

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

Estudos para Identificação de Tecidos Alvos das Ureases de
***Canavalia ensiformis* em *Dysdercus peruvianus*.**

Melissa Postal

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Biologia
Celular e Molecular.

Orientadora: Dra. Célia R. Carlini

Porto Alegre, fevereiro de 2008.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Proteínas Tóxicas, Departamento de Biofísica do Centro de Biotecnologia da UFRGS, e na FK Biotecnologia, com suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior – CAPES, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS e Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP.

COMPOSIÇÃO DA BANCA DE MESTRADO

Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

(Depto. Bioquímica e Biologia Molecular – UFC)

Profa. Dra. Maria Fátima Grossi-de-Sá

(EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia; UCB)

Prof. Dr. Carlos Termignoni

(PPG em Biologia Celular e Molecular – UFRGS)

Dra. Fernanda Stanisçuaski

(Revisor e suplente da banca, Departamento de Biofísica - UFRGS)

AGRADECIMENTOS

Tão difícil agradecer tanta pessoas, tantos dias, tantas coisas...

Agradecer pelos dias em que quis fugir, e me seguraram.

Agradecer pelos dias em que quis desistir, e me encorajaram.

Agradecer pelas coisas que esqueci, e me lembraram.

Agradecer pelas coisas que não sabia, e me ensinaram.

Tão difícil...

Agradeço a DEUS por todos os dias, por todas as coisas, por todas as pessoas.

Agradeço à minha família: Jorge e Alzemir, David e Morgana, Itamar e Rita de Cássia e Vivian e Laura. Obrigada pelo amor incondicional, pela saudade, por estarem sempre ao meu lado, sempre um abraço, sempre o que foi preciso.

PAI e MÃE, OBRIGADA!

Agradeço aos meus colegas do LAPROTOX: aos que já passaram por aqui e aos que me acompanham ainda. Obrigada pelo apoio, opiniões, discussões, ensinamentos; mas também pelas risadas, pelos bons e maus momentos que me ensinaram muito mais do que Ciência, me fizeram crescer.

Agradeço à Fernanda Stanisçuaki, pela ajuda e incentivo, principalmente nos momentos mais difíceis e também pelas conversas sinceras. Valeu Fê!

OBRIGADA CÉLIA!

Pelas oportunidades que tem me dado desde que cheguei no laboratório. Obrigada por acreditar que eu podia, mesmo quando eu não acreditei. Obrigada pela mão, além de tudo, de tudo mesmo, ainda me estendeste a mão.

MUITO OBRIGADA DEUS

POR CADA DIA, POR CADA COISA E POR CADA PESSOA.

QUE ASSIM SEJA!

Introdução	11
1. Ureases	11
2. Isoformas de Ureases de <i>Canavalia ensiformis</i>	12
3. Canatoxina	13
4. Atividade Inseticida	14
5. Mecanismo de ação da urease e/ou do peptídeo	16
6. Inseto modelo - <i>Dysdercus peruvianus</i>	17
7. Anticorpos Monoclonais	20
8. Uso de anticorpos monoclonais (mAB) no estudo de mecanismos de ação de proteínas inseticidas e de ureases	23
Objetivos	27
Metodologia	28
1. Ureases	28
2. Peptídeo Recombinante Jaburetox 2-Ec	29
3. Insetos – <i>D. peruvianus</i>	29
4. Preparação dos Homogeneizados de <i>D. peruvianus</i>	30
5. Eletroforeses	30
6. Anticorpos Policlonais desenvolvidos em coelho	30
7. Histologia e imunolocalização.	31
8. Imunodifusão	31

9. Dot Blot	32
10. Western-Blot	33
11. <i>Overlay</i> ou <i>Ligand blot</i>	33
12. Cromatografia de afinidade com urease imobilizada	34
13. ELISA	35
14. Produção dos Anticorpos Monoclonais	35
15. Seleção dos clones	36
Resultados	38
1. Identificação de proteínas presentes nos tecidos do <i>Dysdercus peruvianus</i> que interagem com as ureases <i>in vitro</i> .	38
2. Produção de Anticorpos Monoclonais anti-Urease de <i>C. ensiformis</i>	45
Discussão	47
Conclusões	51
Referências Bibliográficas	52
Anexo 1 – CURRICULUM VITAE	63
Anexo 2 – Artigo	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF: adjuvante completo de Freund
BCIP: 5-bromo-4-cloro-indoil-fosfato
BSA: albumina do soro bovino
CNTX: canatoxina
GHU: urease de *Gossipyum hirsutum*
GMPc: guanosina monofosfato cíclico
EDTA: ácido etilenodiamino-tetraacético
ELISA: ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas
HAT: hipoxantina-aminopterina-timidina
HGPRT: hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase
IMAC: cromatografia de afinidade por metal imobilizado
IgG: imunoglobulina
JBU: urease de *Canavalia ensiformis*
mAB: anticorpo monoclonais
NaPB: fosfato de sódio
NBT: nitroblue tetrazolium
PEG: polietileno glicol
PVDF: difluoreto de polivinilideno
SDS PAGE: gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TBS: solução TRIS HCL salina: 10mM TRIS + 137 mM NaCl Ph 7,4
TM: Túbulos de Malpighi
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

RESUMO

As sementes de *Canavalia ensiformis* são fonte de várias proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico, como urease (JBU) e a canatoxina (CNTX). Ureases são enzimas dependentes de níquel que catalisam a hidrólise de uréia em amônia e carbamato encontradas em plantas, fungos e bactérias. A canatoxina, uma proteína tóxica isolada a partir da mesma semente em 1981 por Carlini & Guimarães é uma isoforma de urease. A CNTX e a urease possuem atividade inseticida, sendo que o efeito entomotóxico se deve à produção de fragmentos das proteínas, gerados pela ação das enzimas digestivas dos insetos. Apenas grupos de insetos com digestão baseada em enzimas acídicas são suscetíveis à toxina. O mecanismo de ação da CNTX e peptídeos gerados a partir da sua hidrólise não está claramente elucidado. Considerando o potencial das isoformas de ureases de *C. ensiformis* e peptídeos derivados para desenvolvimento de inseticidas, é importante investigar os mecanismos de ação e os órgãos ou tecidos-alvos de sua toxicidade nos insetos. Esse trabalho teve como objetivo testar diferentes protocolos visando a imunolocalização da toxina e/ou seus fragmentos em diferentes tecidos do inseto modelo *Dysdercus peruvianus*, um percevejo praga da cultura do algodão. Mesmo testando diferentes condições experimentais, observamos reação cruzada dos anticorpos anti-urease com os tecidos do inseto *D. peruvianus*, inviabilizando os estudos de imunolocalização. Considerando que a semente de algodão apresenta uma urease endógena ainda pouco caracterizada, e o alto grau de homologia existente entre ureases de diferentes fontes vegetais, a reação cruzada observada nos tecidos dos insetos pode ser devido à presença da

urease do algodão e de seus fragmentos, provenientes do alimento consumido. Outras tentativas de identificação de alvos moleculares do inseto que interagem *in vitro* com a urease foram feitas, como ensaios de *ligand blot* e cromatografia de afinidade, mas estes não apresentaram resultados conclusivos.

A produção de anticorpos monoclonais contra as diferentes isoformas de ureases de *C. ensiformis* está entre as alternativas possíveis para atingir nosso objetivo. Numa primeira tentativa, camundongos foram imunizados com uma mistura de isoformas da urease de *C. ensiformis*, que apresentam cerca de 85% de identidade, resultando na produção de anticorpos com especificidades diferenciadas para JBU e para a CNTX. Obtivemos 22 clones positivos: dois apresentaram maior especificidade pela CNTX (cerca de 4 vezes); dois clones foram mais específicos para urease (cerca de 2 vezes) e um foi capaz de reconhecer um peptídeo inseticida recombinante derivado da urease, com maior especificidade (resposta 1,5 maior do que CNTX ou JBU). Os resultados demonstraram que é possível produzir anticorpos monoclonais que diferenciam as diferentes ureases de *C. ensiformis*, para uso futuro em imunohistoquímica.

INTRODUÇÃO

1. Ureases

As ureases (E.C. 3.5.1.5) são enzimas níquel-dependentes (Dixon *et al.*, 1975; King *et al.*, 1995) 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 & Tarr, 1955). Esta enzima também age sobre outros substratos, como hidroxauréia e dihidroxauréia (Fishbein, W.N., 1969) e algumas uréias substituídas e ésteres de ácido carbâmico, como a tiouréia e p-nitrofenilcarbamato (Bennett, J. & Wren, E.A. 1977).

Essas enzimas estão presentes em fungos, bactérias e em plantas. Algumas bactérias produtoras de urease, como *Klebsiella aerogenes*, utilizam a uréia como fonte de nitrogênio (Mulrooney *et al.*, 1989). As ureases de algumas bactérias patogênicas estão envolvidas em vários processos patológicos, como a formação de cálculos urinários, incrustação de catéter, pielonefrites, coma hepático, decorrentes de infecções com *Proteus mirabilis*, bem como gastrites e alguns casos de câncer gástrico, causados por *Helicobacter pylori*. Acredita-se que a hidrólise da uréia e conseqüente formação de amônia protegem os microorganismos da morte em ambientes ácidos (Mobley *et al.*, 1995).

Embora a ocorrência dessa enzima seja bastante comum em tecidos vegetais, particularmente em leguminosas (Polacco & Holland, 1993), o seu papel na planta ainda não está claro. Atribui-se como função fisiológica das ureases um papel na reciclagem de N a partir de uréia (Sirko & Brodzik, 2000), apesar dessa não ser um metabólito abundante

em plantas. Durante a germinação, a uréia endógena é, na sua maioria, produto da degradação de arginina. A urease catalisa a conversão de uréia à amônia, permitindo sua assimilação na via de síntese de glutamina (Goldraj & Polacco, 1999).

