic processing of the toxin (Keller et al., 1996). Altogether, the differences in intestinal permeability and/or digestive processing of dietary proteins according to

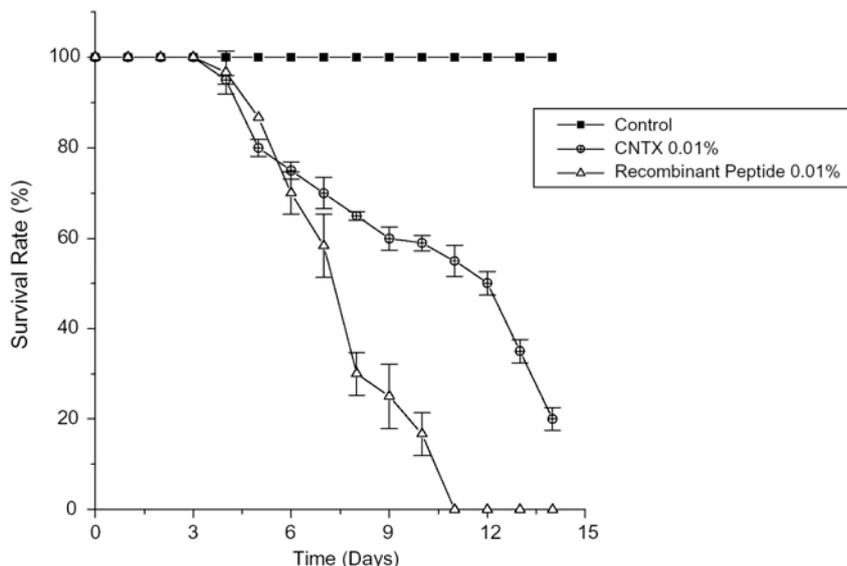


Fig. 5. Lethal effect of Canatoxin or a recombinant peptide derived from it in *D. peruvianus*. Nymphs (third instar) were fed with recombinant peptide (0.01% w/w) or canatoxin (0.01% w/w) and lethality was observed daily. Results are expressed as means and standard deviations of three independent experiments, with points in triplicates.

the insect's life stage might explain the lack of effects of CNTX in adult hemipteran bugs.

The *in vivo* proteolytic 'activation' of canatoxin by *R. prolixus* digestive cathepsins was demonstrated by interfering in the toxin's effect by simultaneous ingestion of the enzyme inhibitors, E-64 and/or pepstatin A (Ferreira-DaSilva et al., 2000). In this work, we have characterized the classes of proteinases present in intestinal homogenates of nymphs (fourth instar) and adult *D. peruvianus*. For both forms of the insect, a predominance of cathepsin-like enzymes was seen, although the relative proportion and the pH for maximal activity of the enzymatic activities differed for each developmental stage. Thus it seems plausible that also for *D. peruvianus* larval stages there is a need of proteolytic processing of CNTX by cathepsin-like enzymes to release entomotoxic peptide(s).

As a matter of fact, *D. peruvianus* nymphs were susceptible to the entomotoxic effect of a 12.8 kDa recombinant peptide containing the amino acid sequence of a CNTX-derived peptide obtained by hydrolyzing the protein *in vitro* with *C. maculatus* digestive enzymes (Ferreira-DaSilva et al., 2000; Mulinari et al., unpublished results, patent pending). Present in the diet at 0.01% w/w, the toxic effect induced by the recombinant peptide was faster and the lethality observed after 10 days was about three times higher than that produced by the intact protein in the same condition. Although we did not quantify the amount of diet ingested by each insect thus not allowing a direct comparison of doses, the faster onset of insecticidal

activity of the recombinant peptide is probably due to the elimination of the need of proteolytic processing of intact protein. On the other hand, this concentration of recombinant peptide was not toxic to adult insects (results not shown). The fact that CNTX or its recombinant peptide are not lethal to adult insects at a 0.01% w/w concentration should not be taken as a limitation to their potential use as bioinsecticides. For a number of insects, adult forms do not feed at all or have different feeding habits as compared to their larval forms, and are not considered relevant as crop pests. Even if adult insects turnout to be affected by higher doses of CNTX or its recombinant peptide, the increased susceptibility of larval forms would make them the preferential targets and this concentration of recombinant protein/peptide is attainable in a transgenic plant approach. On the other hand, is not necessary to exterminate an entire insect population to reduce crop damage nor is this desirable as it would increase pressure selection for resistant pests (Carozzi and Koziel, 1997). In some cases, a 30% delay in the life cycle of the insect pest could be enough to allow plants to develop up to be harvested (Parra et al., 2002).

In conclusion, in this paper we give details on a new method developed for testing insecticidal compounds by oral route on the cotton stainer bug *D. peruvianus*. Our results demonstrated the potent insecticidal effect of canatoxin and of a peptide derived from it, on this cotton culture pest. These compounds may add new possibilities in the arsenal of available bioinsecticides to control crops pests that are not susceptible to *Bt* proteins.

### Acknowledgements

We are grateful to Dr. Carlos Peres Silva, Universidade Estadual do Norte Fluminense, for the insects supply, and Maria Martha Guedes Chaves for preparation of Canatoxin. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Cooperação Acadêmica—Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Procad-CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-MCT).

### References

- Barcellos, G.B.S., Almeida, L.A., Moreira, R.A., Sousa-Cavada, B., Oliveira, J.T.A., Carlini, C.R., 1993. Canatoxin-, Concanavalin A- and Canavalin-cross-reactive materials during maturation of *Canavalia brasiliensis* seeds. *Planta* 189, 397–402.
- Barret, A.J. (Ed.), 1998. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, New York, p. 1666.
- Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, F.M., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515–1539.
- Carlini, C.R., Guimarães, J.A., 1981. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin-A. *Toxicon* 19, 667–676.
- Carlini, C.R., Guimarães, J.A., 1991. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon* 29, 791–806.
- Carlini, C.R., Barcellos, G.B.S., Baeta-Neves, A.D.V., Guimarães, J.A., 1988. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin-A among proteins from leguminous seeds. *Phytochemistry* 27, 25–30.
- Carlini, C.R., Oliveira, A.E., Azambuja, P., Xavier-Filho, J., Wells, M.A., 1997. Biological effects of canatoxin in different insect models. Evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. *J. Econ. Entomol.* 90, 340–348.
- Carozzi, N., Koziel, M. (Eds.), 1997. *Advances in Insect Control. The Role of Transgenic Plants*. Taylor and Francis, UK.
- Ferreira-DaSilva, C.T., Gombarovits, M.E., Masuda, H., Oliveira, C.M., Carlini, C.R., 2000. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44 (4), 162–171.
- Follmer, C., Barcellos, G.B., Zingali, R.B., Machado, O.L., Alves, E.W., Barja-Fidalgo, C., Guimaraes, J.A., Carlini, C.R., 2001. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem. J.* 15, 217–224.
- Follmer, C., Wassermann, G.E., Carlini, C.R., 2004. Separation of Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Sci.* 167, 241–246.
- Gallo, D. (Ed.), 1988. *Manual de Entomologia Agrícola*, second ed. CERES, São Paulo, p. 649.
- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., Schell, J., Zilberstein, A., 1996. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 365–373.
- Lemos, F.J.A., Campos, F.A.P., Silva, C.P., Xavier-Filho, J., 1990. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomol. Exp. Appl.* 56, 219–227.
- Milano, P., Consoli, F.L., Zerio, N.G., Parra, J.R.P., 1999. Thermal requirements of the cotton stainer *Dysdercus peruvianus* Guerin-Meneville (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 28 (2), 233–238.
- Oliveira, A.E.A., Gomes, V.M., Sales, M.P., Fernandes, K.V.S., Carlini, C.R., Xavier-Filho, J., 1999. The toxicity of jack bean *Canavalia ensiformis*(L.) DC. canatoxin to plant pathogenic fungi. *Ver. Brasil. Biologia.* 59, 59–62.
- Parra, J.R.P., Botelho, P.S.M., Corrêa-Ferreira, B.S., Bento, J.M.S. (Eds.), 2002. *Controle biológico no Brasil—parasitóides e predadores*. Manole, Piracicaba, p. 609.
- Silva, C.P., Terra, W.R., 1994. Digestive and Absorptive Sites Along the Midgut of the Cotton Seed Sucker Bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24 (5), 493–505.
- Silva, C.P., Xavier-Filho, J., 1991. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae). *Comp. Biochem. physiol.* 99B, 529–533.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Garcia, E.S., 1988. Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochem.* 18, 423–434.

## Capítulo 4

### **TRANSFORMAÇÃO DE TABACO (*Nicotiana tabacum*) COM O PEPTÍDEO INSETICIDA JABURETOX-2**

## Justificativa

Jaburetox-2Ec (jaburetox-2 + metionina inicial + epítopo V-5 e His-tag no C-terminal, obtido através de expressão heteróloga em células de *E. coli*), mostrou-se tóxico para insetos como *D. peruvianus*, *S. frugiperda* (Mulinari *et al.*, 2007 – capítulo 3), *R. prolixus*, *T. infestans* (Tomazetto *et al.*, 2007- capítulo 3) e *B. germânica* (Mulinari, 2004a), despertando o interesse de aplicações biotecnológicas para este peptídeo.

A expressão do fragmento de cDNA *jaburetox-2* (acrescido de uma códon de iniciação e um códon de terminação da tradução) em plantas de tabaco viabilizará estudos de toxicidade do peptídeo expresso em plantas. Este sistema permite realizar bioensaios diretamente na planta transformada, através da alimentação de insetos susceptíveis, como a lagarta *S. frugiperda*, e verificação de seu potencial uso para transformação de plantas comerciais, visando resistência a insetos.

## **Materiais e métodos**

### *Construção do vetor*

A seqüência codificadora de *jaburetox-2* foi amplificada através de PCR utilizando enzima DNA polimerase pfu (Stratagene) e os oligonucleotídeos *jaburetox-2Ec* forward: 5' CGGAATTCATGGGTCCAGTTAATGAAGC 3', que adiciona um sítio *EcoRI* e um códon de iniciação (ATG) à seqüência de *jaburetox-2*, e o oligonucleotídeo *jaburetox-2Ec* reverso: 5' GGGGTACCTCATATAACTTTTCCACCTCCAAA 3', que adiciona um sítio *KpnI* e um códon de terminação (TGA) à seqüência *jaburetox-2*. A PCR foi realizada num volume final de 25 µl, contendo 400 nM de cada oligonucleotídeo, 200 µM de dNTPs, tampão 1X, 2,5 U de DNA-polimerase pfu (Stratagene) e 500 ng de DNA molde (pGEMT-easy, contendo o fragmento interno de JBURE-II de 1.800 pb - Pires-Alves, 2003). A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient – Eppendorf) e teve as seguintes condições físicas: desnaturação prévia a 94° C por 1,5 min; 29 ciclos de incubação a 94° C por 30 s (desnaturação), 52° C ou 54° C por 45 seg (anelamento) e 72° C por 1 min (extensão). A fase de extensão final foi realizada a 72° C por 5 min.

O produto da amplificação por PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo. O fragmento amplificado de tamanho esperado (298 pb) foi visualizado em luz ultravioleta, removido do gel com auxílio de um bisturi cirúrgico e purificado como descrito no anexo (protocolos gerais-item A). Em seguida, o fragmento foi digerido com a enzima *KpnI* utilizando-se 2 U de enzima/µg DNA, tampão (concentração 2X) de digestão One-Phor-All (OPA) (Amersham) a 37° por 3 h.

Paralelamente, o vetor pCAMBIA2300-AMV-35Sd-Tnos, previamente obtido pelo grupo, foi digerido com a enzima de restrição *SmaI* (2U de enzima/µg DNA; 2x do tampão de digestão One-Phor-All (OPA) (Amersham) a 37° por 3 h). O vetor linearizado foi purificado como descrito no anexo (protocolos gerais-item A). Em seguida, o vetor foi digerido com a enzima *KpnI* (2U de enzima/µg DNA;

2x do tampão de digestão One-Phor-All (OPA) (Amersham) a 37° por 3 h) e purificado novamente.

Para obtenção do vetor pCAMBIA2300-AMV-35Sd-*jaburetox-2*-Tnos, realizou-se a ligação de 1 µg do vetor pCAMBIA2300-AMV-35Sd-Tnos e 500 µg do inserto, previamente digeridos e purificados, como descrito anteriormente, utilizando-se a enzima T4-DNA-ligase, a 16°C por 16 h. Cresceram 10 colônias. Os clones positivos na PCR de colônia foram submetidos à purificação de plasmídeos (Protocolos gerais - item C) e digeridos com *Eco* RI para confirmação da posição do inserto. Apenas um plasmídeo apresentou fragmento esperado de 600 pb. Este foi seqüenciado para confirmação da presença e orientação do inserto.

#### *Transformação de Agrobacterium tumefaciens com o vetor pCAMBIA2300-AMV-35Sd-jaburetox2-Tnos*

A construção pCAMBIA2300-AMV-35Sd-*jaburetox2*-Tnos e a construção controle, sem o inserto de *jaburetox-2* (pCAMBIA2300-AMV-35Sd-Tnos) foram introduzidas em células competentes de *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) via choque térmico (preparadas como descrito no item D de “protocolos gerais”), utilizando 1 µg de DNA plasmidial e 100 µl de células. As células foram incubadas no gelo por 30 min, transferidas para o nitrogênio líquido por alguns segundos e incubadas a 37 °C por 5 min. Adicionou-se 1 ml de meio LB ou YEB pré-aquecido a 37 °C e as células foram incubadas a 28°C durante 3 horas sem antibiótico e sob agitação. Foram, então, plaqueadas em meio LB sólido contendo 50µg/ml de gentamicina, 50 µg/ml de rifampicina (marcadores de seleção da própria agrobactéria) e 100 µg/ml de canamicina (marcador de seleção do plasmídeo inserido) e incubadas a 28°C por 48 h.