Polacco & Holland (1993) descreveram a ocorrência de duas isoenzimas de ureases na soja (*Glycine max*): uma urease ubíqua que está presente em todos os tecidos da planta, e uma urease embrião-específica, sintetizada no embrião em desenvolvimento e acumulada na semente madura. Essa última apresenta, na semente, uma atividade ureásica 1000 vezes maior do que a urease ubíqua (Polacco & Winkler, 1984). Esses estudos ampliaram a discussão sobre a função de ureases em vegetais. Em plantas mutantes, nas quais a urease ubíqua está ausente, observa-se necrose nas extremidades das folhas e raízes, acúmulo da uréia e retardo da germinação (Polacco & Holland, 1993). No entanto, a perda da urease embrião-específica não acarreta alteração fenotípica alguma na planta. Em virtude desses fatos, Polacco & Holland (1993) propuseram que essa proteína teria outra função na planta, talvez, em mecanismos de defesa.

Essa função de defesa das ureases nas plantas condiz com a atividade inseticida e fungicida descrita para canatoxina, uma isoforma de urease encontrada em sementes de *Canavalia ensiformis* (Carlini *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 1999; Ferreira DaSilva *et al.*, 2000; Follmer *et al.*, 2001; Becker-Ritt *et al.*, 2007).

2. Isoformas de Ureases de *Canavalia ensiformis*

As sementes de *Canavalia ensiformis* são fonte de várias proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico, como urease (JBU) (Sumner, 1926), a lectina concanavalina

A (Sumner & Howell, 1936), inibidores de tripsina (Ubatuba, 1955) e a canatoxina (CNTX), (Carlini & Guimarães, 1981).

A urease (JBU) de *C. ensiformis* foi a primeira enzima a ser cristalizada (Sumner, 1926). Possui uma cadeia polipeptídica única com 840 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 90,770 kDa. A forma mínima da proteína expressando atividade enzimática é a de um trímero de 270 kDa, sendo que a forma nativa é um hexâmero de 540 kDa (Zerner, 1991). Fragmentos de baixo peso molecular (30-45 kDa) formam-se em soluções de urease, provavelmente decorrentes de quebras “espontâneas” da cadeia peptídica em ligações Asp-Pro (Dixon *et al.*, 1980).

Em 1981, Carlini & Guimarães isolaram uma proteína neurotóxica das sementes de *Canavalia ensiformis*: a canatoxina. Posteriormente, essa proteína foi caracterizada como sendo uma isoforma minoritária da urease da mesma semente (Follmer *et al.*, 2001), sendo que ambas isoformas apresentam atividade inseticida (Carlini *et al.*, 1997; Follmer *et al.*, 2004).

3. A Canatoxina

A canatoxina corresponde a 0,5% do peso seco da semente de *C. ensiformis* (Carlini & Guimarães, 1981). Quando injetada intraperitonealmente, a toxina induz bradicardia, hipertensão e hipotermia, que precede convulsões e a morte em ratos e camundongos, com uma DL₅₀ de 2 mg/Kg (Carlini *et al.*, 1984). Nenhum efeito é observado nesses animais quando a CNTX é administrada por via oral. Em concentrações nanomolares a CNTX induz *in vitro* excitose em plaquetas, mastócitos, sinaptosomas,

ilhotas pancreáticas, neutrófilos e macrófagos, sem alterar a integridade das membranas celulares (Carlini *et al.*, 1985; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991 a, 1991b; Ghazaleh *et al.*, 1997). A canatoxina e a JBU interagem com a superfície celular via ligação com gangliosídeos e sialoproteínas (Carlini & Guimarães, 1991; Follmer *et al.*, 2001; Real-Guerra, 2007). A maioria dos efeitos, *in vivo* e *in vitro*, da CNTX envolvem a ativação do metabolismo do ácido araquidônico, principalmente pela rota das lipoxigenases (Carlini *et al.*, 1985; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991 a, 1991b; Oliveira-Severo *et al.*, 2006).

Em sua forma nativa, a canatoxina apresenta-se como um dímero de cadeias polipeptídicas de 95 kDa ligadas não covalentemente. Esta proteína contém zinco e níquel, elevada homologia (~85%) com a sequência primária da urease majoritária, e 40-50% da atividade ureásica desta. Em contraste, a JBU é um hexâmero de uma subunidade de 90,7 kDa, contendo 2 átomos de Ni cada, e nenhum Zn (Follmer *et al.*, 2001, 2002). Anticorpos policlonais desenvolvidos contra a canatoxina nativa ou desnaturada, bem como anticorpos monoclonais de fonte comercial (Sigma Chem. Co) contra a JBU são incapazes de diferenciar as isoformas, confirmando o seu alto grau de homologia (Follmer *et al.*, 2001).

As duas isoformas podem ser separadas através de cromatografia de afinidade por metal imobilizado, em função da diferença de afinidade por zinco ou cobalto, apresentada pelas duas proteínas (Follmer *et al.*, 2001, Follmer *et al.*, 2004).

4. Atividade Inseticida

A atividade inseticida das ureases vegetais foi primeiramente descrita para a canatoxina, em 1997. A canatoxina foi testada em diferentes insetos apresentando-se tóxica

para insetos com digestão baseada em catepsinas, como *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Bruchidae) e *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). Essa atividade inseticida não é observada em insetos com digestão baseada em enzimas do tipo tripsina (Carlini *et al.*, 1997). Abaixo estão relacionados os insetos testados para o efeito inseticida da CNTX ou urease de *C. ensiformis* até o presente momento:

Insetos Não Susceptíveis

<i>Schistocerca americana</i>	(Orthoptera, Acrididae)	}	Enzimas Digestivas Básicas
<i>Drosophila melanogaster</i>	(Diptera, Drosophilidae)		
<i>Aedes aegypti</i>	(Diptera, Culicidae)		
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	(Lepidoptera, Noctuidae)		
<i>Manduca sexta</i>	(Lepidoptera, Sphingidae)		

Insetos Susceptíveis

<i>Callosobruchus maculatus</i>	(Coleoptera, Bruchidae)	}	Enzimas Digestivas Acídicas
<i>Rhodnius prolixus</i>	(Hemiptera, Reduviidae)		
<i>Nezara viridula</i>	(Hemiptera, Pentatomidae)		
<i>Dysdercus peruvianus</i>	(Hemíptera, Pyrrhocoridae)		
<i>Oncopeltus fasciatus</i>	(Hemíptera, Lygaeidae)		

A inibição das catepsinas digestivas resulta em proteção para o inseto *R. prolixus* contra o efeito letal da CNTX, sugerindo que a hidrólise proteolítica da toxina é

essencial para a atividade tóxica (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Essa hipótese foi confirmada por estudos de digestão *in vitro* da proteína com enzimas de *C. maculatus*, resultando em peptídeos que apresentaram efeito tóxico sobre *R. prolixus*. O peptídeo mais ativo, apresentando cerca de 10 kDa, foi isolado e chamado de pepcanatox. Quando o pepcanatox é administrado aos insetos juntamente com inibidores de catepsina, o efeito protetor não é mais observado (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000), confirmando assim que a CNTX é uma protoxina, e que fragmento(s) dela, gerado(s) pelas enzimas digestivas do próprio inseto, é(são) o(s) responsável(is) pelo efeito inseticida. A partir da seqüência do pepcanatox (Gombarovits 1999), foram desenhados *primers* para obtenção de um cDNA codificando um peptídeo recombinante de 12,8 kDa, designado jaburetox-2Ec, expresso em *E. coli* (Mulinari *et al.*, 2007). O peptídeo jaburetox-2Ec, apresentou potente efeito entomotóxico no inseto modelo *D. peruvianus*, uma peste da cultura de algodão, e também na lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, destacando o potencial uso dessa proteína como ferramenta biotecnológica no controle de pragas (Stanisçuaski, *et al.*, 2005; Mulinari *et al.*, 2007).

5. Mecanismo de ação da urease e/ou do peptídeo

O mecanismo de ação inseticida da urease e do peptídeo tóxico tem sido estudado em nosso laboratório. Ensaios de western blot mostraram que não há mais CNTX no intestino de *R. prolixus* 48 h após uma refeição da toxina, período bem anterior ao início da morte dos insetos, que acontece a partir do 3º-4º dia. Com 48 h, na hemolinfa vêem-se muitos fragmentos e também agregados moleculares imunoreativos, maiores que a própria

toxina (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Estes sugerem que tanto a urease como seus fragmentos não ficam restritos ao intestino do inseto e podem ter efeitos sistêmicos. Stanisçuaski et al (2007) mostrou que tanto as ureases quanto o Jaburetox 2-Ec atuam sobre os Túbulos de Malpighi (TM) do inseto *R. prolixus* diminuindo a secreção de fluidos, porém por rotas diferentes. A secreção estimulada por serotonina pelos TM é ocorre através de rotas diferentes. Eicosanóides e Ca^{2+} estão envolvidos na inibição da secreção provocada por JBU, mas não pelo peptídeo jaburetox 2Ec, para o qual o GMPc parece ser o 2º mensageiro do efeito antidiurético.

A JBU também tem ação direta sobre o sistema digestório, diminuindo o transporte de fluídos através do epitélio do estômago. Além disso, promove alteração na frequência e amplitude das contrações do intestino posterior além de alterar o tônus basal do músculo. Tanto a JBU, como o Jaburetox 2-Ec, interferem na frequência de contrações do estômago (Stanisçuaski, 2007).

6. Inseto modelo - *Dysdercus peruvianus*

Dysdercus peruvianus Guérin-Ménéville (Hemíptera: Pyrrhocoridae), conhecido vulgarmente como percevejo manchador do algodoeiro, é uma praga da cultura de algodão. Os danos causados por esse inseto são a queda ou mau desenvolvimento das maçãs, manchas das fibras, introdução de fungos e bactérias, que podem levar a perdas totais da cultura do algodão (Gallo *et al.*, 1988). O ciclo de vida do *D. peruvianus* pode variar de 30 a 35 dias, dos ovos até a fase adulta.