As colônias foram submetidas a PCR de colônia, extração de DNA plasmidial (item C de “protocolos gerais”) e perfil de digestão com enzimas para confirmar a presença e direção do vetor.

### *Transformação de plantas de Nicotiana tabacum*

A transformação de plantas de *Nicotiana tabacum* (variedades SR1 e Xanthi) foi realizada segundo Brasileiro & Carneiro, 1998, com algumas modificações. Foram utilizadas folhas jovens (1 – 3 meses) de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) var. *Xanthi*, disponíveis na EMBRAPA-Cenargen, cultivadas em casa de vegetação, e folhas de plantas variedade SR1 disponibilizadas pelo Dr. Giancarlo Pasquali (Centro de Biotecnologia – UFRGS), mantidas em meio MS, em sala de cultura. As folhas jovens foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 2% por 20 min e lavadas 5 vezes com água autoclavada. Em seguida, as folhas foram cortadas em quadrados de 0,5 cm X 0,5 cm e inoculadas em meio MS líquido, contendo 600µl do cultivo de *A. tumefaciens* com as construções acima descritas. A co-cultura foi mantida no escuro por 40 min, os explantes foram transferidos para meio MS sólido e mantidos em câmara de crescimento a 16 C no escuro por 2 dias. Para regeneração e seleção, os explantes foram transferidos para MS sólido contendo 1 mg/mL benlaminopurine (BAP), 500 µg/L de cefotaxima e 100 µg/mL de canamicina, sendo mantidos em câmaras com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $\pm 25$  °C. Após duas semanas, os explantes foram cortados e colocados novamente em placas com MS (BAP-cefotaxima-canamicina). As plântulas foram transferidas para frascos tipo magenta contendo MS-canamicina-cefotaxima sem BAP e mantidas em câmaras de crescimento com foto período de 16 horas e temperatura de  $\pm 25$  °C até serem transferidas para o solo.

As plântulas que enraizaram foram transferidas para copinhos plásticos, contendo terra autoclavada misturada a vermiculita 50% (m/m) e cobertas com sacos plásticos. Após 2 dias de adaptação, as plantas foram transferidas para terra e mantidas em casa de vegetação.

Após um mês, foram retiradas folhas das plantas e realizou-se extração de DNA (protocolos gerais, item F). Em seguida, realizou-se PCR conforme descrito previamente, utilizando como molde o DNA extraído de folhas de tabaco (protocolos gerais - item E).

### *Produção de anticorpos policlonais contra Jaburetox-2*

Para produção de anticorpos policlonais contra jaburetox-2, o peptídeo recombinante foi produzido e purificado conforme descrito em Mulinari *et al.* (2007 - capítulo 3). Uma alíquota de 100 µg do peptídeo puro foi misturada a 500 µg de gel de poliácridamida 12% picado, ao qual adicionou-se 500 µl de Adjuvante Completo de Freud. Após emulsionar bem a mistura, utilizando seringas e agulhas, aplicou-se 5 injeções intradérmicas no lado direito das costas de um coelho jovem. Após 3 semanas, repetiu-se o mesmo procedimento, aplicando as injeções no lado esquerdo das costas do animal.

Duas semanas depois, realizou-se o reforço, através de injeção intramuscular com emulsão contendo 100 µg (100 µl de solução 1 µg/µl) de jaburetox-2 purificado, 250 µl de Adjuvante de Freud incompleto e 150 µl de água. Três dias depois do reforço, coletou-se sangue da orelha do coelho em citrato de sódio 0,38% e a presença dos anticorpos foi verificada através de testes de imunodifusão. Foram realizados mais dois reforços, com intervalos de duas semanas, e três dias depois do último reforço, realizou-se a sangria (55 ml) pela orelha, sem sacrificar o animal. O título do anticorpo foi determinado através de dot-blot, utilizando 1 µg das ureases de soja, *B. pasteurii*, *Canavalia ensiformis* e 0,1 µg de jaburetox-2, contra diferentes diluições do anticorpo: 1:100, 1:300, 1:1.000, 1:10.000 e 1:30.000. Utilizou-se anticorpo secundário anti-IgG de coelho com fosfatase alcalina conjugada (1:10.000) e revelação com NBT/BCIP.

### *Extração de proteínas totais a partir de folhas de N. tabacum*

Folhas jovens de plantas transformadas (J), não transformadas (NT) e transformadas com vetor vazio (VV) foram pesadas, maceradas em nitrogênio líquido, e adicionou-se tampão de extração (Tris HCl 125 mM pH 8,8, contendo 10% de glicerol, 0,01% de SDS e 50 mM de metabissulfato de sódio –Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) na proporção 1:1 (m/v), ou seja, neste caso, 200 ml para 200 g de folhas. Após 20 min, o extrato foi centrifugado a 13.000 rpm 4° C por 30 min, o sobrenadante foi

coletado e seu conteúdo protéico foi quantificado utilizando-se o método de Bradford (1976).

### *Bioensaio*

Para testar a eficiência da proteína recombinante expressa, foram realizados bioensaios utilizando discos foliares de *Nicotiana tabacum* (var. Xanthi e SR1) para alimentar larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda*. O bioensaio foi realizado em cama de fluxo laminar sendo que para cada repetição foram preparados potes plásticos de 250 ml esterilizados com álcool 70% e com luz ultra violeta por 20 minutos. Posteriormente foi vertido em cada pote 30 a 40 ml de agar/água (1%) autoclado. Após a solidificação do mesmo, foi colocado no centro do pote discos foliares de 3 cm de diâmetro das transformantes ou controle (não transformada) na posição vertical, em uma ranhura feita com bisturi. Em cada pote foi colocado uma larva de primeiro instar de *Spodoptera frugiperda* proveniente da criação existente na Embrapa/Cenargen.

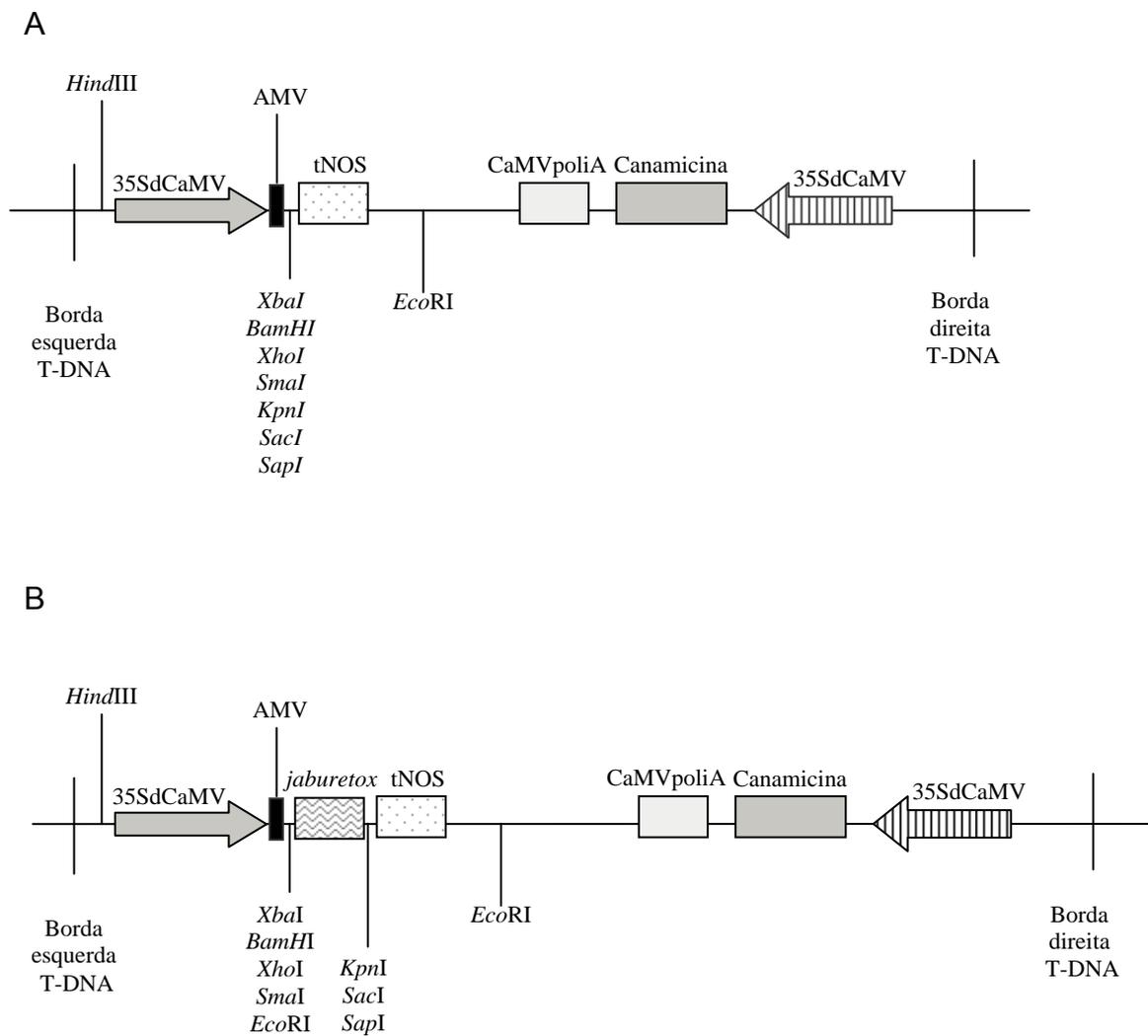
Os potes foram então fechados com uma tampa contendo um orifício com algodão e levada a uma BOD com temperatura e humidade controlados. A cada 3 dias os discos foliares eram repostos e feito a contagem de larvas mortas para cálculo da porcentagem de mortalidade. Para cada transformante foram realizadas 3 repetições, com 30 potes e um controle negativo do experimento onde foram colocados discos foliares das plantas não transformadas.

## Resultados e Discussão

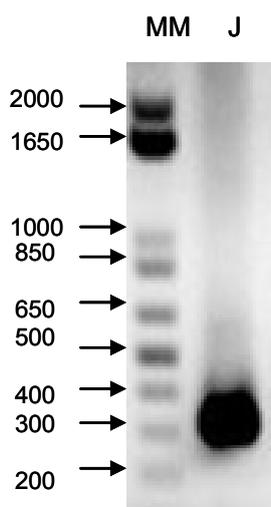
Para obtermos a expressão de *jaburetox-2* em plantas de tabaco, optamos por um vetor previamente construído (pCAMBIA2300-AMV-35Sd-Tnos). Este vetor foi construído a partir do vetor binário comercial pCAMBIA 2300, porém, foi introduzido um cassete contendo o promotor constitutivo 35 S do vírus do mosaico da couve-flor duplicado (Cauliflower Mosaic Virus -CaMV35Sd), seguido da região potencializadora de tradução AMV e do terminador nopalina sintetase (“nopaline synthase terminator” - Tnos), como esquematizado na Figura 4.1 A.

A construção do vetor pCAMBIA2300-AMV-35Sd-*jaburetox2*-Tnos, a partir dos pCAMBIA2300-AMV-35Sd-Tnos e do inserto *jaburetox-2* obtido a partir de PCR (Figura 4.2), como esquematizada na figura 4.1 B, foi realizada com sucesso.

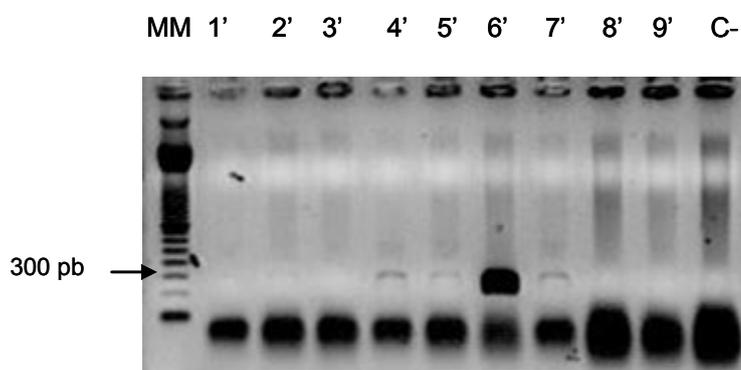
O inserto foi amplificado utilizando iniciadores que introduziram um sítio de clivagem para *EcoRI* e um códon de iniciação da tradução no início do fragmento gênico *jaburetox-2*, visto que este não possui originalmente códon de iniciação, tratando-se de uma seqüência interna de *jbure-II*. No iniciador reverso, foi adicionado um códon de terminação da tradução (TGA), seguido de um sítio para clivagem para a enzima *KpnI*. Foi realizada uma PCR de colônia (Figura 4.3) e os clones positivos (4', 5', 6' e 7') foram purificados e digeridos para verificação da presença e posição do inserto. A digestão dos vetores com a enzima de restrição *EcoRI* liberou o inserto do tamanho esperado (600 pb: fragmento + parte do vetor) apenas no vetor 6', indicando a inserção do fragmento de cDNA na posição correta neste clone (Figura 4.4), confirmada adicionalmente através de seqüenciamento. Os clones 4', 5' e 7' foram negativos, sendo que a PCR de colônia provavelmente apresentou a banda devido a uma contaminação dos poços adjacentes ao do clone positivo 6'. O clone 6' previamente seqüenciado foi utilizado para transformação de *A. tumefaciens* e a introdução do vetor na agrobactéria foi confirmada através de PCR de colônia e digestão com enzima *EcoRI*, liberando fragmento de 600 pb. Foram utilizadas uma colônia positiva, contendo o inserto *jaburetox-2*, e uma colônia contendo o vetor sem inserto.



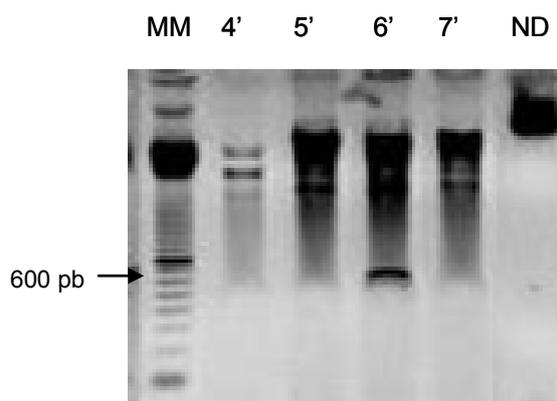
**Figura 4.1** Representação esquemática do cassete de expressão dos vetores pCAMBIA2300-AMV-35Sd -Tnos (A) e pCAMBIA2300-AMV-35Sd-jaburetox2-Tnos (B).



**Fig. 4.2** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR para obter massa do fragmento gênico *jaburetox*. MM: marcador molecular (pb). J: amplificação de *jaburetox-2* por PCR.



**Fig. 4.3.** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR de colônia da transformação de *E. coli* com a construção pCAMBIA2300-AMV-35Sd-*jaburetox2*-Tnos. MM: marcador molecular (pb). 1'-9': colônias testadas. C-: controle da reação (sem DNA).



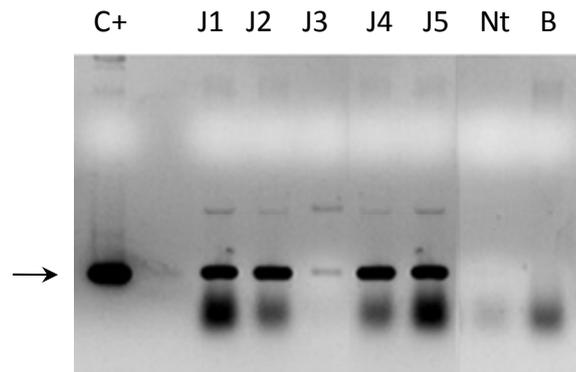
**Fig. 4.4.** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da digestão com a enzima *EcoRI* para confirmar presença e posição do inserto *jaburetox-2* nos clones de pCAMBIA2300-AMV-35Sd-*jaburetox2*-Tnos. MM: marcador molecular (pb). 4', 5', 6', 7': clones analisados. ND: clone 6' não digerido.

Após co-cultura, seleção e regeneração dos explantes, as plântulas foram transferidas para magentas e obtivemos 12 plantas (5 SR1 e 7 Xanthi) enraizadas em meio seletivo, que foram climatizadas e transferidas para casa de vegetação. Aparentemente, as plantas transformadas com *jaburetox-2* não apresentaram modificações na aparência, crescimento, florescimento e produção de sementes em relação às plantas controle (transformadas com vetor vazio) e às plantas não transformadas.

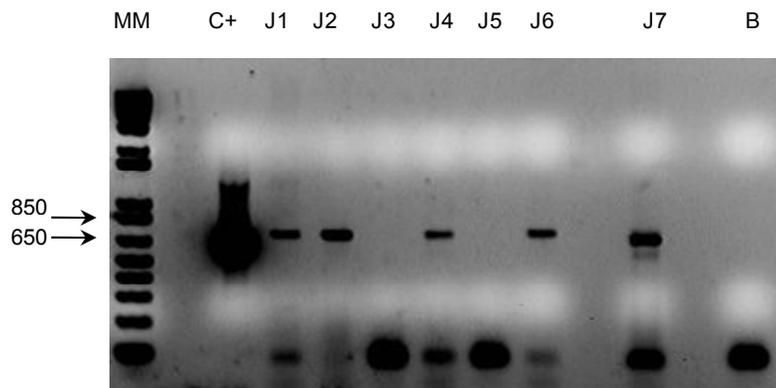
As plantas foram testadas por PCR para verificação da incorporação do fragmento de cDNA *jaburetox-2*. Obtivemos quatro plantas PCR positivas da variedade SR1 (Figura 4.5) e cinco plantas PCR positivas da variedade Xanthi (Figura 4.6).

Foram realizados experimentos de imunorreatividade para detecção da proteína recombinante *jaburetox-2* em extratos preparados a partir das plantas de tabaco. As concentrações de proteína nos extratos variaram de 6 a 9 mg de proteína por g de tecido de folhas frescas. Para realização destes ensaios, utilizou-se anticorpos policlonais anti-*jaburetox-2Ec*, expresso em células de *E. coli* (Mulinari *et al.*, 2007 - capítulo 3). A partida de anticorpos utilizada apresentava imunorreatividade bastante forte contra o peptídeo, reconhecendo 0,1 µg de *jaburetox-2Ec* até diluições de 1:30.000 (Figura 4.7). Provavelmente, pode-se utilizar diluições ainda maiores, mas nesta última diluição, não há mais reação cruzada contra as ureases testadas (soja embrião específica, *Canavalia ensiformis* JBU e *B. pasteurii*), o que diminui a possibilidade de falso positivo com outras proteínas do extrato de tabaco, principalmente com a urease dessa planta.

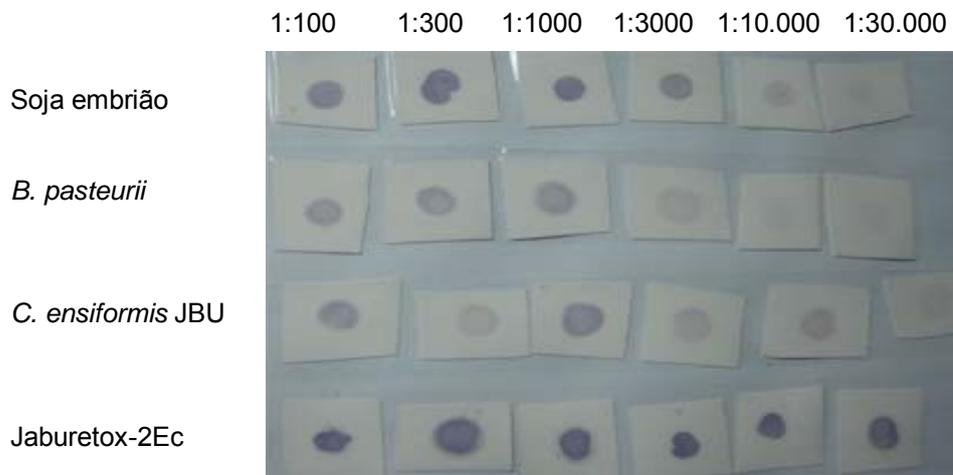
Verificou-se a presença de imunorreatividade contra os anticorpos anti-*jaburetox-2Ec* em ensaios de dot-blot e ELISA (dados não mostrados), sugerindo que o peptídeo está sendo expresso nas plantas transgênicas. Porém, não foi possível verificar com clareza a presença de bandas imunorreativas contra anticorpos anti-*jaburetox-2* em ensaios de western blot. A ausência de sinal pode ser devido à baixa massa molecular do peptídeo, que dificulta a visualização ou instabilidade do mesmo quando submetido à eletroforese, como já foi verificado para o peptídeo recombinante *jaburetox-2Ec*, quando expresso em *E. coli*, sem



**Figura 4.5. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR das plantas de tabaco transformadas, variedade SR1.** C+: controle positivo da reação. J1, J2, J3, J4 e J5: plantas transformadas com o vetor pCAMBIA2300-AMV-35Sd-*jaburetox2*-Tnos. Nt: planta não transformada. B: branco da reação (sem DNA de planta)



**Figura 4.6. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR das plantas de tabaco transformadas, variedade Xanthi com oligonucleotídeos Tnos** (amplifica a região compreendida entre o promotor e o terminador). MM: marcador molecular (pb). C+: controle positivo da reação. J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7: plantas var. Xanthi transformadas com o vetor pCAMBIA2300-AMV-35Sd-*jaburetox2*-Tnos. Nt: planta não transformada.



**Figura 4.7 Titulação do anticorpo anti-jaburetox-2Ec**, produzido em coelho contra urease de soja embrião específica (1 µg, purificado segundo Follmer *et al.*, 2004b), de *B. pasteurii* (1 µg - Sigma) e *C. ensiformis* (1 µg urease clássica –JBU Sigma) e jaburetox-2Ec recombinante (0,1 µg - Mulinari *et al.*, 2007). No alto da figura estão as diluições do anticorpo testadas para cada proteína. Anticorpo secundário: anti-IgG de coelho com fosfatase alcalina conjugada 1:10.000. Revelação: NBT/BCIP.

cauda de histidina e epitopo V-5 e também para o seu análogo, pepcanatox (Gombarovits, 1999). Além disso, pode indicar baixos níveis de expressão do peptídeo, visto que é a técnica menos sensível, dentre as utilizadas.

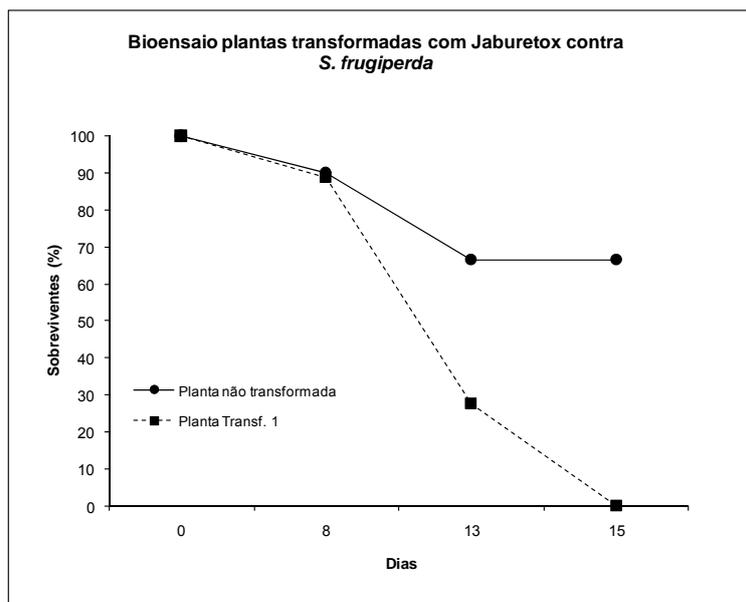
Foram realizados experimentos de toxicidade das plantas transgênicas contra *S. frugiperda*. Este inseto-modelo foi escolhido devido ao fato de ter sido suscetível ao peptídeo recombinante jaburetox-2Ec expresso em *E. coli* (Mulinari *et al.*, 2007 - capítulo 3) e por ser um inseto que se alimenta de diversos tipos de plantas, inclusive tabaco, possibilitando o ensaio direto de toxicidade, por ingestão de folhas das plantas de tabaco transformadas (De Leo *et al.*, 1998).

Foi desenvolvida uma metodologia para o bioensaio, que consiste na alimentação direta dos insetos com folhas jovens das plantas, mantidas em ágar acondicionadas em frascos contendo apenas uma lagarta, devido ao comportamento canibal das mesmas quando em condições adversas. Os

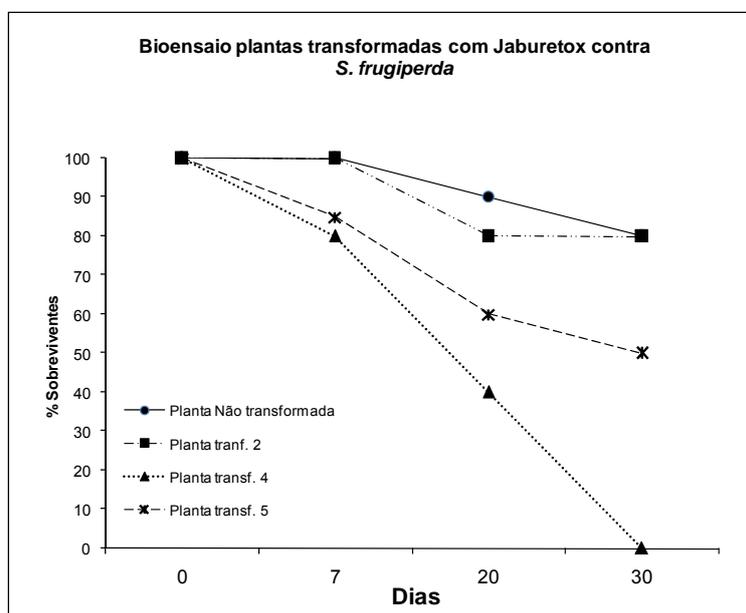
experimentos realizados com as plantas da variedade Xanthi não foram viáveis, devido à elevada toxicidade das plantas não transformadas contra o inseto-modelo, que morreram nos primeiros dias, após ingerirem pequenas porções das folhas da planta. A variedade Xanthi provavelmente expressa algum fator de resistência, que não está presente na variedade SR1, visto que os insetos se alimentaram desta última, apresentando taxa de mortalidade mais baixa (cerca de 20-30%) nas plantas controle, tornando viável o ensaio de toxicidade proposto.

As plantas transformadas com *jaburetox-2* apresentaram efeito entomotóxico nos insetos, que se mostrou variável entre as plantas analisadas. A que apresentou melhor resposta foi a planta 1, na qual a mortalidade das lagartas alcançou 100% após 15 dias de ingestão das folhas (Figura 4.8). A planta 4 também apresentou 100% de mortalidade, porém somente após 30 dias. A planta 5 apresentou 50% de mortalidade após 30 dias, quando surgiu a primeira pupa. Por outro lado, a planta 2 não apresentou toxicidade, quando comparada à planta não transformada (Figura 4.9). A diferença observada entre as plantas transformadas em relação à toxicidade contra *S. frugiperda* pode ser decorrente de diversos fatores. Diferenças nos níveis do peptídeo *jaburetox-2* nas folhas de tabaco foram observados em ELISA (dados não mostrados), que podem ser decorrentes de diferenças no número de cópias do transgene, sítios de integração, eventos de silenciamento, entre outros.