Dysdercus peruvianus pertence à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Pyrrhocoridae. Esses insetos são adaptados a diferentes dietas (Gooldchild, 1966). O inseto escolhido como modelo pertence a infraordem Pentatomomorfa. A maioria dos pentatomomorfos se alimenta de sementes, nas quais injetam sua saliva contendo enzimas digestivas (Miles, 1972; Feir, 1974; Hori, 1975; Laurema *et al.*, 1985). A completa digestão do alimento deve ocorrer no intestino médio, (Takanona & Hori, 1974; Khan & Ford, 1967) que se caracteriza, quanto a morfologia digestória, por ter um intestino médio dividido em 4 regiões distintas (V1 - V4), nem sempre apresentando cecos gástricos. Os processos de digestão desse grupo de insetos ocorrem ao longo do intestino médio: V1 é um local de armazenamento, em V2 e V3 ocorre a digestão das proteínas, carboidratos e a absorção de monossacarídeos (Saxena, 1958; Feir, 1974). Depois de um longo período em V3, o alimento passa rapidamente através de V4 para a porção final do intestino. Existem bactérias associadas ao epitélio de V3 e V4, que parecem não possuir papel na digestão, já que a sua ocorrência se dá num local onde não há mais processos digestivos (Silva & Terra, 1994). Postula-se que a importância desses microrganismos estaria relacionada ao movimento do bolo alimentar, devido à produção de substâncias que estimulariam o movimento peristáltico (Silva *et al.*, 1995).

Silva & Terra (1994) descreveram os sítios de absorção do intestino médio de *D. peruvianus*. V1 é o principal local de absorção de água e glicose, sendo que a água absorvida em V1 passa através dos tubos de Malpighi para a porção final do intestino. V2 e V3 são os locais de absorção de aminoácidos. Esse inseto, ao contrário do que é relatado para outras espécies da infraordem a qual pertencem, não possui enzimas digestivas na saliva, que serve apenas para suspender o material ingerido (Silva & Terra, 1994).

Uma metodologia de bioensaios de toxicidade para *D. peruvianus* desenvolvida em nosso grupo permitiu a introdução de substância-teste em sua dieta, sem manipulação excessiva do animal (Stanisçuaski *et al*, 2005). Observa-se assim que o efeito da CNTX sobre esse inseto é estágio dependente, sendo que ninfas são susceptíveis enquanto adultos não o são (Figura 1).

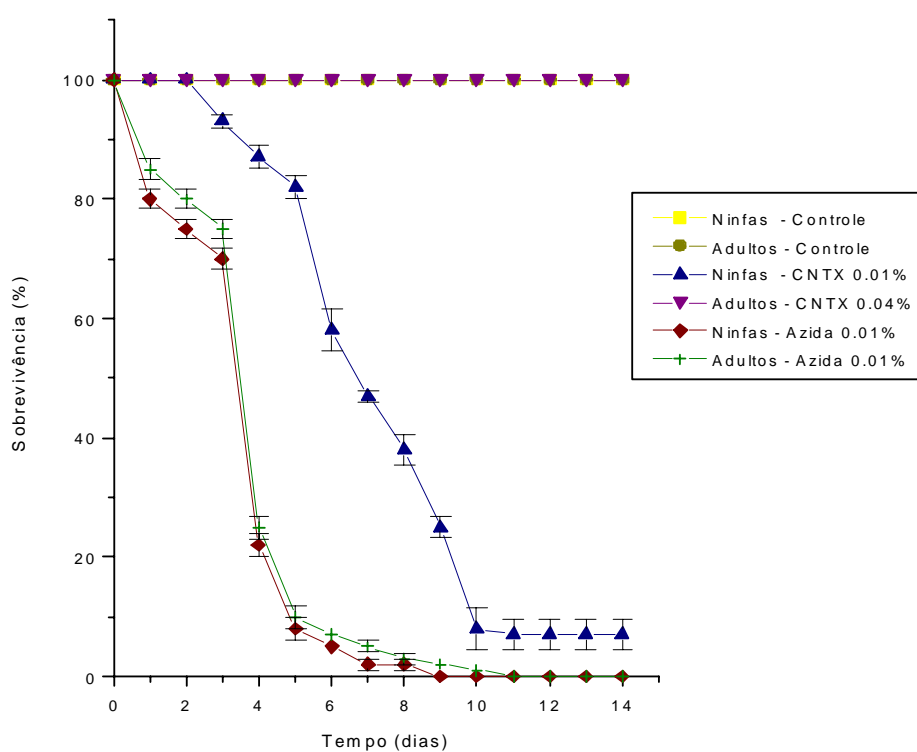


FIGURA 1 - Curva de Sobrevivência. Insetos de terceiro estágio ou machos adultos foram alimentados com a semente artificial confeccionada com farinha de cotilédones de algodão, contendo CNTX ou azida sódica. O número de insetos sobreviventes foi acompanhado diariamente. Os dados são médias e desvio padrão de pontos experimentais em triplicatas. (Retirado de Stanisçuaski et al, 2005).

A diferença de susceptibilidade entre adultos e ninfas pode estar relacionada com as enzimas digestivas presentes ou alterações de permeabilidade do trato digestório em cada fase. Estudos de hidrólise *in vitro* mostraram que embora ninfas e adultos sejam capazes de digerir a urease, nos adultos não se observa a formação de um fragmento equivalente ao peptídeo entomotóxico, como se observa em ninfas (Piovesan *et al*, 2007). Nesse mesmo trabalho, foi sugerido que as enzimas responsáveis pela hidrólise da urease em adultos são do tipo serino e cisteíno proteases, enquanto em ninfas, as enzimas responsáveis são do tipo aspártico proteases.

7. Anticorpos Monoclonais

Anticorpos são uma família de proteínas produzidas como parte do sistema imune de vertebrados, sendo moléculas capazes de identificar uma substância única em uma mistura complexa de outras substâncias. Tradicionalmente, os anticorpos são purificados a partir do soro imune de animais. Essa prática consiste em introduzir o imunógeno no animal escolhido, e controlar os níveis de anticorpos no soro até alcançar uma resposta adequada. Atingido o nível desejado de anticorpos, é realizada a sangria do animal e purificação das imunoglobulinas, resultando em uma fração de anticorpos purificados. No entanto, esses anticorpos são heterogêneos do ponto de vista dos determinantes antigênicos que eles reconhecem, principalmente quando o antígeno tem natureza complexa.

Em 1975, Kohler & Milstein descreveram uma forma para a obtenção de anticorpos que veio a proporcionar grandes avanços nas áreas da biologia celular e dos

diagnósticos clínicos. A técnica consiste em produzir populações de anticorpos monoclonais através da hibridização de células de mielomas, que podem crescer indefinidamente, com linfócitos B portadores do gene para um anticorpo específico.

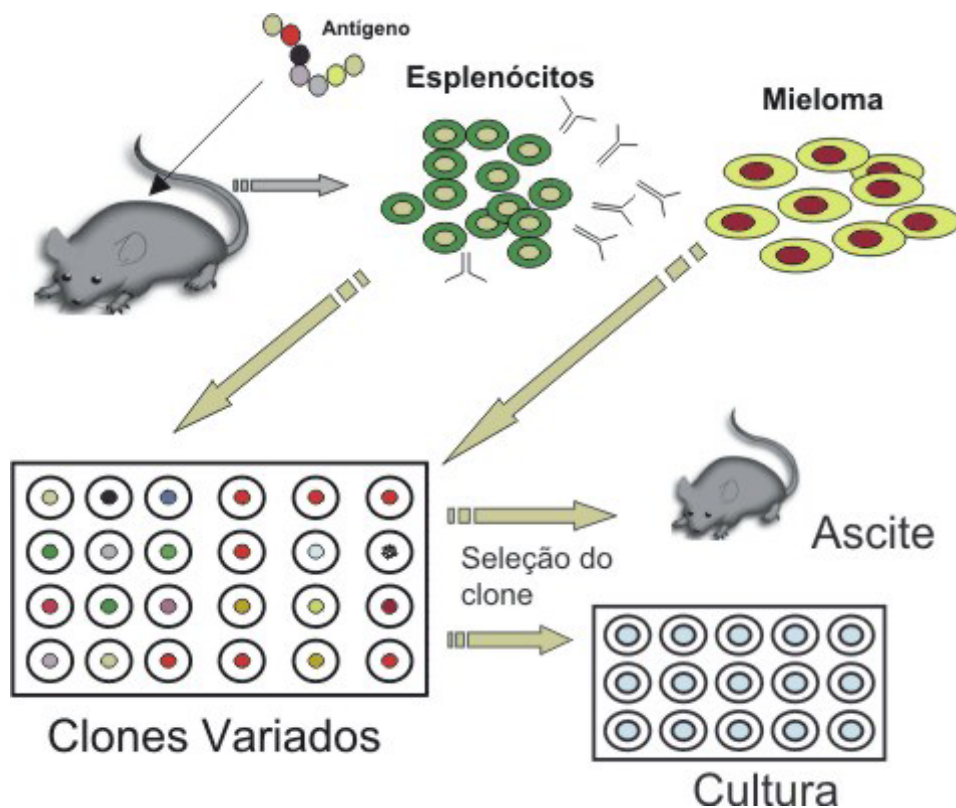


Figura 2 — Esquema ilustrativo para a obtenção de Anticorpos monoclonais em camundongos. (Extraído de: Boletim Epidemiológico Paulista – BEP - ISSN 1806-4272) .

A fusão é facilitada por polietileno glicol, que promove a aderência das células e fusão dos núcleos. Depois de fusionadas, as células são transferidas para um meio com hipoxantina-aminoptericina-timidina (HAT), no qual apenas células híbridas são capazes de sobreviver. Os mielomas morrem pela falta de nutriente e as células esplênicas têm limitado

período de vida. A morte dos mielomas ocorre devido ao fato dessas células não serem capazes de sintetizar purinas, usando hipoxantina de fonte externa como precursor, pois a enzima (hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase – HGPRT) está ausente nesse tipo celular. Outras rotas para a síntese de purinas são utilizadas como alternativa à HGPRT, sendo essas inibidas na presença de aminopterina. Células positivas são isoladas e subcultivadas. Cada célula representa um clone, que produz um anticorpo monoclonal dirigido contra um único antígeno, ou determinante antigênico, no caso de antígenos complexos. Os hibridomas podem ser estocados em nitrogênio líquido por muitos anos (Leenaars & Hendriksen, 2005; CCAC Guidelines on: antibody production, 2002).

Depois de selecionados, os hibridomas são injetados na cavidade peritoneal do animal que deu origem às células esplênicas e aos mielomas. Ali, secretam os anticorpos monoclonais formando o fluido ascítico. Este é retirado do animal e purificado por cromatografia de afinidade com proteína A/G, ou por cromatografia líquida. Os anticorpos também podem ser obtidos por cultura de células, no entanto, essa alternativa produz concentrações bem menores de imunoglobulinas.

Outro método de imortalização de linfócitos B é a infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV), porém as células assim transformadas são difíceis de clonar e produzem baixos níveis de imunoglobulinas (Little *et al.*, 2000). A produção de anticorpos monoclonais também pode ser obtida utilizando-se tecnologia de DNA recombinante, com o isolamento e a amplificação por PCR dos genes presentes codificantes para anticorpos circulantes e a clonagem em *Escherichia coli*. Outra alternativa para obtenção de anticorpos monoclonais são técnicas de transformação de células embrionárias de camundongos, com inserção de cromossomos codificantes para as imunoglobulinas desejadas (Reiche *et al.*, 2002).

8. Uso de anticorpos monoclonais (mAB) no estudo de mecanismos de ação de proteínas inseticidas e de ureases

Anticorpos monoclonais são ferramentas convenientes para o estudo da interação de proteínas tóxicas e receptores moleculares, pois permite que estudos sejam realizados *in vivo*, diretamente sobre células e tecidos possibilitando a visualização do evento estudado.

Estudos com as proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*, por exemplo, utilizaram imunolocalização para a elucidação do mecanismo de ação e localização das endotoxinas (proteínas Cry) nos tecidos dos insetos. As proteínas Cry se ligam a receptores específicos na superfície epitelial das células do trato digestório dos insetos, disparando o seu mecanismo de ação. O reconhecimento desses receptores pelas toxinas é fundamental para a atividade tóxica e é específico para determinado grupos de insetos (Piggot *et al.* 2007). Anticorpos monoclonais contra distintos sítios funcionais dessas endotoxinas foram produzidos e caracterizados (Huber-Lukac *et al.*, 1982, 1983, 1986). Esses mABs reagiram diferencialmente com proteínas Cry de diferentes subespécies de *B. thuringiensis*, permitindo a identificação dessas proteínas (Huber-Lukac *et al.*, 1986).

Estudos de imunolocalização permitem também estudar a distribuição e localização de proteínas em tecidos específicos. A imunolocalização de arcelinas, uma família de proteínas tóxicas presente em *Phaseolus vulgaris*, sobre os insetos *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus* permitiu avaliar a distribuição dessas toxinas em células e tecidos dos insetos, contribuindo para o esclarecimento do mecanismo de ação dessas proteínas (Paes *et al.*, 2000).

Anticorpos monoclonais contra ureases já foram descritos, em especial contra a enzima de *Helicobacter pylori*, devido a sua aplicação em diagnóstico de doenças gástricas. Anticorpos monoclonais contra a urease nativa de *H. pylori* são capazes de inibir a atividade ureásica, enquanto anticorpos policlonais não inibem e podem abolir a ação inibitória desses mAbs (Nagata *et al.*, 1992). Um desses anticorpos, chamado L2, apresentou reação cruzada com ureases purificadas de outras espécies de *Helicobacter* (*H. felis*, *H. nemestrinae*), mas não foi capaz de reconhecer urease de *Proteus mirabilis* ou de *C. ensiformis* (Hirota *et al.* 2001).

Em 1993, Karmali *et al.* descreveu a produção de mABs contra ureases de *Canavalia ensiformis*. Nesse estudo, foram obtidas três linhagens de células secretando mABs da classe IgM que reconheciam formas monoméricas e triméricas de urease e não apresentavam reação cruzada contra ureases bacterianas. Os autores não citam dados de reação cruzada com ureases de outras fontes vegetais e nem entre as isoformas de urease presentes na mesma planta.

Monoclonais contra ureases de plantas foram desenvolvidos por Hirayama *et al.*, 2000, para estudar a distribuição dessas proteínas no bicho-da-seda *Bombyx mori*, cuja lagarta se alimenta de folhas e raízes de amoreira (*Morus alba*). A presença de urease no epitélio digestório e na hemolinfa do *B. mori* foi realizada por imunohistoquímica usando mAbs anti-urease. Os estudos mostraram que a urease encontrada na hemolinfa da lagarta era originária da planta da qual o inseto se alimenta. Os autores demonstraram ainda que a urease ingerida pelo inseto passa intacta para a hemolinfa, provavelmente, através de ligação a uma proteína localizada nas membranas do epitélio digestório, que serve como receptor seletivo, já que esse transporte é mais eficiente para a urease de *Morus alba* do que

ureases de outras fontes, como *C. ensiformis* (jack bean) e *Bacillus pasteurii* (Kurahashi *et al.*, 2005).

Em nosso laboratório, anticorpos policlonais produzidos em coelho contra a CNTX nativa ou desnaturada, não se mostraram capazes de distinguir a JBU da CNTX, apresentando igual título por ELISA. Adicionalmente, testamos um anticorpo monoclonal contra urease de *C. ensiformis*, disponível comercialmente (Sigma Chem. Co, U-4879, Lot 79F4819) e esse também não se mostrou capaz de distinguir a CNTX da urease majoritária de semente (Follmer *et al.*, 2001).

Considerando o potencial das isoformas de ureases de *C. ensiformis* e seus peptídeos derivados para desenvolvimento de inseticidas, é importante investigar os mecanismos de ação e os órgãos ou tecidos-alvos de sua toxicidade nos insetos. Alguns insetos respondem aos efeitos tóxicos da ureases de *C. ensiformis* ou da soja (*Glycine max*), apesar da presença de urease endógena nas sementes que lhes servem como alimento. Esse é o caso do percevejo *D. peruvianus*, sendo que extratos da semente de algodão apresentam atividade ureásica e reagem contra anticorpos anti-urease ou anti-CNTX. Uma urease com subunidades de ~98.3 kDa foi preliminarmente caracterizada pelo nosso grupo, sendo esta a primeira descrição de urease em uma Malvacea (Barcelos *et al.*, 2004; Menegassi *et al.*, dados não publicados). Ureases são abundantes também na semente de soja, fonte de alimento do percevejo verde *Nezara viridula*, ou no feijão-de-corda *Vigna unguiculata*, atacada pelo caruncho *C. maculatus*, sendo que ambas essas pragas são susceptíveis ao efeito tóxico de ureases de *C. ensiformis*. Devido ao alto grau de homologia entre ureases de diferentes fontes vegetais (Follmer, 2007), a imunolocalização da toxina nos tecidos

alvos desses insetos pode resultar em um falso positivo, devido a uma reação cruzada com as proteínas endógenas e seus fragmentos, provenientes do alimento consumido.

Assim, o desenvolvimento de anticorpos capazes de distinguir as isoformas de urease de *C. ensiformis* e o peptídeo tóxico jaburetox 2-Ec, sem apresentar reação cruzada com ureases de outras espécies, é uma ferramenta importante nos estudos sobre seu mecanismo de ação em organismos suscetíveis.

OJETIVOS

Objetivos Gerais:

Os objetivos desse trabalho foram realizar a imunolocalização das ureases de *Canavalia ensiformis* e/ou de seus fragmentos nos tecidos em ninfas do inseto *Dysdercus peruvianus* e desenvolver anticorpos monoclonais capazes de diferenciar as isoformas de ureases dessa semente, bem como o peptídeo inseticida recombinante, derivado de urease.

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- Identificar tecidos alvos de ureases e ou peptídeos em *Dysdercus peruvianus* e otimizar uma metodologia para visualizar a interação da urease com as proteínas ligantes nos diferentes tecidos;
- Analisar o grau de imunoreatividade cruzada entre as isoformas de ureases de *Canavalia ensiformis* e do algodão *Gossypium hirsutum*;
- Desenvolver anticorpos monoclonais para o peptídeo inseticida recombinante jaburetox-2Ec que não reconheçam as holoproteínas;

Metodologia

1. Ureases

A CNTX e a JBU foram purificadas por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC) a partir de sementes de feijão-de-porco de acordo com Follmer *et al.*, 2004. A concentração protéica foi estimada pela absorbância a 280 nm (A280) ou pelo método de Bradford (1976).

A urease de sementes de algodão foi purificada conforme Menegassi *et al.*, 2007. Resumidamente, o protocolo de purificação consta de precipitação com sulfato de amônio, duas etapas de cromatografia de troca iônica e gel-filtração, resultando em uma preparação homogênea da proteína. A enzima apresenta-se como um hexâmero de subunidades de 98.3 kDa, ligadas não covalentemente.