A atividade inseticida observada nas plantas de tabaco transformadas com *jaburetox-2* indica que o peptídeo foi expresso nas plantas de forma ativa e em níveis satisfatórios nas folhas, capaz de causar mortalidade das larvas alimentadas exclusivamente com folhas. Apesar de que mais experimentos sejam ainda necessários para quantificar o nível de expressão do peptídeo nas plantas transformadas, os resultados aqui relatados reforçam o seu potencial de uso biotecnológico como mais uma ferramenta para o controle de insetos. Além disso, a metodologia aqui desenvolvida mostrou-se adequada para avaliar a toxicidade de proteínas inseticidas recombinantes, diretamente pela alimentação do inseto na planta transformada, facilitando a avaliação de potenciais genes para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos.



**Figura 4.8** Ensaio de toxicidade das plantas transgênicas contra lagartas *Spodoptera frugiperda*. Os insetos foram alimentados com folhas jovens de planta transformada com jaburetox-2 (planta transf. 1) e de planta não transformada. Foram utilizados 20 insetos em cada experimento.



**Figura 4.9.** Ensaio de toxicidade das plantas transgênicas contra lagartas *S. frugiperda*. Os insetos foram alimentados com folhas jovens de plantas transformadas com jaburetox-2 (planta transf. 2, 4 e 5) e planta não transformada. Foram utilizados 20 insetos em cada experimento.

## **DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

### 3 DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de proteínas inseticidas com potencial uso biotecnológico vem crescendo, devido à possibilidade de introdução de genes para conferir resistência a insetos em plantas comerciais.

A toxicidade da canatoxina contra insetos e a caracterização da mesma como uma isoforma de urease despertou o interesse no estudo desta classe de proteínas, como possíveis proteínas inseticidas. Em leguminosas, foram descritas isoformas desta enzima: ubíqua e embrião-específica, de soja e JBU, JBURE-II e canatoxina, em feijão-de-porco. Provavelmente, as isoformas de ureases de leguminosas são produtos de uma duplicação gênica, que resultou no acúmulo das isoenzimas nas sementes. Apesar da principal função descrita para as ureases em plantas estar envolvida com a reciclagem de nitrogênio a partir de uréia (Goldraij, 2003), acumulam-se os indícios de que as mesmas podem estar envolvidas em outros processos. A ausência de anormalidades em plantas com silenciamento da urease do embrião de soja (Stebbins *et al.*, 1991) indicam que esta isoforma de urease não participa de processos ligados ao metabolismo do nitrogênio. A compartimentalização das isoformas, demonstrada pela síntese de urease embrião-específica somente durante o desenvolvimento do embrião na semente de soja em formação (Torisky & Polacco, 1990) e acúmulo de canatoxina durante o processo de maturação da semente de *C. ensiformis*, (Barcellos *et al.*, 1993), bem como a toxicidade de canatoxina (Carlini *et al.*, 1997) e urease embrião-específica de soja (Follmer *et al.*, 2004a) em insetos e fungos fitopatogênicos, indicam que a urease pode ter uma função relacionada com

mecanismos de defesa da planta, principalmente para proteção da semente, que garante a perpetuação da espécie, contra pragas e patógenos.

Estudos de caracterização das isoformas de urease em *C. ensiformis* foram conduzidos com o objetivo de auxiliar o entendimento de seu papel fisiológico, e do mecanismo de entomotoxicidade, com vistas ao seu potencial uso como bioinseticida. A urease clássica de *C. ensiformis*, a JBU, foi já bem caracterizada, sendo que sua seqüência de aminoácidos (Mamiya *et al.* 1985) e seu cDNA completo (Riddles *et al.* 1991) foram obtidos há mais de 15 anos.

Porém, outra isoforma, a canatoxina, apesar de bem caracterizada bioquimicamente (Follmer *et al.*, 2001; 2004a,b), ainda não foi totalmente seqüenciada. Durante tentativas de clonagem do cDNA codificador da proteína canatoxina, obteve-se *jbure-II* (Pires-Alves *et al.*, 2003), que codifica uma proteína predita de 78 kDa, sendo portanto, de tamanho inferior ao esperado para a canatoxina (~90 kDa). Neste trabalho (capítulo 1), clonamos o cDNA de uma isoforma de urease de *C. ensiformis*, que difere nas porções 5' (Figura 1.2 - capítulo 1) e 3' do cDNA (Figura 1.3 - capítulo 1), em relação a *jbure-II*. Esta nova seqüência foi denominada *jbure-IIB* e codifica uma proteína predita de 90 kDa. Análises das seqüências indicam que o cDNA previamente clonado (*jbure-II*) pode ser produto de um processamento alternativo do RNA.

Os eventos de processamento alternativo do RNA podem levar à produção de enzimas inativas, levando a uma redução da produção da enzima ativa. Neste caso, porém, a planta necessita de níveis muito baixos de urease para processar a uréia endógena e exógena. Assim, não é necessário um controle muito rígido dos mecanismos de processamento do RNA. De fato, em batata, aproximadamente 50% do RNA de urease das folhas e 25% das raízes são incorretamente processados (Witte *et al.*, 2005a), levando provavelmente a produção da enzima cataliticamente inativa (em relação a atividade ureásica testada). Porém, como sabemos, a atividade inseticida e fungicida das ureases independe da sua atividade ureolítica, indicando que este “relaxamento” do processamento do RNA pode estar envolvido em processos de evolução, resultando em novas funções para estas proteínas.

Estudos de caracterização dos genes, através de obtenção de clones genômicos poderão auxiliar no esclarecimento de número de genes e possíveis processamentos alternativos do RNA de ureases de *C. ensiformis*. Experimentos de Southern blot indicaram a presença de pelo menos três genes de urease em *C. ensiformis* (Pires-Alves, 2003). Desta forma, com os dados disponíveis no momento, não é possível confirmar se *jbure-IIB* codifica a enzima canatoxina ou uma terceira isoforma de urease. Para tal, estudos de seqüenciamento da canatoxina, purificada por métodos cromatográficos e digerida com enzimas proteolíticas estão sendo realizados, a fim de comparar os resultados com a seqüência predita de JBURE-IIB. Além disso, a expressão heteróloga da proteína codificada por *jbure-IIB* poderá auxiliar a resolver esta questão, visto que apesar de compartilharem muitas propriedades físico-químicas e biológicas, apenas a canatoxina comporta-se como dímero, possui toxicidade intraperitoneal em ratos e camundongos e apresenta zinco, além de níquel, na molécula (Follmer *et al.*, 2001; 2002; 2004).

Neste trabalho, alcançamos o objetivo de expressar a proteína recombinante JBURE-IIB (capítulo 2), sendo um passo importante para estudos desta proteína. Para tal, desenvolvemos um protocolo, baseado na técnica de “overlap PCR”, para sobrepor os segmentos de cDNA de *jbure-IIB*, clonados separadamente (3' RACE, 5' RACE e fragmento interno), porém, sem uso de oligonucleotídeos âncora, sendo as regiões de sobreposição pertencentes à própria seqüência do cDNA (capítulo 2). Visto que muitos cDNAs são clonados a partir de fragmentos, obtidos por técnica de 3'e 5' RACE e sendo muitos dos mesmos de difícil clonagem, devido a tamanho, níveis de expressão, instabilidade do mRNA, acreditamos que esta técnica poderá ser usada para obtenção de cDNAs completos para diversos fins, como expressão heteróloga em bactérias, como a realizada neste trabalho, bem como transformação de plantas, que está sendo realizada pelo grupo, sendo de extrema importância para futuros estudos da proteína codificada por este cDNA.

A clonagem de *jbure-IIB* completo, apresentando a seqüência codificadora dos três domínios, permitiu realizar a modelagem molecular da proteína predita (capítulo 1). Era esperado que a proteína codificada por *jbure-IIB*

apresentasse atividade ureásica, pois possui todos os resíduos de aminoácidos participantes do sítio ativo e o centro bi-metal parece estar corretamente montado. De fato, neste trabalho, em ensaios de expressão-piloto, observou-se a atividade ureásica de JBURE-IIB heteróloga em placas contendo Ni<sup>++</sup> e uréia (capítulo 2). Análises das regiões que circundam o sítio ativo mostraram, no entanto, que a proteína JBURE-IIB possui alguns resíduos diferentes daqueles que se apresentam conservados em ureases vegetais e microbianas, podendo resultar em especificidade diferenciada para o substrato ou alterações na eficiência da enzima (capítulo 1). Como discutido anteriormente, apesar do papel das ureases estar relacionado à biodisponibilidade de nitrogênio a partir de uréia, a função de algumas isoformas parece não envolver estes processos, o que diminuiria a pressão para conservar inalterados os resíduos que participam das regiões próximas ao sítio ativo.

Estudos anteriores demonstraram a atividade inseticida da canatoxina, da JBU e da urease embrião-específica de soja (Carlini *et al.*, 1997; Follmer *et al.*, 2004a; Stanisçuaski *et al.*, 2005). A toxicidade de canatoxina depende da liberação de um peptídeo, a partir da digestão parcial da proteína por enzimas tipo catepsinas do trato digestivo dos insetos. As ureases são, portanto, pró-toxinas. A ativação proteolítica no intestino de insetos, por sua vez, já foi demonstrada para outras proteínas inseticidas. As pró-toxinas Cry, produzidas pelo *Bacillus thuringiensis*, sofrem um processo de hidrólise no intestino dos insetos suscetíveis (Rukmini *et al.*, 2000), uma etapa envolvida não somente na ativação da pró-toxina como na especificidade de ação (Haider *et al.*, 1989), assim como demonstrado para as ureases vegetais. Da mesma forma, a expressão heteróloga de proteínas Cry truncadas, correspondendo à forma ativa da proteína, pode aumentar sua toxicidade (Park, 2000). É importante ressaltar que, enquanto as proteínas Cry são ativas contra insetos com digestão baseada em enzimas do tipo tripsina, a canatoxina atinge grupos de insetos insensíveis às Cry, como os hemípteros e os bruquídeos, com digestão predominantemente baseada em enzimas acídicas do tipo catepsinas. Assim, a canatoxina, bem como outras ureases, poderão ser utilizadas para co-transformação de plantas com as pró-toxinas Cry, complementando o espectro de ação das mesmas.

Para confirmar o mecanismo de ação inseticida das ureases, realizamos neste trabalho a expressão heteróloga, em células de *E. coli*, de um peptídeo denominado jaburetox-2Ec, a partir de um segmento do cDNA da urease *jbure-II*. A seqüência primária do jaburetox-2Ec, a partir de JBURE-II, corresponde à mesma região da canatoxina que gerou o pepcanatox, obtido pela hidrólise enzimática da canatoxina por enzimas do coleóptero *C. maculatus*. Porém, o peptídeo recombinante possui o epitopo V-5 e seis histidinas fusionadas no C-terminal, além de uma metionina, devido à introdução de um códon de iniciação da tradução.

A disponibilidade de quantidades adequadas de jaburetox-2Ec recombinante é de suma importância para o estudo deste peptídeo, pois vem permitindo ensaios de toxicidade em diferentes insetos, camundongos e estudos de mecanismo de ação do mesmo, como descrito no capítulo 3 desta tese e em outros trabalhos do grupo (Mulinari *et al.*, 2004a,b; Stanisçuaki *et al.*, 2005 - capítulo 3; Mulinari *et al.*, 2007 - capítulo 3, Tomazetto *et al.*, 2007 - capítulo 3, Stanisçuaski, 2007a). O escalonamento da produção em biorreator levou a uma diminuição dos custos, pois permitiu a utilização de lactose como indutor da expressão no lugar do IPTG, bem como maior rendimento em massa do peptídeo por litro de meio de cultura (Tomazetto *et al.*, 2007 - capítulo 3), disponibilizando material para diversos ensaios.

A expressão de jaburetox-2Ec em fusão com o epitopo V-5 e cauda de 6 His facilitou o processo de purificação, realizado em apenas uma cromatografia de afinidade, resultando em pureza bastante elevada, confirmada por uma única banda em SDS-PAGE (Mulinari *et al.*, 2007 – capítulo 3), bem como um único pico em análise por espectrometria de massas. A presença do epitopo e cauda de histidinas não impediram a atividade inseticida. Estudos comparativos com esse peptídeo sem as extensões fusionadas na molécula estão sendo realizados, para verificar se, e como, as partes adicionais do peptídeo recombinante contribuem para a atividade inseticida (dados não mostrados).

O jaburetox-2Ec apresentou toxicidade contra insetos com digestão dependente de enzimas do tipo catepsinas, suscetíveis à canatoxina e JBU, como *Dysdercus peruvianus*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans* (Stanisçuaski *et*

*al.*, 2005; Tomazetto *et al.*, 2007, capítulo 3), confirmando que esta região da proteína é responsável, pelo menos em parte, pela atividade inseticida. O peptídeo recombinante também foi ativo contra insetos que utilizam enzimas do tipo tripsina para o processo digestivo, como a lagarta *S. frugiperda* (Mulinari *et al.*, 2007- capítulo 3) e a barata *Blattella germanica* (Mulinari *et al.*, 2004a), demonstrando que, uma vez formado o peptídeo, este é capaz de exercer sua toxicidade também sobre insetos insensíveis à proteína completa. Esses resultados sugerem fortemente que a espécie-especificidade das ureases é determinada pela capacidade de formação do peptídeo inseticida. Quando este é administrado previamente formado, observa-se um aumento do espectro de ação inseticida do peptídeo em relação à holoproteína.

É importante ressaltar a atividade de jaburetox-2Ec contra baratas, visto que se trata de um inseto sinantrópico, isto é, que vive associado às aglomerações humanas, transmitindo doenças e causando muitos problemas e transtornos à população. Trata-se de um inseto extremamente resistente e de difícil controle, baseado até o momento em inseticidas químicos. Estes, por sua vez, são usados domesticamente, podendo causar danos à saúde das pessoas e dos animais domésticos (Praça *et al.*, 2003). Desta forma, a busca de novas alternativas para o controle destes insetos, principalmente pelo emprego de substâncias biodegradáveis como os biopesticidas, constitui uma ferramenta importante do ponto de vista técnico, econômico e ambiental. Jaburetox-2 pode representar assim, um bioinseticida doméstico alternativo aos inseticidas químicos, biodegradável e mais seguro, pois não apresentou atividade tóxica contra mamíferos (ratos e camundongos) (Mulinari *et al.*, 2007 – capítulo 3).

Contrastando com observado para a canatoxina ou JBU que somente apresentam efeito tóxico quando ingeridas por formas jovens dos insetos, a injeção de jaburetox-2Ec em adultos de *Triatoma infestans* resultou em 100% de mortalidade. O peptídeo, portanto, é capaz de causar o efeito tóxico após alcançar a hemocele dos insetos adultos. Essa observação sugere que a limitação da atividade tóxica das holoproteínas nos adultos provavelmente esteja relacionada a diferenças no processamento da proteína no trato digestório e/ou absorção do peptídeo inseticida. Ferreira-DaSilva *et al.* (2000) observaram que a

permeabilidade e/ou transporte de peptídeos derivados de imunoglobulinas de coelho através do intestino de *R. prolixus* é diferenciado entre ninfas e adultos, corroborando esta hipótese. Stanisçuaski *et al.* (2005) analisaram as principais classes de enzimas proteolíticas do trato digestório de *D. peruvianus* relatando importantes mudanças no repertório das proteinases de ninfas de 4º instar em comparação com o de insetos adultos. Mais recentemente Stanisçuaki (2007b) utilizaram substratos peptídicos fluorogênicos correspondentes aos possíveis pontos de clivagem na molécula da JBU para liberação das extremidades N- e C-terminais do peptídeo inseticida por extrato intestinal *D. peruvianus*. Homogenados de intestinos de ninfas clivam ambos os substratos peptídicos rapidamente, enquanto que o extrato dos adultos, testado nas mesmas condições, hidrolisa os substratos com velocidade muito menor. Esse dado sugere que nos adultos, a formação do peptídeo inseticida a partir da hidrólise da urease ingerida é pouco eficiente, provavelmente não atingindo concentrações suficientes para estabelecer o efeito tóxico (Stanisçuaski, 2007b).

Nas mesmas doses que se mostram tóxicas para as ninfas, não foi observada mortalidade de *D. peruvianus* adultos alimentados com sementes artificiais contendo o peptídeo recombinante. Essa observação (dados não mostrados) pode indicar que, além das variações já relatadas no padrão de enzimas digestivas e permeabilidade/transporte através do epitélio intestinal, outros fatores poderiam causar baixa absorção e/ou degradação do peptídeo, ou mesmo ausência, ou menor afinidade, dos “receptores” do peptídeo nos adultos. A ausência ou menor atividade tóxica contra formas adultas dos insetos não impede o uso de jaburetox-2 como inseticida, visto que, para muitos insetos, as formas adultas não se alimentam ou não são considerados pragas importantes, sendo as ninfas os alvos preferenciais.

A partir da ativação proteolítica, pouco se sabe sobre mecanismo de ação do peptídeo inseticida. Visando obter uma indicação de possíveis mecanismos por analogia de estrutura e atividade, foi realizada a modelagem molecular de jaburetox-2. A modelagem por comparação de seqüência não foi possível, pois parte da região correspondente ao peptídeo (porção N-terminal) está ausente nas ureases bacterianas, as únicas que possuem modelo 3D definido (capítulo 1). A

região presente nestas enzimas (C-terminal do peptídeo – em destaque na figura 1.9, capítulo 1) não pode ser comparada por homologia, pois provavelmente o peptídeo sofre um rearranjo após clivagem e liberação no meio. Assim, foi necessária a construção de modelos “*ab initio*”. Nove dos dez modelos propostos “*ab initio*” apresentaram um motivo de grampo  $\beta$  (Mulinari *et al.* 2007 – capítulo 3). Este motivo é comum tanto para uma classe de peptídeos formadores de poros em membrana (Brogden, 2005), quanto para um tipo de neurotoxinas (Menez, 1998), como a caribdotoxina, um bloqueador de canais de  $K^+$  (Garcia *et al.*, 2001).

Indicações de que o modelo proposto para a estrutura do jaburetox-2Ec deve aproximar-se da estrutura real vêm de observações experimentais, como o fato de que após a ingestão do peptídeo, os insetos ficam momentaneamente paralisados e apresentam movimentos desordenados das antenas, indicando um efeito neurotóxico (Mulinari *et al.*, 2007 - capítulo 3). É interessante mencionar também que estudos de espalhamento de luz mostraram que o jaburetox-2Ec apresenta polimerização pH-dependente, com transição para um estado oligomérico na faixa de pH entre 5,0 e 6,0, justamente o pH do meio intestinal dos insetos susceptíveis, onde o peptídeo estaria sendo liberado por proteólise limitada da urease (Moro, 2007). Da mesma forma, estudos com peptídeos derivados de proteína Cry com atividade inseticida baseada na formação de poros em membranas demonstram uma diminuição da atividade de formação de poros quando pré-incubados em pH 7,5, sendo sua atividade aumentada em pH 10,5 (Vachon *et al.*, 2004) ou seja, o mesmo pH encontrado no intestino dos insetos susceptíveis às toxinas Cry. Além disso, sabe-se que os fragmentos das toxinas Cry ativadas interagem entre si para desencadear sua atividade tóxica (Rang *et al.*, 2001), indicando que a oligomerização observada para o jaburetox-2 pode estar envolvida no processo de toxicidade. De fato, dados preliminares com lipossomos sugerem que o jaburetox-2Ec afeta a permeabilidade da membrana, provavelmente inserindo-se nela (C. Follmer, comunicação pessoal).

Ainda tratando do mecanismo de ação inseticida, Carlini *et al.* (1997), observaram preliminarmente um retardo na perda de peso pós-prandial em *R. prolixus* após a alimentação com ureases, sugestivo de uma possível alteração no sistema excretório. Recentemente, Stanisçuaski *et al.* (2007b) demonstraram em

túbulos de Malpighi isolados de *R. prolixus*, que jaburetox-2Ec altera o potencial transepitelial, provavelmente desacoplando uma H<sup>+</sup>-ATPase presente na membrana dos túbulos. O conseqüente desequilíbrio causado no transporte iônico inibe a secreção de fluídos, sendo que cGMP é um segundo mensageiro da ação antiurética do jaburetox-2Ec. Assim, a modelagem molecular, apesar de não produzir um modelo definitivo do mecanismo de ação, certamente vem auxiliando no direcionamento destes estudos.

Jaburetox-2Ec não apresentou atividade fungicida e/ou fungistática (dados não mostrados), demonstrando que a região responsável pela atividade contra fungos nas ureases é diferente da relacionada à atividade inseticida. Da mesma forma, o peptídeo não apresentou toxicidade intraperitoneal em ratos e camundongos, como observado para canatoxina (Mulinari *et al.*, 2007 – capítulo 3). Estes dados demonstram que as ureases são proteínas compostas por domínios múltiplos, cada qual relacionado a determinadas atividades observadas para as mesmas. Por outro lado, indicam que o mecanismo de ação do peptídeo deve estar relacionado a características presentes em insetos, mas provavelmente ausentes ou diferenciadas em fungos e mamíferos, em relação a possíveis receptores ou mecanismo de inserção em membranas. Este fato é de extrema importância, pois implica em biossegurança, no caso de consumo humano e animal.

Por fim, a transformação de plantas de tabaco com *jaburetox-2* e a toxicidade das transformantes contra larvas de *S. frugiperda* confirmam a atividade deste peptídeo quando expresso em plantas, nas concentrações e condições obtidas neste método, como possíveis processamentos e modificações pós-traducionais, demonstrando a possibilidade de utilização deste peptídeo para transformação de plantas comerciais, visando resistência a insetos.

A lagarta *S. frugiperda* (lagarta-do-cartucho) é uma praga de distribuição mundial, de grande importância econômica. Esta lagarta apresenta um comportamento alimentar polífago, que inclui o consumo de diferentes espécies de plantas cultivadas, como milho (*Zea mays* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.), entre outras. Seu controle, atualmente, é baseado em uso de inseticidas químicos (Monnerat *et al.*, 2006). A atividade inseticida de

jaburetox-2 contra esses insetos foi observada para jaburetox-2Ec, expresso em *E. coli* (Mulinari *et al.*, 2007 - capítulo 3) e jaburetox-2, expresso em tabaco (capítulo 4), demonstrando o potencial uso deste peptídeo no controle deste inseto-praga.

Além disso, o peptídeo jaburetox-2Ec mostrou-se tóxico a outros insetos-pragas como *D. peruvianus* (percevejo manchador da maçã de algodoeiro), que ataca as maçãs do algodoeiro em busca das sementes para se alimentar. As excretas do inseto são avermelhadas, manchando as fibras de pardo-amarelo, resultando em perda da qualidade do algodão. Este inseto pode ser vetor de bactérias e fungos fitopatogênicos, resultando em perdas nas plantações de algodão (Gallo *et al.*, 1988). As fêmeas geralmente depositam seus ovos no solo, em cavidades rasas, sob folhas caídas, mas com frequência depositam também dentro das maçãs. As ninfas, ao saírem dos ovos, ficam agrupadas, picando ou chupando a seiva na base do talo da planta ou alimentando-se dentro das maçãs, onde permanecem até o terceiro estágio, quando começam a se dispersar subindo pela planta. Esse comportamento dificulta a ação de inseticidas, principalmente os que agem por contato, sendo a transgenia de plantas uma alternativa no controle deste inseto.

O uso de plantas transgênicas resistentes a insetos faz parte de um conjunto de esforços visando diminuir o impacto ambiental causado pela agricultura, uma vez que necessitam de um número menor de aplicações de inseticidas. Esta característica contribui para diminuir a contaminação de solo e da água causada pela extensa aplicação de agrotóxicos, além de reduzir o consumo de combustíveis em máquinas agrícolas usados na aplicação dos mesmos. Um exemplo são alguns inseticidas de amplo espectro de ação ainda utilizados, como os organofosforados, que causam um grande impacto na saúde humana e animal, além do impacto ambiental (Calvert *et al.*, 2001). O peptídeo jaburetox-2 poderá ser utilizado como uma alternativa ao uso de organofosforados, principalmente para controle de percevejos e não apresentou efeitos tóxicos quando ingerido por camundongos e ratos neonatos (Mulinari *et al.*, 2007 –capítulo 3).

Além disso, a produção mundial de transgênicos vem crescendo ano após ano (James, 2007), indicando um aumento da aceitação destes produtos, evidenciando suas vantagens no mercado agrícola e a possibilidade de introdução de outros eventos de transgenia.

O Brasil, apesar de ocupar o posto de terceiro maior produtor mundial de plantas transgênicas (James, 2007), apresenta plantio de apenas dois tipos de plantas geneticamente modificadas, sendo que apenas uma delas é de uma variedade resistente a insetos. O plantio de algodão-Bt (Bollgard<sup>®</sup>- com gene codificante de proteína Cry de *Bacillus thuringiensis*) foi introduzido apenas em 2006 e atingiu uma área de 500.000 hectares em 2007 (James, 2007). A maior contribuição na produção de transgênicos no país constitui-se de soja resistente ao herbicida glifosato, a soja RR<sup>®</sup> (Roundup Ready), cuja área plantada foi de 15,0 milhões de hectares. Neste ano espera-se um crescimento, tanto da área plantada de transgênicos, quanto do número de eventos, devido à introdução do milho transgênico (toxina Cry + resistência a herbicida – Liberty Link<sup>®</sup> glufosinato de amônio), cujo plantio foi recentemente liberado no país (James, 2007).

As plantas geneticamente modificadas visando resistência a insetos também auxiliam na diminuição das perdas agrícolas pelo ataque de pragas e conseqüente aumento da produtividade. Este fator é importante, pois a demanda por alimentos vem crescendo, impulsionado pelo crescimento populacional e consumo mundial. Além disso, devido ao aumento do preço de combustíveis fósseis e a iminência de uma crise energética mundial, o plantio de produtos agrícolas destinados à produção de biocombustíveis vem aumentando, concorrendo com áreas de plantio e produtos até então destinadas à alimentação. Visto que a expansão das áreas de cultivo é uma estratégia limitada e vem trazendo grandes prejuízos ao meio ambiente, o aumento da produtividade e a diminuição das perdas são as estratégias mais visadas atualmente, nas quais as plantas transgênicas resistentes a insetos podem trazer grandes contribuições.

Espera-se que, no futuro, plantas transgênicas expressando o peptídeo jaburetox, apresentando elevada resistência a vários insetos, possam representar uma alternativa para o controle de pragas, contribuindo assim para o aumento da produtividade das culturas e diminuição do uso dos agrotóxicos.