A atividade ureásica das amostras em tampão 20 mM de fosfato de sódio, 1 mM de ácido etilenodiamino-tetraacético (EDTA), 5 mM de β -mercaptoetanol pH 7,5 foi ensaiada sobre uréia (10 mM, concentração final), por 30 min a 37 °C. A amônia formada foi determinada colorimetricamente (Weatherburn, 1967). Uma unidade de urease foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 micromol de uréia por min nas condições descritas.

2. Peptídeo Recombinante Jaburetox 2-Ec:

O peptídeo Jaburetox 2Ec é obtido através da expressão heteróloga em *E. coli*, segundo Mulinari *et al*, 2007. O peptídeo possui uma cauda de His que interage com Ni, viabilizando a purificação por cromatografia de afinidade em Ni-NTA (QIAGEN). O peptídeo é retido na coluna e depois eluído com 200 mM de imidazol. A amostra foi dializada exaustivamente para a retirada do imidazol.

3. Insetos

Dysdercus peruvianus

A colônia de *D. peruvianus* é mantida em sala climatizada, com temperatura entre 22-25 C (Milano *et al.*, 1999), umidade relativa de 75%, e com fotoperíodo de 16:8 h (Claro: Escuro). Os insetos são mantidos em frascos de tereflato de polietileno (PET), fechados com tela de tecido serigráfico e com uma camada de areia no fundo. Os insetos têm livre acesso a água, mantida em bebedouros de plástico, e são alimentados com sementes lintadas de algodão (*Gossypium hirsutum*). Estas sementes são mantidas dentro dos frascos durante o período de reprodução e postura, até o primeiro estágio de ninfa. Depois, as sementes são colocadas sob o tecido que fecha os frascos, para evitar contato com as fezes dos insetos. O ciclo de vida do *D. peruvianus*, dos ovos até a fase adulta, pode levar de 30 a 35 dias, incluindo 5 fases larvais.

4. Preparação dos Homogeneizados de *D. peruvianus*

Ninfas de 4º ínstar foram mantidas em jejum de 2 a 4 dias, mas com livre acesso a água. Para o preparo dos homogeneizados, os insetos foram anestesiados por hipotermia por 10-15 minutos e em seguida dissecados sob microscópio estereoscópico: as patas e antenas são removidas, a cabeça e o intestino são separados, e o resto do corpo é reunido em uma única fração. Cada fração foi homogeneizada com Potter manual de vidro em tampão PBS 1X, numa proporção de 50 insetos (ou suas partes) por mL, e centrifugada 2 vezes a 14.000 rpm por 30 min à 6° C. O sobrenadante foi separado, filtrado em membrana de 0,45 um e a concentração de proteína nos homogeneizados foi estimada por Bradford (1976).

5. Eletroforeses

As eletroforeses em gel de poliacrilamida (8%, 10%, 12% ou gradiente de 8-20%) foram realizadas utilizando o método de Laemmli (1970). Realizou-se também o SDS-PAGE, utilizando-se amostras não fervidas contendo SDS. As amostras dos géis nativos, feitos sem a adição de SDS, também não foram fervidas. Após as corridas, os géis foram corados com Coomassie Blue ou nitrato de prata (Blum et al., 1987).

6. Anticorpos Policlonais desenvolvidos em coelho

Adaptado de Follmer et al., 2001. As amostras (CNTX) foram separadas por SDS-PAGE e coradas com Coomassie Blue. Bandas referentes a CNTX (totalizando cerca

de 100 µg de proteína) foram cortadas, submetidas a eletroeluição ou não, e emulsionadas com os adjuvantes para o preparo das injeções. Aplicou-se três injeções subcutâneas no dorso do de coelhos, acompanhando-se o título por dot blot. Após a sangria dos coelhos, o sangue foi centrifugado, deixado coagular e depois o soro foi recuperado. O soro contendo as imunoglobulinas foi adsorvido com membranas de nitrocelulose impregnadas com canavalina (0,5 mg/mL em NaPB 50mM) e concanavalina-A (0,5 mg/mL em Tris HCL 50 mM) para retirada de anticorpos inespecíficos. Adicionalmente, uma aliquota do anticorpo foi adsorvido em membranas impregnadas de extrato bruto de sementes de algodão.

7. Histologia e imunolocalização.

Para avaliação ao microscópio óptico, os tecidos dos insetos tratados e controles foram preparados segundo Veiga *et al.*, 2001. Os insetos de terceiro e quarto instares foram fixados em formaldeído 4% tamponado (pequenos cortes foram feitos ao longo do inseto para melhorar a entrada do fixador), desidratados em série alcoólica, e embebidos em historesina (Leica). Realizou-se cortes seriados transversais e longitudinais do inseto (micrótomo Leica 2145) com espessura de 3 a 7 µm. A coloração empregada foi azul de metileno/fucsina básica. Os cortes foram montados entre lâminas e lamínulas e com Entelan para observação em microscópio óptico.

8. Imunodifusão

A imunodifusão foi realizada segundo Outchterlony (1958) usando géis de agarose a 1%, em 20 mM de fosfato de sódio, 150 mM NaCl, pH 7,0, com 0,02% NaN₃.

Depois da difusão por 48 horas à temperatura ambiente, os géis foram lavados em salina e água destilada, secos e corados com coomassie blue.

9. Dot blot

As amostras (0,5 a 1,0 ng de proteína por spot,) de homogeneizados da cabeça, intestino e o restante do corpo (insetos controle) foram aplicadas diretamente em pedaços (1 cm²) de membrana de nitrocelulose (GE-Lifesciences), acomodadas em placas de 16 poços. As membranas foram bloqueadas com TBS 1X, 5% de leite desnatado, 0,05% de Tween por 1h 30min à temperatura ambiente sob agitação. Depois de lavar 3 x com tampão de lavagem (TBS 1X, 0,05% de Tween) as membranas foram incubadas *overnight* sob agitação com uma solução de urease (2 µg em 1 mL, em cada poço) em diferentes soluções: 1) NaPB 20mM, EDTA 1mM, 2-mercaptoetanol 5mM pH 7,5; 2) formiato de amônio pH 5,6; 3) TBS 1x, pH 7,5. As membranas foram lavadas com o tampão de lavagem 3x e incubadas com o anticorpo anti-urease (diluição 1:10.000) por 2 h, à temperatura ambiente. Após nova lavagem, as membranas foram então incubadas com o anticorpo secundário contra IgG de coelho marcado com fosfatase alcalina (diluição 1:20.000) por 2 h, à temperatura ambiente. Depois de lavada 3x com o tampão de lavagem, as membranas foram colocadas na solução de revelação (Tris H-Cl 0,2M pH 9,0; NaCl 0,1M; MgCl 2,5mM; 0,75 µM de nitroblue tetrazolium (NBT) e 30 nM de 5-bromo-4-cloro-indoil-fosfato (BCIP).

10. Western-Blot

As amostras de homogeneizados de tecidos (fervidas e não fervidas) foram separadas por SDS-PAGE 8% ou 10% ou em gel nativo (gradiente de poliacrilamida 4 a 15%) e transferidas para membrana de PVDF (0,2 um) previamente ativada com metanol 100% (adaptado de Fitches *et al.*, 2001). A membrana foi bloqueada com 5 % de leite desnatado por 2 h, em seguida incubada com anticorpo anti-urease desenvolvido em coelho, com diluição de 1:20.000 em TTBS (0,15 M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7,4 com 0,05% de Tween 20 e 1,5% de Leite Desnatado) por 2 horas. Após lavagem com TBS (3x), a membrana foi incubada com anti-IgG de coelho, conjugado com fosfatase alcalina por 2 h (diluições 1:25.000; 1:20.000; 1:10.000). Depois de nova lavagem (3x), as membranas foram reveladas para atividade fosfatásica em uma solução de NBT e BCIP, diluídos em tampão Tris H-Cl 0,2M pH 9,0; NaCl 0,1M; MgCl 2,5mM.

Alternativamente, os homogeneizados foram incubados *in vitro* com soluções de urease numa relação de 1:1 (massa de proteína) *overnight* em NaPB 20mM, EDTA 1mM, 2-mercaptoetanol 5mM pH 7,5 a 4 C. Depois, as amostras foram submetidas à separação eletroforética em gel nativo (gradiente de poliacrilamida, de 8 – 15%), seguido de Western Blot, conforme descrito acima.

11. Overlay ou ligand blot

Os homogeneizados de tecidos de *D. peruvianus* (fervidos ou não fervidos) foram separados por SDS-PAGE 8 % ou 10% ou gel nativo (gradiente de poliacrilamida 8 a

15%) e as proteínas transferidas para membrana de PVDF previamente ativada com metanol 100% (adaptado de Fitches et al., 2001). A membrana foi bloqueada com 5% de caseína e todas as etapas posteriores foram realizadas em tampão TBS 1X. A membrana foi incubada com uma solução de urease (1,0 A280) por 2 h a temperatura ambiente ou overnight à 4° C, seguida de incubação com anticorpo policlonal desenvolvido em coelho contra urease (diluição 1:10.000) por 2 h à temperatura ambiente, e incubação com anticorpo secundários anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma Chem. Co.) (diluição 1:25000) por 2 h a temperatura ambiente. Depois de lavagem 3x, as membranas foram colocadas numa solução de revelação (Tris H-Cl 0,2M pH 9,0; NaCl 0,1M; MgCl 2,5mM; NBT +BCIP).

12. Cromatografia de afinidade com urease imobilizada

Alíquotas de 500 µl da resina Chelating Sepharose Fast Flow (GE-Healthcare) foram colocadas em tubos eppendorf de 1,5 mL e lavadas por centrifugação (vortex por 1 min) com água destilada. Em seguida, adicionou-se a cada eppendorf 500 µL de solução de NiCl₂ 1M em água destilada. O excesso de NiCl₂ foi retirado lavando-se a resina com água. A resina foi equilibrada com tampão NaPB 20mM, 150mM ou 500mM NaCl, pH 7.0 (5 mL cada etapa, 500 µL cada vez no vortex) e em seguida, adicionou-se volume de solução de urease contendo 300 µg ou 1,0 A280, no mesmo tampão. Após 2 h a 4 C, a resina foi lavada para remoção da urease não ligada com tampão NaPB 20mM, pH 7.0, contendo 150 mM ou 500 mM NaCl. Em seguida, foram adicionados os homogeneizados (cabeça, intestino, corpo: 100 µl contendo ~50 µg de proteínas), e incubados com a resina *overnight*.

A resina foi então eluída com tampão NaPB 20mM, pH 7.0, contendo 150mM ou 500 mM NaCl, e em seguida, eluída com 250 mM de Imidazol. Os materiais eluídos com tampão e com imidazol foram aplicados em gel SDS-PAGE 8% ou 10% para análise.

13. ELISA

Os antígenos foram adsorvidos em placas de ELISA em concentrações variadas (ureases de *C. ensiformis*: 0,007 a 1,0 µg de proteína; urease de *G. hirsutum*: 0,2 a 7,8 µg de proteína/ por poço) em 50 µl de solução NaPB 20mM, EDTA 1mM, 2-mercaptoetanol 5mM pH 7,5. A seguir, as placas foram incubadas na solução de bloqueio TBS 1X contendo 1% p/v leite desnatado. As placas sensibilizadas foram expostas a um anticorpo policlonal anti-urease desenvolvido em coelhos (diluições 1:5.000) por 2 h, e após lavagem, incubada por mais 1 h com anticorpo secundário anti-IgG de coelho (1:10.000), marcado com fosfatase alcalina (Sigma Chem. Co). Para a revelação, adicionou-se a cada poço 50 µl da solução de revelação 1 mM p-nitrofenil fosfato, 10 mM borato de sódio, 0,25 mM MgCl₂ pH 9,8, incubando-se por 30 minutos a temperatura ambiente. A hidrólise do substrato foi avaliada por leitura da absorbância de 450 nm em um leitor de microplacas SpectraMax® (Molecular Devices), e analisada com o software SoftMaxPro, para a construção de curvas padrões em função da concentração de urease.

14. Produção dos Anticorpos Monoclonais

A produção de anticorpos monoclonais foi realizada com a colaboração de Aline Baldi, sob orientação do Dr. Fernando Kreutz, na FK-Biotecnologia.

Resumidamente, dois grupos de três camundongos BALB/c foram imunizados com uma mistura das isoformas CNTX e JBU (1:6 p/p). Cada animal recebeu quatro imunizações com 50 µg de proteína cada. As três primeiras injeções foram intraperitoneais com intervalos de 2 semanas. Na primeira, a proteína foi emulsionada em adjuvante completo de Freund (ACF), na segunda, a emulsão foi feita com o adjuvante incompleto de Freund e na terceira imunização, as proteínas foram diluídas em tampão fosfato de sódio-salina (PBS) 1x. Três dias antes da fusão, uma quarta dose foi administrada por injeção intra-esplênica em cada camundongo. Células SP2/0 (mielócitos de camundongo) e os esplênócitos foram fusionados com polietileno glicol (PEG), ressuspensas em meio aminopterina-hipoxantina-timidina (HAT) para seleção das células híbridas e plaqueadas na presença de macrófagos. Os hibridomas resultantes dessa fusão foram pré-selecionados contra a mistura das isoformas. Aqueles que reagiram positivamente foram isolados e nova seleção foi feita utilizando-se as proteínas purificadas (CNTX, JBU) e o peptídeo jaburetox-2 Ec. A seleção foi feita por ELISA, como descrito acima.

15. Seleção dos clones

As placas de ELISA foram sensibilizadas com 50 µl por poço de uma solução 10 µg/mL do antígeno (CNTX, JBU ou jaburetox-2Ec) por 18 horas a 4° C. As placas foram lavadas 3 X com PBS 1X, e bloqueadas com BSA 3% por 1 hora. Alíquotas de 100 µl dos sobrenadantes das culturas de hibridomas foram adicionados em cada poço e incubados por 1 hora. O anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase foi adicionado, incubado por 1 hora, e depois retirado o excesso por lavagens.

Todas as incubações ocorreram à temperatura ambiente sob agitação. A atividade da peroxidase foi medida com os substratos 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) e peróxido de hidrogênio, parando-se a reação após 10 min com ácido sulfúrico. As placas foram lidas para absorbância a 450 nm no leitor de placas SpectraMax, e as leituras foram analisadas com o software SoftMaxPro.

RESULTADOS

1. Identificação de proteínas presentes nos tecidos do *Dysdercus peruvianus* que interagem com as ureases *in vitro*.

Como abordagem inicial, a técnica de dot blot foi utilizada para caracterizar a interação entre as ureases e os homogeneizados dos insetos. Observamos (resultados não mostrados) que os controles dos homogeneizados (0,5 µg de proteína no spot), não incubados com JBU, davam reação positiva nos dot blots com diluições de até 1:10000 do anticorpo primário (policlonal anti-urease). Diferentes condições foram testadas visando otimizar o processo de interação *in vitro* entre ligantes, de tal modo a permitir a caracterização dessa interação. Para tal, fizemos Dot Blots utilizando três tampões de uso comum no laboratório: NaPB 20 mM, EDTA 1mM, 2-mercaptoetanol 5 mM pH 7,5, que é o tampão normalmente utilizado para armazenar a urease em sua forma estável e ativa; formiato de amônio pH 5,6, com o mesmo pH encontrado no intestino desses insetos; e TBS 1x pH 7,5, por ser o tampão utilizado nas outras etapas dos ensaios de blot. Não houve diferenças nos resultados dos Dot blots, indicando que a ligação do anticorpo anti-urease diretamente aos homogeneizados (cabeça, intestino e o resto do corpo) ocorre igualmente nos três tampões.

O Dot Blot demonstrou que o anticorpo policlonal anti-urease reconhece epítopo(s) nos homogeneizados de *D. peruvianus*, mesmo quando os insetos controle estão em prolongado jejum. No entanto, esse reconhecimento não foi visto nos Western blots,

quando os homogeneizados de tecidos são previamente separados por SDS-PAGE. Após a desnaturação preparatória com o SDS, com ou sem fervura das amostras, apenas a urease de *C. ensiformis* foi reconhecida pelo anticorpo, não sendo detectada qualquer banda imunorreativa nos homogeneizados de tecidos dos insetos controles. A incubação *in vitro* dos homogeneizados de tecidos do inseto com a urease por 16 horas nas condições testadas, seguida de Western blot, não produziu resultado diferente, mesmo quando os homogeneizados foram submetidos à separação em gel nativo (sem detergente e sem fervura). Esses resultados negativos sugerem que os anticorpos policlonais anti-urease utilizados reconhecem epítomos conformacionais de urease/fragmentos presente(s) nos tecidos dos insetos (figuras 3A e 3B).

Não foi possível detectar, em nenhuma das condições testadas nos ensaios de “overlay”, a ligação da urease com proteínas dos homogeneizados de tecidos dos insetos, após separação destes por eletroforese e transferência para membranas de nitrocelulose.

Utilizamos a cromatografia de afinidade com urease imobilizada como alternativa aos ensaios utilizando o anticorpo policlonal anti-urease. Nessa técnica, a urease nativa foi imobilizada na resina cromatográfica através da sua afinidade por níquel. Os homogeneizados de tecidos dos insetos foram aplicados na coluna e, após retirada das proteínas não retidas, procedeu-se a duas etapas de eluição, a primeira através de um aumento da força iônica com NaCl, e a segunda com imidazol, nesse caso “desligando-se” também a urease da resina. A análise por SDS-PAGE das proteínas eluídas da resina com urease imobilizada foi semelhante nos experimentos e no controle (onde não havia a urease imobilizada na resina) (dados não mostrados). Uma explicação para esse resultado seria

que proteínas presentes nos homogenizados dos tecidos possuem também afinidade pelo metal quelado (Ni), mascarando qualquer interação com a urease imobilizada.

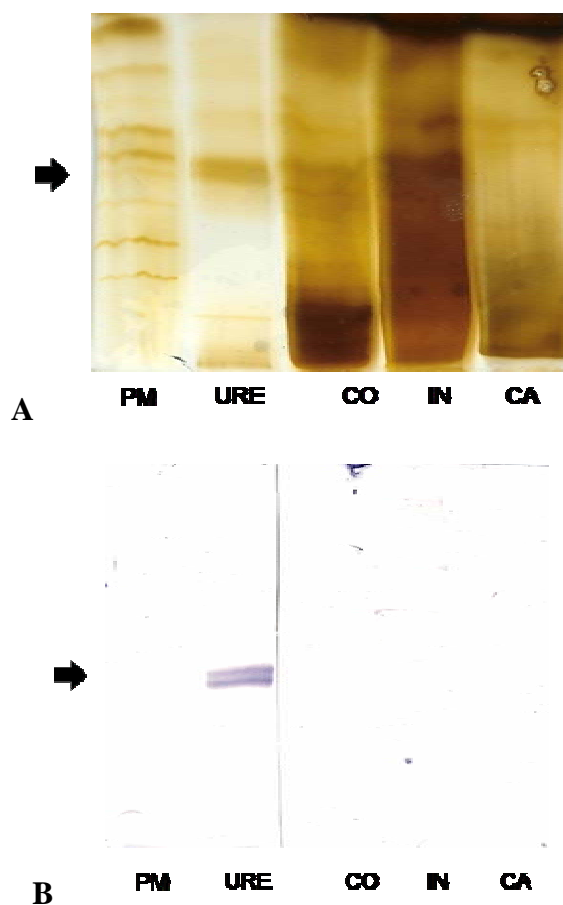


Figura 3: (A) SDS-PAGE e (B) Western Blot dos homogeneizados de *D. peruvianus*: (PM) padrão de peso molecular; (URE) urease de *C. ensiformis* 5 μ g; (CO) homogeneizado do corpo, 15 μ g; (IN) homogeneizado do intestino 15 μ g; (CA) homogeneizado da cabeça 15 μ g. (A): gel 10 % de poliacrilamida, corado com prata. (B): Western blot, anticorpo anti-urease (1:5000) de coelho e anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:10000), revelado com BCIP e NBT. A seta indica a banda do monômero da urease de *C. ensiformis*, com ~95 kDa.