## **REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS**

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul S.F., Warren Gish W.M., Myers E.W. & Lipman, D. J.(1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

Andrews R.K., Blakeley R.L. & Zerner B. (1984). Urea and urease. *Adv. Inorg. Biochem.* 6: 245–283.

Bacanamwo M., Witte C.P., Lubbers M.W & Polacco J.C. (2002). Activation of the urease of *Schizosaccharomyces pombe* by the UreF accessory protein from soybean. *Mol. Genet. Genom.* 268: 525–534.

Barcellos G.B.S., Almeida L.M., Moreira R.A., Cavada B.S., Oliveira J.T.A. & Carlini C.R. (1993) Canatoxin, concanavalin A- and canavalin-cross-reactive materials during maturation of *Canavalia brasiliensis* (Mart.) seeds. *Planta* 189: 397-402.

Barja-Fidalgo T.C., Guimarães J.A. & Carlini C.R. (1991) Lipoxygenase-mediated secretory effects of canatoxin, a toxic protein form *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon* 29: 453-459.

Becker-Ritt A.B., Martinelli A.H.S., Mitidieri S., Feder V., Wassermann G.E., Santi L., Vainstein M.H., Oliveira J.T.A., Fiúza L.M., Pasquali G. & Carlini C.R. (2007) Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon* 50: 971–983

Bennett J. & Wren E.A. (1977) The interaction of p-nitrophenyl carbamate with urease. *Biochim. Biophys. Acta.* 482: 421-426.

Bhanti M. & Taneja A. (2007) Contamination of vegetables of different seasons with organophosphorous pesticides and related health risk assessment in northern India. *Chemosphere* 69: 163-68.

Brasileiro A.C.M & Carneiro V.T.C. (1998). Manual de transformação genética de plantas. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília, Brasil.

Brodzik R., Koprowski H., Yusibov V., Sirko A. (2000) Production of urease from *Helicobacter pylori* in transgenic tobacco plants. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 5: 357–366.

Brogden K.A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238–50.

Campos F.A.P., Xavier-Filho J., Silva C.P. & Ary M.B. (1989) Resolution and partial characterization of proteinases and  $\alpha$ -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 92: 51-57.

Calvert G.M., Sanderson W.T., Barnett M., Blondell J.M. & Melher L.N. (2001) Surveillance of pesticide-related illness and injury in humans. In: R. Krieger, J. Doull, D. Ecobichon, E. Hodgson, L. Reiter and J. Ross, Editors, Handbook of Pesticide Toxicology (second ed.), Academic Press, New York, NY (2001), pp. 603–641.

Cao J, Ibrahim H., Garcia J., Mason H., Granados R. & Earle E. (2002) Transgenic tobacco plants carrying a baculovirus enhancin gene slow the development and increase the mortality of *Trichoplusia ni* larvae. *Plant Cell Rep.* 21: 244–250.

Carlini C.R & Guimarães J.A. (1991) Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon* 29: 791-806.

Carlini C.R. & Guimarães J.A. (1981) Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon* 19: 667-676.

Carlini C.R., Barcellos G.B.S., Baeta-Neves A.D.V. & Guimarães J.A. (1988) Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin A among proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 27: 25-30.

Carlini C.R., Oliveira A.E., Azambuja P., Xavier-Filho J. & Wells M.A. (1997) Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. *J. Econ. Entomol.* 90: 340-348.

Carlini C.R. & Grossi-de-Sá M.F. (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40: 1515-1539.

Carlini C.R., Gomes C.B. & Guimarães J.A. (1984) Central nervous effects of the convulsant-protein canatoxin. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 54: 161-166.

Carlini C.R., Guimarães J.A. & Ribeiro J.M.C. (1985) Platelet aggregation and release reaction induced by CNTX, a convulsant protein: evidences for involvement of the platelet lipooxygenase pathway. *Br. J. Pharmacol.* 84: 551-560.

Chen K.C., Lin C.Y., Kuan C.C., Sung H.Y., Chen C.S. (2002) A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7258–7263.

Ciurli S., Benini S., Rypniewski R.W., Wilson K.W., Miletti S. & Mangani S. (1999) Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms. *Coord. Chem. Rev.* 190: 331–355

Das N., Kayastha A.M. & Srivastava P.K. (2002) Purification and characterization of urease from dehusked pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) seeds. *Phytochemistry* 61: 513-521.

Davis C.A., Riddell D.C., Higgins M.J., Holden J.J.A. & White B.N. (1985) A gene family in *Drosophila melanogaster* coding for trypsin-like enzymes. *Nucl. Acid. Res.* 13: 6605-6619.

De Leo F., Bonade-Bottino M.A., Ceci L.R., Gallerani R., Jouanin L. (1998) Opposite effects on *spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. *Plant Physiol.* 118: 997-1004.

Estruch J.J., Carozzi N.B., Desai N., Duck N.B., Warren G.W. & Koziel M.G. (1997) Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nat Biotechnol* 15: 137-141.

Ferreira-DaSilva C.T. Efeitos da CNTX e peptídeos derivados sobre diferentes insetos: uma proposta de bioinseticida. (2002) Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Ferreira-DaSilva C.T., Gombarovits M.E., Masuda H., Oliveira C.M. & Carlini C.R. (2000) Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 44: 162-171.

Fiorentini S., Matczak E., Gallo R.C., Reitz M.S., Keydar I., Watkins B.A. (1997) Humanization of an antibody recognizing a breast cancer specific epitope by CDR-grafting. *Immunotech.* 3: 45-59.

Fischbein W.N. (1969) The structural basis of the catalytic complexity of urease: interactions and interconvertible molecular species (with a note on isozyme classes). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 147: 857-881.

Follmer C., Barcellos G.B.S., Zingali R.B., Machado O.L., Alves E.W., Barja-Fidalgo C., Guimaraes J.A. & Carlini, C.R. (2001) Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem. J.* 360: 217-224.

Follmer C., Real-Guerra R., Wasserman G.E., Olivera-Severo D. & Carlini, C.R. (2004a) Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur. J. Biochem.* 271: 1357-1363.

Follmer C., Wassermann G.E. & Carlini C.R., (2004b). Separation of Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Sci.* 167: 241–246.

Fosket D.E. (1994). In: “Plant Growth and Development: A Molecular Approach”. Academic Press, London, pp. 432-454.

Freyermuth S.K., Bacanamwo M. & Polacco J.C. (2000) The soybean Eu3 gene encodes a Ni-binding protein necessary for urease activity. *Plant J.* 21: 53–60.

Frutos R., Rang C. & Royer M. (1999) Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Crit. Rev. Biotech.* 19: 227-276.

Gallo D., Nakano O., Silveira-Neto S., Carvalho R.P.L., Batist G.C., Berti-Filho E., Parra J.R.P., Zuchini R.A., Alves S.B. & Vendramin J.D. (1988) *Manual de Entomologia Agrícola*. Ed. Ceres, São Paulo, 486.

Garcia M.L, Gao Y.D., McManus O.B., Kaczorowski G.J. (2001) Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon* 39: 739-748

Gatehouse A.M.R., Boulter D. & Hilder, V.A. (1992) Potential of Plant-derived

Genes in the Genetic Manipulation of Crops for Insect Resistance. In: *Biotechnology in Agriculture, Plant Gen Man Crop Protect*, CAB International, 7: 155-181

Ghazaleh F.A., Francischetti I.M.B., Gombarovitz M.E.C. & Carlini C.R. (1997) Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin: methoxy-verapamil inhibition and downregulation by cGMP. *Arch Biochem. Biophys.* 339: 362-367.

Goel A. & Aggarwal P. Pesticide poisoning. (2007) *Natl Med J India.* 20:182-191.

Goldraij A. & Polacco J.C. (1999) Arginase is inoperative in developing soy-bean embryos. *Plant Physiol.* 119: 297–303.

Goldraij A., Beamer L.J. & Polacco J.C. (2003) Interallelic complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean. *Plant Physiol.* 132: 1801-1810.

Gombarovitz M.C. (1999) Peptídeos Entomotóxicos gerados a partir da CNTX: obtenção, isolamento, propriedades biológicas e caracterização físico-química. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

Gooding R.H., Chung A.C. & Rolseth B.M. (1973) The digestive processes of haematophagous possible functions of the oesophageal diverticula of mosquitoes (Diptera). *Can. Entomol.* 105: 433-436.

Ha N.C., Oh S.T., Sung J.Y., Cha K.A., Lee M.H. & Oh B.H. (2001) Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat. Struct. Biol.* 505–509.

Haider M.Z., Smith G.P. & Ellar D.J. (1989) Delineation of the toxin coding fragments and an insect-specificity region of a dual toxicity *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 49: 157-163.

Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis . *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

Haq S.K., Atif S.M. & Khan R.H. (2004) Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch. Biochem. Biophys.* 431: 145–159.

Hayakawa T., Shimojo E., Mori M., Kaido M., Furusawa I., Miyata S., Sano Y., Matsumoto T., Hashimoto Y. & Granados R.R. (2000) Enhancement of baculovirus infection in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus or *Nicotiana tabacum* engineered with a granulovirus enhancin gene. *Appl. Entomol. Zool.* 35: 163–170.

Hilder V.A. & Boulter D. (1999) Genetic engineering of crop plants for insect resistance- a critical review. *Crop. Protection* 18: 177-191.

Holm L. & Sander C. (1997) An evolutionary treasure: unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 28: 72–82.

Jabri E., Carr M.B., Hausinger R.P. & Karplus P.A. (1995) The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science* 268: 998-1004.

James C. (2007) Global status of Commercialized biotech/GM Crops: 2007 ISAAA Brief No. 37. ISAAA: Ithaca, NY.

Khush G. S. (1999) Green revolution preparing for the 21st century. *Genome* 42: 646-655.

Kim T.G., Kim H.M., Lee H.J., Shin Y.J., Kwon T.H., Lee N.J., Jang Y.S., Yang M.S. (2007) Reduced protease activity in transformed rice cell suspension cultures expressing a proteinase inhibitor. *Protein Expr. Purif.* 53: 270-274.

Krogmeier M.J., McCarty G.W. & Bremmer J.M. (1989) Phytotoxicity of foliar-applied urea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 8189-8191.

Kuchar J. & Hausinger R.P. (2004) Biosynthesis of metal sites. *Chem. Rev.* 104: 509–525.

Kumar S., Tamura K. & Nei M. (2004) MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Brief. Bioinform.* 5: 150-163.

Lam H.M., Coschigano K.T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R. & Coruzzi G.M. (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 569–593.

Lay F.T. & Anderson M.A. (2005) Defensins—components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept.* 6: 85–101.

Lea P.J., Hughes J.S. & Minchin B.J. (1979) Glutamine-dependent and asparagine-dependent protein synthesis in maturing legume cotyledons cultured in vitro. *J. Exp. Bot.* 30: 437–529.

Mamiya G., Takishima K., Masakuni M., Kayumi T., Ogawa K. & Sekita T. (1985) Complete amino acid sequence of jack bean urease. *Proc. Japan Acad.* 61: 395-398.

Martin P.R. & Hausinger R.P. (1992) Site-directed mutagenesis of the active site cysteine in *Klebsiella aerogenes* urease. *J. Biol. Chem.* 267: 20024-20027.

McGee D.J., May C.A., Garner R.M., Himpf J.M. & Mobley H.L.T. (1999) Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. *J. Bacteriol.* 181: 2477-2484.

Menez A. (1998) Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? *Toxicon* 36: 1557–72.

Miller J.W., Kramer K.J. & Law J.H. (1974) Isolation and partial characterization of the larval midgut trypsin from the tobacco hornworm, *Manduca Sexta*, Johanson (Lepidoptera: Sphingidae) *Comp. Bioch. Physiol.* 48: 117-129.

Mobley H.L. & Hausinger R.P. (1989) Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol. Rev.* 53: 85-108.

Mobley H.L., Island M.D. & Hausinger R.P. (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59: 451-480.

Mohan-Babu R., Sajeena A., Seetharaman K. & Reddy M.S. (2003) Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management – an over view. *Crop Prot.* 22: 1071-1086.

Monnerat R., Martins E., Queiroz P., Ordúz S., Jaramillo G., Benintende G., Cozzi J., Real D.M., Martinez-Ramirez A., Rausell C., Céron J., Ibarra J.E., Rincon-Castro C., Espinoza A.M., Meza-Basso L., Cabrera L., Sánchez J., Soberon M., Bravo A. (2006) Genetic Variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) Populations from Latin America Is Associated with Variations in Susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins. *Appl. Environ. Microb.* 72: 7029–7035.

Moro C.F. (2007) Análise do efeito de variáveis químicas na agregação do peptídeo inseticida derivado da urease de Jack bean (*Canavalia ensiformis*) por espectroscopia de espalhamento de luz. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Mulrooney S.B. & Hausinger R.P. (1990) Sequence of the *Klebsiella aerogenes* urease genes and evidence for accessory proteins facilitating nickel incorporation. *J Bacteriol.* 172: 5837-43.

Mulinari F. (2004a). Jaburetox-2Ec: um peptídeo recombinante derivado de urease de *Canavalia ensiformis* com potencial bioinseticida. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Mulinari F., Pires-Alves M., Moraes M.G., Kurtenbach E., Carlini C.R. & Grossi-de-Sá M.F. (2004b). Toxina praguicida, construção gênica e método de controle de pragas. Privilégio de invenção. INPI-RS 0001120, depósito 08 de abril de 2004.

Mulinari F., Stanisçuaski F., Vargas L.R., Postal M., Oliveira-Neto O.B., Ridgen D., Grossi-de-Sá M.F. & Carlini, C.R. (2007) Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides* 28: 2042 – 2050.