Ensaio preliminares de imunohistoquímica utilizando cortes de tecidos de *D. peruvianus* (não alimentados com JBU) e anticorpos policlonais anti-urease mostraram uma forte marcação inespecífica, que inviabilizou o uso dessa técnica para os objetivos propostos. Como esse inseto se alimenta de sementes de algodão, que contem uma urease endógena (GHU), esta poderia estar sendo reconhecida pelo anticorpo policlonal anti-urease de *C. ensiformis*, mesmo após a adsorção do anticorpo com extratos de algodão.

Realizamos ensaios de imunodifusão utilizando o anticorpo policlonal anti-urease para avaliar a imunorreatividade cruzada de extratos brutos de sementes de algodão e de feijão-de-porco. Nas melhores condições do ensaio, obtivemos linhas de precipitação para o extrato de algodão após 48 horas, enquanto que para o extrato de *C. ensiformis* essas já eram visíveis após 24 horas de corrida (dados não mostrados).

Em seguida avaliamos o reconhecimento de GHU (purificada ou no extrato bruto da semente) nos testes de ELISA, utilizando-se os anticorpos policlonais anti-urease *C. ensiformis* (Figuras 4 e 5). O comportamento da curva dose-resposta para a GHU no ELISA tende a fugir da linearidade, mesmo para a proteína purificada (Figura 5). Vários fatores podem contribuir para isso: no extrato bruto pode haver outros compostos que “sequestram” os anticorpos, como lectinas, por exemplo; por outro lado, essa observação indica que apenas parte dos determinantes antigênicos da JBU estão presentes na GHU.

Ensaio de atividade ureásica indicaram que a semente de algodão possui cerca de 116 U da enzima/g de farinha, um conteúdo mais baixo de urease comparado às sementes de leguminosa (o feijão-de-porco tem 720 U/g farinha). A GHU purificada segundo Menegassi *et al.*, 2007, apresenta uma atividade específica de 29 U por mg de proteína.

Avaliando a imunorreatividade cruzada entre a urease de algodão e a urease de *C.ensiformis* por ELISA, constatamos que os anticorpos policlonais anti-JBU reconhecem menos eficientemente a GHU, com uma diferença de afinidade de cerca de 100 vezes. Essa diferença no ELISA foi vista tanto utilizando-se a GHU purificada, como titulando sua presença no extrato bruto (Figuras 4 e 5). Segundo o resultado do ELISA, o extrato bruto de algodão teria cerca de 0,1 µg de urease por µl do extrato bruto. Considerando a concentração protéica de 4,1 mg/mL desse extrato (0,2 g farinha/mL), o ELISA indicou 0,024 mg GHU por mg de proteína do extrato, ou ainda, a partir da atividade específica da GHU purificada, o extrato bruto de algodão teria cerca de 14 U de GHU por g de semente.

Em resumo, ainda que o reconhecimento da GHU pelos anticorpos policlonais anti-urease *C.ensiformis* disponíveis subestimem em 5 a 10 vezes os níveis da enzima, o alto grau de homologia entre as ureases em geral e a conseqüente imunorreatividade cruzada obtida com anticorpos policlonais, mostram que a abordagem imunohistoquímica convencional tem pouca chance de sucesso.

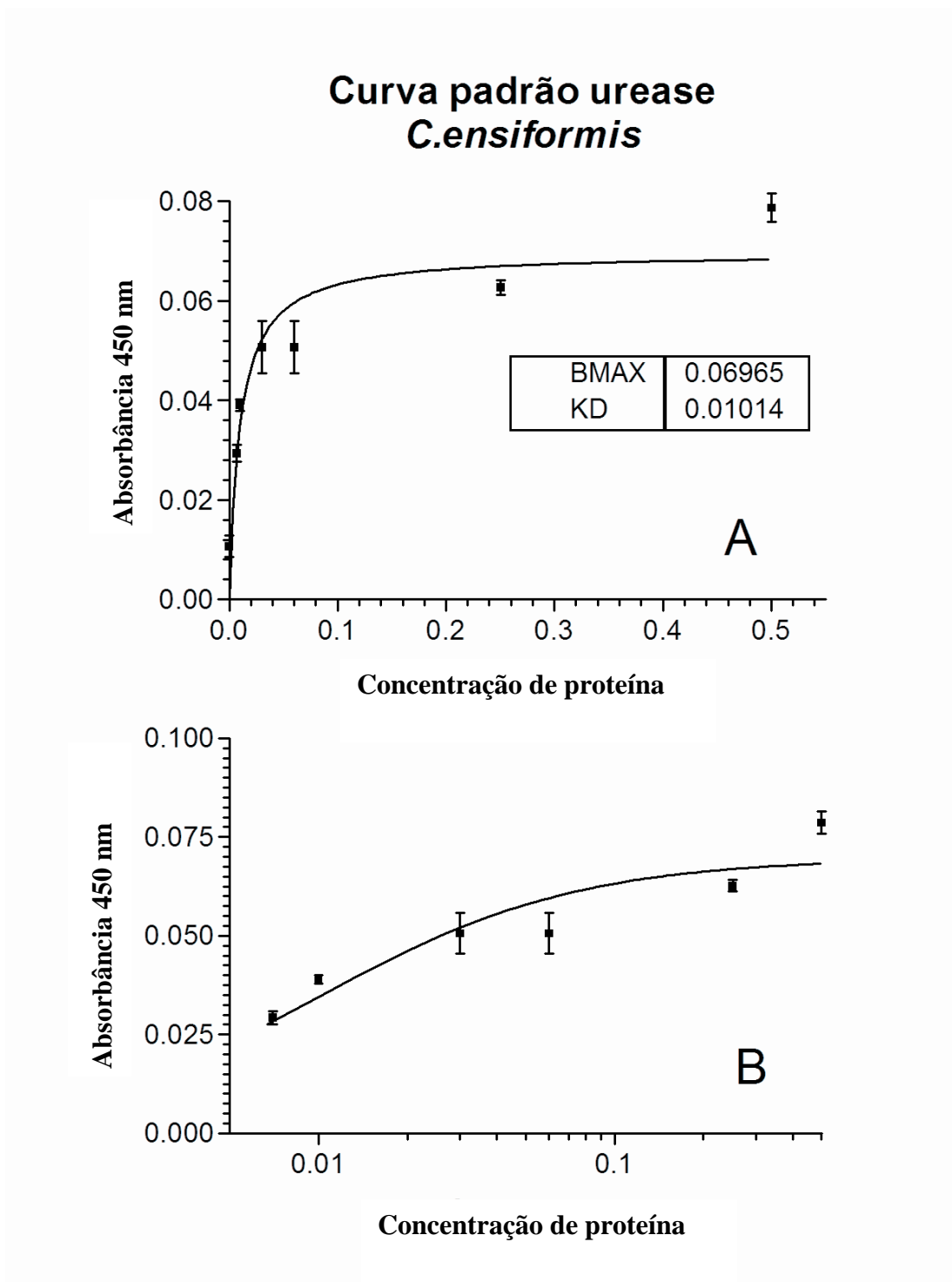


Figura 4: Curva padrão da urease de *C. ensiformis* utilizando anticorpos policlonais contra JBU, por ELISA: (A) Curva padrão de urease de *C. ensiformis* purificada (B) Apresentação logarítmica da curva padrão. Resultados são médias de triplicatas \pm desvio padrão.