Naested H., Kramhøft B., Lok F., Bojsen K., Yu S., Svensson B. (2006) Production of enzymatically active recombinant full-length barley high pl alpha-glucosidase of glycoside family 31 by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris* and affinity purification. *Protein Expr. Purif.* 46: 56-63

Nagano N., Orengo C.A. & Thornton J.M. (2002) One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J. Mol. Biol.* 321: 741–765.

Oliveira A.E.A., Gomes V.M., Sales M.P., Fernandes K.V.S., Carlini C.R. & Xavier-Filho J. (1999) The toxicity of jack bean *Canavalia ensiformis*(L.) DC. canatoxin to plant pathogenic fungi. *Ver. Brasil. Biologia.* 59: 59–62.

Olivera-Severo D., Wassermann G.E. & Carlini C.R. (2006) *Bacillus pasteurii* urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. *Arch. Biochem. Biophys.* 452:149-155.

Park I.S. & Hausinger R.P. (1993) Site-directed mutagenesis of *Klebsiella aerogenes* urease: identification of histidine residues that appear to function in nickel ligation, substrate binding, and catalysis. *Protein Sci.* 2: 1034-1041.

Park I.S. & Hausinger R.P. (1996) Metal ion interaction with urease and UreD-urease apoproteins. *Biochemistry* 35: 5345–5352.

Pearson M.A., Michel L.O., Hausinger R.P. & Karplus P.A. (1997) Structures of Cys319 variants and acetohydroxamate-inhibited *Klebsiella aerogenes* urease. *Biochemistry.* 36: 8164-8172.

Pearson M.A., Park I.S., Schaller R.A., Michel L.O., Karplus P.A. & Hausinger R.P. (2000) Kinetic and structural characterization of urease active site variants. *Biochemistry.* 39: 8575-8584.

Pires-Alves M., Grossi-de-Sá M.F., Barcellos G.B., Carlini C.R. & Moraes M.G. (2003) Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. *Plant Cell Physiol.* 44: 139-145.

Polacco J.C. & Holland M.A. (1993) Roles of urease in plant cells. *Intern. Rev. Citol.* 145: 56-103.

Polacco J.C. & Winkler R.G. (1984) Soybean leaf urease: A seed enzyme? *Plant Physiol.* 74: 800-803.

Praça L.B., Batista A.C., Martins E.S. & Monnerat R.G. Identificação e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra Lepidópteros,

Dípteros e Coleópteros. Em: 8o Simpósio de Controle Biológico, 2003. São Pedro, SP. Livro de Resumos p. 95, 2003.

Rang, C., Vachon V., Coux F., Carret C., Moar W. J, Brousseau R., Schwartz J.-L., Laprade R., & Frutos R. (2001). Exchange of domain I from *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins influences protoxin stability and crystal formation. *Curr. Microbiol.* 43:1–6.

Riddles P.W., Whan V., Blakeley R.L. & Zerner B. (1991) Cloning and sequencing of a jack bean urease-encoding cDNA. *Gene.* 108(2): 265-267. Erratum in: *Gene.* 1992 121: 399-400.

Romeis J., Meissle M. & Bigler F. (2006) Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nat Biotechnol.* 24: 63-71.

Rukmini V., Reddy C.Y. & Venkateswerlu G. (2000) *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie.* 82: 109-116.

Saitou N. & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

Schwede T., Kopp J., Guex N. & Peitsch M.C. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31: 3381-3385.

Sharma H.C. & Ortiz R. (2002) Host plant resistance to insects: an eco-friendly approach for pest management and environment conservation. *J. Environ. Biol.* 23: 111-135.

Shen Y.J., Pan W., Xu R., Pan X., Wang L.C., Wang Z., Cao F., Tan J.W., Wu J.S., Wu F., Liu Y.J. (2004) Construction of combined site-directed random

mutation libraries of recombinant human lymphotoxin. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 20: 43-48.

Sirko A. & Brodzik R. (2000) Plant ureases: roles and regulation. *Act. Biochim. Pol.* 47: 1189-1195.

Soriano A. & Hausinger R.P. (1999) GTP-dependent activation of urease apoprotein in complex with the UreD, UreF, and UreG accessory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11140–11144.

Stanisçuaski F., Ferreira-DaSilva C.T., Mulinari F., Pires-Alves M. & Carlini C.R. (2005) Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45: 753–760.

Stanisçuaski F. (2007a). Ureases de *Canavalia ensiformis*: processamento e mecanismo de ação em insetos. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, porto Alegre, RS, Brasil.

Stanisçuaski F., Te Brugge V., Carlini C.R. & Orchard I. (2007b). Effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. Abstract. *Comparative Biochemistry and Physiology. A-Molecular and integrative Physiology* 148: S131-S131. Supplement: 1 (August)

Stebbins N.E., Holland M.A., Cianzio S.R. & Polacco J.C. (1991) Genetic tests of the roles of the embryonic ureases of soybean. *Plant Physiol.* 97: 1004–1010.

Stebbins N.E. & Polacco J.C. (1995). Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiol.* 109: 169–175.

Sumner J. B. (1926) The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.* 69: 435-441.

Terra W.R. & Ferreira C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109: 1-62.

Terra W.R., Ferreira C. & Garcia E.S. (1988) Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochem.* 18: 423-434.

Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

Thompson J.F., Madison J.T., Muenster A.E. (1977) In vitro culture of immature cotyledons of soya bean ( *Glycine max* L. Merr). *Ann. Bot.* 41: 29–39.

Tomazetto G., Mulinari F., Staniscuaski F., Settembrini B.P., Carlini C.R. & Ayub, M.A.Z. (2007) Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme Microb. Technol.* 41: 821 – 827.

Toriski R.S., Griffin J.D., Yenofsky R.L. & Polacco J.C. (1994) A single gene (*Eu4*) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. *Mol. Gen. Genet.* 242: 404-414.

Torisky R.S. & Polacco J.C. (1990) Soybean roots retain the seed urease isozyme synthesized during embryo development. *Plant Physiol.* 94: 681-689.

Vandenbussche F., Peumans W.J., Desmyter S., Proost P., Ciani M. & Van Damme E.J. (2004) The type-1 and type-2 ribosome-inactivating proteins from *Iris* confer transgenic tobacco plants local but not systemic protection against viruses. *Planta* 220: 211-21.

Wang J.H. & Tarr D.A. (1955) On the mechanism of the urease action. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 6205-6206.

Witte C.P., Isidore E., Tiller S.A., Davies H.V. & Taylor M.A. (2001) Functional characterisation of urease accessory protein G (ureG) from potato. *Plant Mol. Biol.* 45: 169–179.

Witte C.P., Tiller S., Isidore E., Davies H.V. & Taylor M.A. (2005a) Analysis of two alleles of the urease gene from potato: polymorphisms, expression, and extensive alternative splicing of the corresponding mRNA. *J. Exp. Bot.* 56: 91–99.

Witte C.P., Rosso M.G. & Romeis T. (2005b) Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139: 1155–1162.

Witte C.P., Tiller S.A., Taylor M.A. & Davies H.V. (2002) Leaf urea metabolism in potato. Urease activity profile and patterns of recovery and distribution of (15)N after foliar urea application in wild-type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiol.* 128: 1129-1136.

Yamaguchi K., Coper N.J., Stalhandske C., Scott R.A., Pearson M.A., Karplus A. & Hausinger R.P. (1999) Characterization of metalsubstituted *Klebsiella aerogenes* urease. *J. Biol. Inorg. Chem.* 4: 468– 477.

Zerner, B. (1991) Recent advances in the chemistry of an old enzyme, Urease. *Bioorg. Chem.* 19: 116-131.

## **ANEXOS**

## Anexo 1

### **PROTOCOLOS GERAIS**

## **A. Purificação de DNA a partir de gel de agarose**

A purificação de DNA a partir de gel de agarose foi realizada utilizando o Kit GenClean (Bio 101).

1. Pesar o gel e adicionar 4,5 vezes a sua massa em volume de iodeto de sódio 6 M (900  $\mu$ L).
2. Dissolver a agarose em banho-maria a 55° C durante 30 min.
3. Adicionar 10  $\mu$ L do reagente “Glassmilk”, composto por partículas de sílica e incubar a mistura em agitação lenta por 40 min em agitador orbital.
4. Centrifugar (1 min a 10.000 rpm) e descartar o sobrenadante.
5. Lavar o precipitado três vezes, através de suspensão com 700  $\mu$ L do reagente New Wash, contendo Tris, NaCl, EDTA e álcool, e centrifugar (1 min a 14.000 rpm).
6. Ressuspender o sedimento lentamente em 20  $\mu$ L de água e incubar em banho-maria a 60° C por 5 min.
7. Coletar o sobrenadante, contendo o DNA purificado, em novo tubo e quantificar por espectrofotometria.

## **B. Transformação de *E. coli* para obtenção de massa de plasmídeos**

1. Dialisar o DNA contra água Milli-Q por 2 h e concentrar a vácuo.
2. Eletroporar células competentes de *Escherichia coli*, linhagem XL1-blue, utilizando o equipamento BioRad Gene Pulser™, em cubetas de 0,1 cm, com um pulso de 1,8 V; 200  $\Omega$  e 25  $\mu$ F.
3. Semear as bactérias transformadas em placas de Petri contendo meio LB-ágar e o antibiótico de seleção.

### C. Extração de DNA plasmidial

1. Escolher colônias isoladas positivas (resistentes) e inocular em 5 mL de meio LB-canamicina 100 µg/ml
2. Crescer a 16 h a 37° C sob agitação a 200 rpm.
3. Centrifugar as células a 6000 rpm por 2 min e desprezar o sobrenadante.
4. Ressuspender o sedimento em 300 µL de tampão Tris HCl 50 mM pH 8.0, contendo EDTA 10 mM e RNase A 100 µg/µL.
5. Adicionar 300 µL de tampão de lise (NaOH 200 mM e SDS 1%) ao tubo, revertendo 5 a 10 vezes para homogeneização.
6. Adicionar 300 µL de tampão de neutralização (Acetato de potássio 3,0 M, pH 5,5) e após 30 min no gelo, centrifugar o material a 10.000 rpm durante 30 min.
7. Recolher o sobrenadante em novo tubo (aproximadamente 900 µL) a acrescentar 600 µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico em proporção 24:1 v/v).
8. Agitar vigorosamente em agitador para tubos durante 1 min e a seguir, centrifugar a 10.000 rpm por 5 min.
9. Recolher o sobrenadante em novo tubo (700-800 µL), adicionar 700 µL de clorofil, seguido de agitação e centrifugação como citado.
10. Coletar o sobrenadante e acrescentar a este igual volume de isopropanol gelado (-20° C, aproximadamente 700 µL) para precipitação do DNA plasmidial.
11. Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 min em centrífuga Eppendorf refrigerada a 4° C.
12. Descartado o sobrenadante, lavar o precipitado com 500 µL de etanol 70% (v/v) gelado.
13. Centrifugar e descartar o sobrenadante
14. Secar o sedimento a temperatura ambiente e ressuspender em 30 µL de água.

#### **D. Preparo de células competentes de *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) para choque térmico**

1. Preparar uma cultura de células e meio sólido YEB ou LB contendo rifampicina 100 µg/ml e gentamicina 50µg/ml. Crescer a 28°C por 2 a 3 dias.
2. Preparar pré-inóculo: coletar 1 colônia isolada da placa e transferir para 3 ml de YEB rifampicina 100 µg/ml e gentamicina 50µg/ml. Incubar a 28°C por 12 a 16 h sob agitação 150 rpm.
3. Transferir 2 ml do pré-inóculo para 50 ml de YEB rifampicina 100 µg/ml e gentamicina 50µg/ml em erlenmeyer de 250 ml. Incubar a 28°C sob agitação 150 rpm até atingir OD 600 de 0,5 a 1 (aprox. 12 a 16 h).
4. Incubar no gelo por 15 min.
5. Centrifugar 5000 g 5 min a 4°C. Descartar o sobrenadante e ressuspender delicadamente em 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 20 mM a 4°C contendo glicerol 10%. Distribuir em alíquotas de 100 µl, congelar rapidamente em N<sub>2</sub> líquido e guardar a -80°C.

#### **E. Extração de DNA de plantas**

1. Macerar um disco foliar (folha do tamanho de uma tampa do tubo eppendorf) com bastão de vidro em um tubo de microcentrifuga em N<sub>2</sub> líquido e adicionar 400 µl de tampão EB-CTAB.
2. Incubar a 60 °C por 20 min.
3. Adicionar 400 µl de clorofórmio e agitar manualmente
4. Centrifugar a 14.000 rpm 5 min.
5. Retirar 200 µl da fase aquosa (superior) e transferir para novo tubo.
6. Adicionar 200 µl de isopropanol e centrifugar a 14.000 rpm 5 min
7. Descartar o sobrenadante.
8. Lavar o precipitado com 200 µl de etanol 70% e centrifugar a 14.000 rpm 5 min
9. Descartar o sobrenadante e secar o precipitado.
10. Ressuspender em 20 µl de água estéril ou TE (com RNase)

## **F. Meios de cultura**

### **Meio LB**

1. Dissolver 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl em 950 ml de água destilada.
2. Ajustar o pH para 7,0 com NaOH e ajustar o volume para 1 L.
3. Autoclavar por 20 min. Esperar esfriar até atingir a temperatura de ~55 °C e adicionar o antibiótico.
4. Guardar em temperatura ambiente ou a 4°C.

### **Meio LB-ágar**

Preparar o meio LB como descrito nos itens 1 e 2 e adicionar 15 g de agar. Autoclavar por 20 min e após esfriar e atingir a temperatura de ~55 °C, adicionar o antibiótico e colocar nas placas de petri, previamente esterilizadas.

### **Meio YEB**

Dissolver os seguintes reagentes em 900 ml de água destilada:

Extrato de carne 5g

Extrato de levedura 1g

Peptona 5g

Sacarose 5g

MgSO<sub>4</sub> 240 mg

Completar o volume com água estéril q.s.p. 1000 mL e ajustar o pH para 6,8 com NaOH 0,1 N. Esterilizar o meio em autoclave durante 20 min a 121°C.

Para meio sólido, adicionar 1,6% de ágar (p/v)

## Meio MS

Dissolver em 900 mL de água destilada:

1 saquinho da mistura de sais Murashige e Skoog (GIBCO)

100 µl de BAP 10 mg/ml

30 g de sacarose

10 ml de vitamina de Morel e Wetmore

Ajustar pH para 5,8 e completar o volume para 1l.

Para meio sólido, acrescentar 7 g de agar (0,7%).

**Vitaminas de Morel e Wetmore** (Morel, G. & Wetmore, R.H. Fern callus tissue culture Am. J. Bot., 38:141-143, 1951)

	µM	mg/L
Inositol	555	100,00
Pantotenato de Cálcio	2	1,00
Biotina	0,04	0,01
Ácido Nicotínico	8	1,00
Piridoxina.HCl	5	1,00
Tiamina. HCl	3	1,00

## Anexo 2

### **CURRÍCULO**

## ***Curriculum Vitae***

### **1. DADOS PESSOAIS**

**Nome:** Fernanda Mulinari Fontana

**Nome em publicações:** Mulinari, F.

**Filiação:** Nairo Mulinari e Inês Grassi Mulinari

**Nascimento:** 12/01/1980 Planalto - RS - Brasil

**Identidade:** 9068108225 SSP – RS

**CPF:** 776.269.150-20

**e-mail:** fermulinari@yahoo.com.br

mulinari@cenagen.embrapa.br

**Nascimento:** Planalto - RS

**Endereço profissional:** **EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Parque Estação Biológica, final W5 Norte

Caixa postal 02372

Asa Norte - Brasília – DF CEP: 70.770-900.

Telefone: (61) 3448 4705 / 3448 4902

Fax: (61) 3340 3658

e-mail: [mulinari@cenagen.embrapa.br](mailto:mulinari@cenagen.embrapa.br)

**Laboratório de Proteínas Tóxicas – LAPROTOX**

Departamento de Biofísica, IB

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves, 9500

Prédio 43422, Sala 204

Porto Alegre, RS, CEP 91501-970

(55) 51 3308-7600

<http://www.ufrgs.br/laprottox>

## **2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO**

### **2.1 Graduação:**

**1998-2002:** Graduação em Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Rio Grande do Sul, Brasil.

### **2.2 Pós-Graduação:**

#### **2.2.1 Mestrado**

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular – Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

**Data de início: março 2003**

**Data de término: março de 2004**

**<http://www.ufrgs.br/ppgbcm/defesas.htm#2004>**

## **3. ESTÁGIOS**

**3.1 07/1999 – 12/2002:** Bolsista de Iniciação Científica do CNPq

Laboratório de Proteínas Tóxicas, Laprotox.

Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Orientadora: Célia R. R. S. Carlini

**3.2 2002:** Estágio Curricular em Farmácia: Hospital Ernesto Dornelles, Porto Alegre, RS (Carga horária: 300 h).

**3.3** 03/2003 – 11/2003: Estágio no Laboratório Planta – Praga, EMBRAPA - Cenargen (EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia), Brasília – DF, sob a orientação da Dra. Maria Fátima Grossi de Sá. Desenvolvimento experimental do projeto de mestrado, para a clonagem e expressão de peptídeo tóxico derivado de Urease (JBURE-II) de *Canavalia ensiformis*.

**3.4** 04/2004 – 03/2008: Laboratório Planta – Praga, EMBRAPA - Cenargen (EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia), Brasília – DF, sob a orientação da Dra. Maria Fátima Grossi de Sá. Desenvolvimento experimental do projeto de doutorado.

#### **4. BOLSAS**

##### **4.1 Modalidade: Bolsista de Iniciação Científica CNPq**

Área do Conhecimento: Bioquímica

Intituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Início: 01/03/2000

Término: 28/02/2003

##### **4.2 Modalidade: Bolsista Mestrado CNPq**

Área do Conhecimento: Biologia Celular e Molecular

Intituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Início: 01/03/2003

Término: 29/02/2004

##### **4.3 Modalidade: Bolsista de Doutorado CNPq**

Área do Conhecimento: Biologia Celular e Molecular

Intituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Início: 01/03/2004

Término: 28/02/2008

## 5. MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Título:** Avaliação de Proteínas Tóxicas e/ou Antinutricionais em Sementes de Soja (*Glycine max* (L) Merrill) de Diferentes Cultivares

**Orientadora:** Célia R. R. S. Carlini

Laboratório de proteínas Tóxicas, Departamento de Biofísica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

## 6. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Título:** Jaburetox-2Ec: um peptídeo recombinante derivado de urease de *Canavalia ensiformis* com potencial bioinseticida.

**Orientadora:** Dra. Célia Regina R. S. Carlini – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

**Co-orientadora:** Dra. Maria Fátima Grossi de Sá – EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

## 7. ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

**7.1** Becker-Ritt A.B., **Mulinari, F**, Vasconcelos I.M. & Carlini C.R. Antinutritional and/or toxic factors in soybean seeds (*Glycine max* (L) Merril). Comparison among different cultivars adapted to the South Region of Brazil. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 162-170, **2004**

**7.2** Stanisçuaski F., Ferreira-da-Silva C.T., **Mulinari F.**, Pires-Alves M. & Carlini C.R. (2005) Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45: 753-760.

**7.3** Tomazetto G., **Mulinari F.**, Stanisçuaski F., Settembrini B.P., Carlini C.R. & Ayub M.A.Z. (2007) Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology* 41: 821 – 827.

**7.4** **Mulinari F.**, Stanisçuaski F., Bertholdo-Vargas L.R., Postal M., Oliveira-Neto O.B., Rigden D.J., Grossi-de-Sá M.F. & Carlini, C.R. (2007) Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides*, 28 : 2042 – 2050.

## **8. PATENTE – Inovação Tecnológica**

**Mulinari F.**, Pires-Alves M., Moraes M.G., Kurtenbach E., Carlini C.R., Grossi-de-Sá, M.F. (2004). Toxina praguicida, construção gênica e método de controle de pragas. Privilégio de invenção. INPI-RS 0001120, depósito 08 de abril de 2004.

## **9. PUBLICAÇÕES DE RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

**Mulinari F.**, Stanisçuaski, F., Bertholdo-Vargas L.R., Oliveira-Neto O.B., Rigden D.J., Carlini C.R. & Grossi-de-Sá, M.F. Peptídeo inseticida recombinante derivado de urease de *canavalia ensiformis*: Jaburetox-2ec. XI Workshop Talento estudantil 2006, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Arantes I.C., **Mulinari F.**, Quezado M. & Grossi-de-Sá M.F. Expressão heteróloga do inibidor de proteinase BTCl em *Escherichia coli*. XI Workshop Talento estudantil 2006, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Átila-Santos D., **Mulinari F.**, Chrispeels M.J. & Grossi-de-Sá M.F.  $\alpha$ -amilase de *Acanthoscelides obtectus*: clonagem e expressão heteróloga em *Pichia pastoris*.

XI Workshop Talento estudantil 2006, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Bittar P.D., **Mulinari** F., Viana A.A.B., Freitas S.M. & Grossi-de-Sá, M.F. Expressão heteróloga de um inibidor de serinoproteinase (BTCI) de *Vigna Unguiculata* em plantas de *Nicotiana Tabacum*. XI Workshop Talento estudantil 2006, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

**Mulinari** F., Rigden D.J., Carlini C.R. & Grossi-de-Sá, M.F. Peptídeo Inseticida Jaburetox-2Ec: Modelagem Molecular e transformação de tabaco (*Nicotiana tabacum*). VIII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2006. livro de resumos, pg 69.

**Mulinari** F., Stanisçuaski F., Grossi-de-Sá M.F. & Carlini C. R. Jaburetox-2Ec, a potent insecticidal peptide, obtained from a truncated cDNA encoding an isoform of urease. The Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists, Seattle, Washington, 2005. Abstract on-line n. 319 no site: <http://abstracts.aspb.org/pb2005/public/P46/7846.html>

**Mulinari** F., Carlini C.R. & Grossi-de-Sá M.F. Ureases Vegetais de *Canavalia ensiformis*: Clonagem e Caracterização das isoformas. VII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2005. Livro de resumos, pg 63.

**Mulinari** F., Stanisçuaski F., Carlini C.R. & Grossi-de-Sá M.F. Jaburetox-2Ec: peptídeo inseticida derivado de urease de *Canavalia ensiformis*. IX Workshop Talento estudantil 2004, EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 2004.

**Mulinari** F., Grossi-de-Sá M.F. & Carlini C.R. Ureases Vegetais e seus Peptídeos Inseticidas Derivados. VI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2004. livro de resumos, pg 56.

**Mulinari F.**, Stanisçuaski F., Carlini C.R. & Grossi-de-Sá, M.F. Jaburetox-2Ec: peptídeo recombinante derivado de urease de *Canavalia ensiformis* com atividade inseticida. I Workshop Interação Molecular Planta-Pragas 2004, EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 2004.

**Mulinari F.**, Stanisçuaski F., Grossi-de-Sá M.F. & Carlini C.R. Jaburetox-2Ec: Peptídeo inseticida derivado de urease de *Canavalia ensiformis* com atividade inseticida. XX Congresso Brasileiro de Entomologia 2004, Gramado-RS.

**Mulinari F.**, Stanisçuaski F., Fragoso R.R., Oliveira-Neto O.B., Carlini C.R. & Grossi-de-Sá, M.F. Jaburetox-2Ec: a Potent Insecticidal Peptide derived from *Canavalia ensiformis* Urease. XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular 2004, Caxambu, MG, Brasil. XXX SBBq – Programa e Resumos, 2004, v. 33. p. 50-50.

**Mulinari F.**, Stanisçuaski F., Fragoso R.R., Oliveira-Neto O.B., Carlini C.R. & Grossi-de-Sá. Expressão heteróloga de Jaburetox-2Ec: um potente inseticida. V Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2003. Porto Alegre, RS, Brasil. Livro de Resumos, 2003, p. 46.

**Mulinari F.** & Carlini C.R. Avaliação de proteínas tóxicas e/ou antinutricionais em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) de diferentes cultivares. Caderno de Farmácia, Porto Alegre, v. 18/2, 2003.

**Mulinari F.** & Carlini C.R. Presence of Soyatoxin, a toxic protein from soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds in commercial samples of soybean trypsin inhibitor. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular 2003, Caxambu, MG, Brasil. XXX SBBq – Programa e Resumos, 2003, p. 49.

**Mulinari F.** & Carlini C.R. Presença de Soyatoxina, uma proteína tóxica de soja (*Glycine max*) em amostras de SBTI comercial. In: XIV Salão de Iniciação Científica, 2002, Porto Alegre, RS, Brasil. CD-ROM XIV SIC XI FIC

**Mulinari F.** & Carlini C.R. Presença de Soyatoxina, uma proteína tóxica de soja (*Glycine max*) em amostras de SBTI comercial. In: IV Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2002. Porto Alegre, RS, Brasil. Livro de Resumos, 2002, p. 55.

**Mulinari F.**, Becker-Ritt A. & Carlini C.R. Proteínas Antinutricionais e/ou Tóxicas em Sementes de Soja (*Glycine max* (L) Merrill). Comparação entre diferentes cultivares. In: XIII Salão de Iniciação Científica, 2002, Porto Alegre, RS, Brasil. CD-ROM XIII SIC X FIC.

**Mulinari F.**, Becker-Ritt A. & Carlini C.R. Antinutritional and/or Toxic Proteins in Soybeans Seeds (*Glycine max* (L) Merrill). Comparison Among Different Cultivars. In: III Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2001. Porto Alegre, RS, Brasil, Livro de Resumos, 2001, p. 53.

**Mulinari F.**, Becker-Ritt A. & Carlini C.R. The High Molecular Mass Canatoxin-like Protein in Soybean (*Glycine max*) Seeds is na Isoform of Urease. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular 2001, Caxambu, MG, Brasil. XXX SBBq – Programa e Resumos, 2001, p. 178.

Becker-Ritt A., **Mulinari F.** & Carlini C.R. Antinutritional and/or Toxic Proteins in Soybeans Seeds (*Glycine max* (L) Merrill) Comparison Among Different Cultivars. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2001, Caxambu, MG, Brasil. XXX SBBq - Programa e Resumos. 2001, p. 168.

**Mulinari F.**, Becker-Ritt A. & Carlini C.R. Isolamento e caracterização parcial de uma proteína tóxica de alto peso molecular em sementes de soja. In: II Reunião

Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2000. Porto Alegre, RS, Brasil. Livro de Resumos, 2000, p. 47

Becker-Ritt A., **Mulinari** F. & Carlini C.R. Antinutritional and/or toxic proteins in soybean seeds (*Glycine max*) (L) Merrill. Comparison among different cultivars. In: II Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2000. Porto Alegre RS, Brasil. Livro de Resumos, 2000, p. 46

**Mulinari** F., Becker-Ritt A. & Carlini C.R. Isolamento e caracterização de uma proteína de alto peso molecular presente em sementes de soja, relacionada à CNTX In: XII Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre, RS, Brasil, 2000. CD-ROM XII SIC IX FIC

Becker-Ritt A., **Mulinari** F. & Carlini C.R. Isolation and parcial characterization of high molecular weight protein related to canatoxin from soybean (*Glycine max*) seeds. In: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular 2000, Caxambu, MG, Brasil