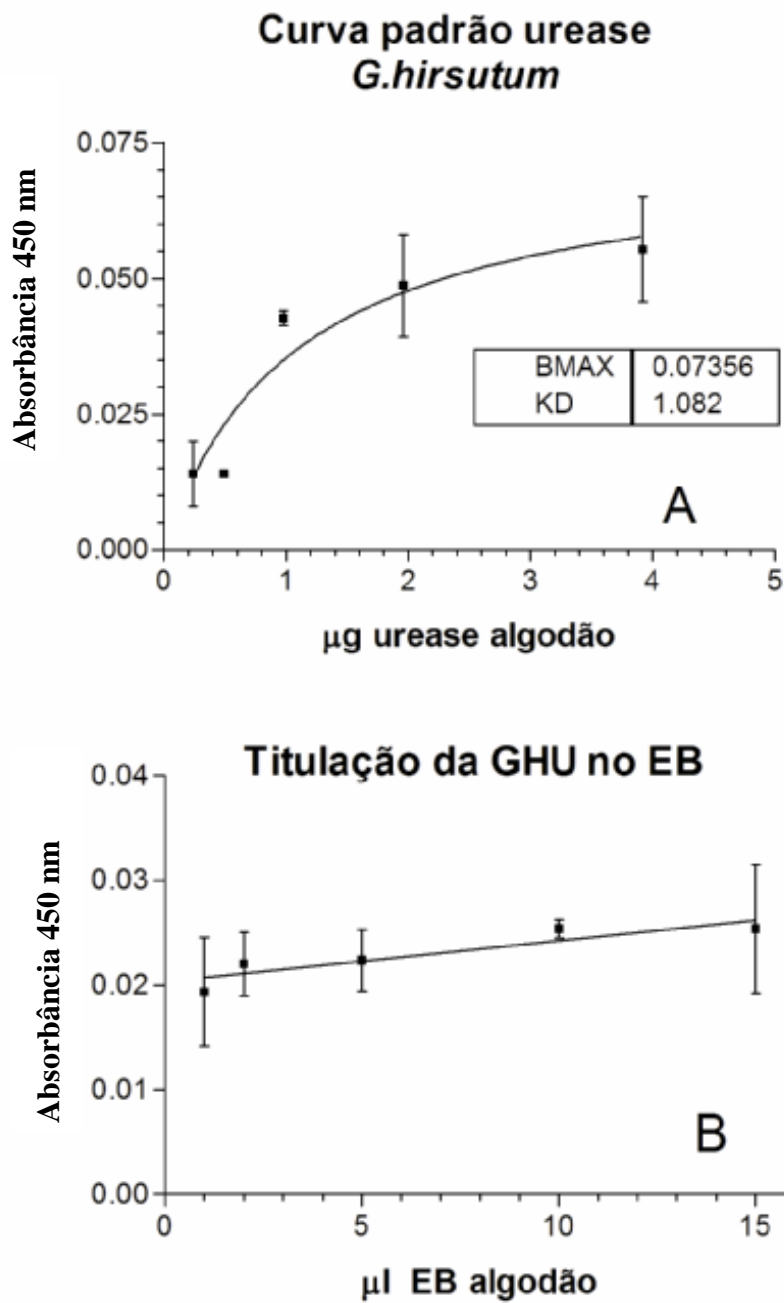


Figura 5. Curva padrão e titulação da da urease de algodão por ELISA: (A) Curva padrão de GHU purificada conforme Menegassi et al., 2007. (B) Titulação da urease de GHU no extrato bruto de semente de algodão. Resultados são médias de triplicatas \pm desvio padrão.

2. Produção de Anticorpos Monoclonais anti-Urease de *C. ensiformis*

A fusão de esplenócitos dos camundongos imunizados com os mielomas resultou em 500 poços contendo hibridomas. Os sobrenadantes das culturas de hibridomas foram inicialmente testados por ELISA em placas sensibilizadas com uma mistura das isoformas, CNTX (15%) e urease (85%). Desses, 96 poços foram selecionados, por apresentarem maior reatividade na avaliação inicial, sendo transferidos para uma nova placa para crescimento. Um segundo ciclo de seleção desses clones foi realizado utilizando três diferentes antígenos purificados: CNTX, JBU e o peptídeo jaburetox 2-Ec (Figura 6).

Os resultados mostram que, mesmo imunizando os camundongos com uma mistura de CNTX e de JBU, é possível obter hibridomas produtores de anticorpos monoclonais que reconhecem mais especificamente uma das isoformas, ou o peptídeo recombinante. Dos 96 poços, verificamos que 22 destes foram mais responsivos às isoformas, ou ao peptídeo recombinante. Assim, os hibridomas dos poços 72 e 7 produziram anticorpos com maior especificidade pela CNTX (cerca de 4 vezes em relação à urease ou o peptídeo). Dois poços, 21 e 57, foram mais específicos para JBU (cerca de 2 vezes). Embora o sobrenadante de todos os poços tenham reconhecido o fragmento tóxico, o poço 37 reconheceu o peptídeo recombinante com maior especificidade (resposta 1,5 maior para o jaburetox 2-Ec do que CNTX ou urease).

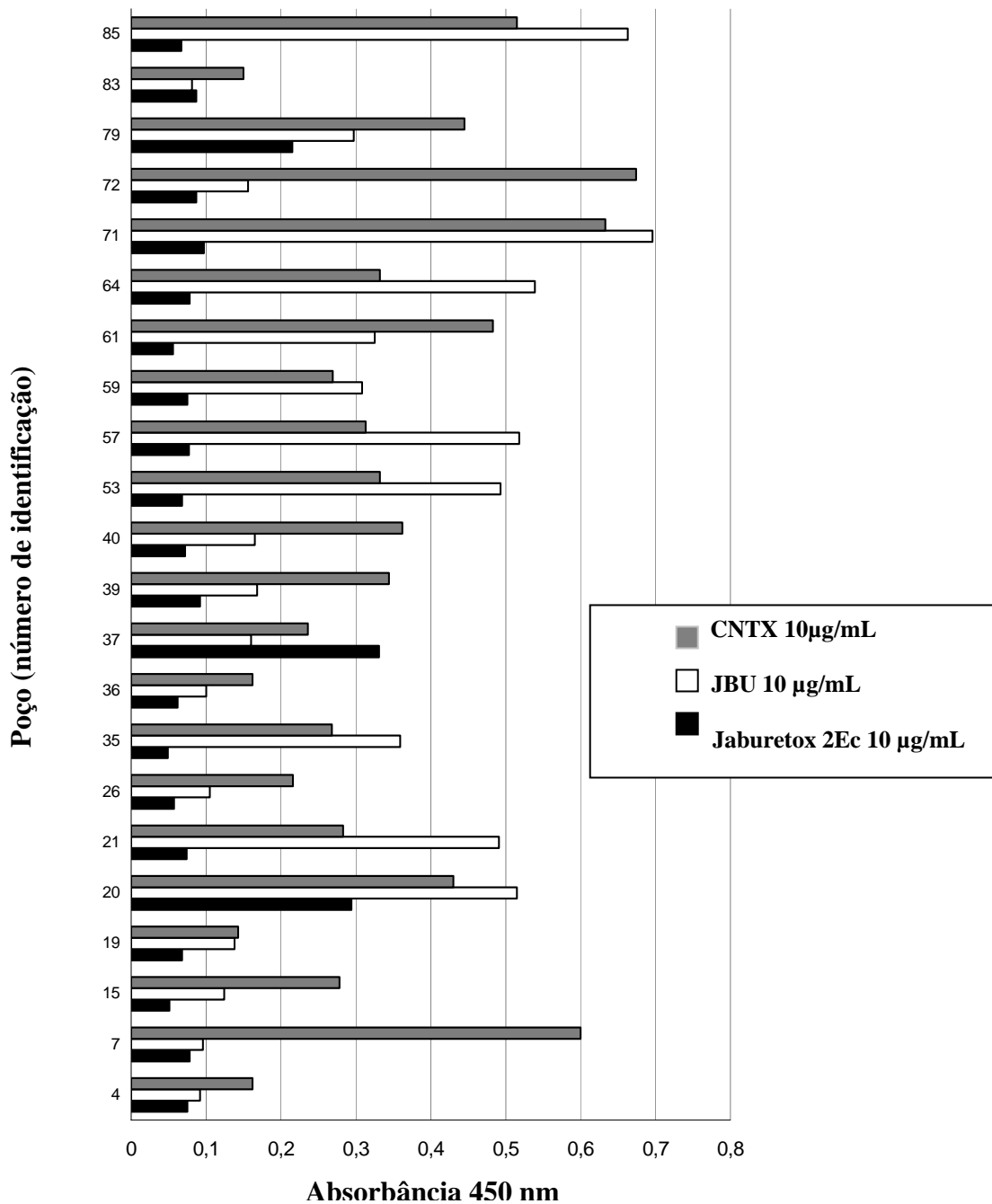


Figura 6: Sobrenadantes das culturas de hibridomas foram testados contra CNTX, urease de *C. ensiformis* e peptídeo tóxico. Os números na vertical correspondem ao número do poço da cultura de hibridoma. (* clone mais específico para CNTX; ** específico para JBU; *** específico para Jaburetox 2Ec)

DISCUSSÃO

O reconhecimento de proteínas “endógenas” nos tecidos do inseto pelo anticorpo policlonal anti-urease disponível impossibilitou os estudos de imunolocalização da urease. Mesmo utilizando diferentes condições para incubação e altas diluições do anticorpo, ainda se observa a interação do anticorpo anti-urease com os homogeneizados.

Essa interação pode ser explicada, em parte pela presença de urease nas sementes de algodão (Menegassi *et al.*, 2007), que serve como alimento do inseto modelo *D. peruvianus*. Fragmentos da proteína poderiam estar presentes mesmo nos tecidos dos insetos mesmo em prolongado jejum.

Outro motivo poderia ser a ocorrência de proteínas do inseto que possuam homologia com as ureases. Stanisçuaki e colaboradores (dados não publicados) detectaram uma banda de 90 kDa imunoreativa para anticorpos anti-urease de *C. ensiformis* em Western blot de extratos de tecido nervoso de *Rhodnius prolixus*. Como esse inseto é hematófago, a origem dessa proteína imunoreativa permanece desconhecida, não sendo provavelmente proveniente do repasto de sangue do percevejo. Uma consulta aos bancos de dados revela a existência de uma seqüência de cDNA (Q7PED9) que codificaria uma proteína homóloga ao N-terminal de ureases de plantas no mosquito *Anopheles gambiae*. Outra fonte alternativa dessa urease no *R. prolixus* ou mesmo no *D. peruvianus* poderiam ser microrganismos simbiotes (bactérias, fungos ou protozoários) que estão presentes em vários insetos.

Uma alternativa para esses estudos seria a obtenção de anticorpos monoclonais capazes de diferenciar as isoformas de urease das diferentes sementes, o que potencialmente permitiria realizar a imunolocalização da urease de *C. ensiformis* nos tecidos do inseto *Dysdercus peruvianus*, apesar da presença da urease/fragmentos de algodão provenientes da fonte alimentar.

Nossos resultados mostram que é possível obter-se anticorpos monoclonais que diferenciam a isoforma minoritária CNTX da urease majoritária da *C. ensiformis*, ainda que exista entre elas uma homologia estimada em mais de 85%. A imunização dos camundongos com uma mistura das isoformas de urease de *C. ensiformis* resultou em 22 poços com imunoreatividade positiva. Desses, quatro foram capazes de diferenciar as isoformas: dois foram mais específicos para a CNTX, (72 e 7), e dois, para a urease, (21 e 57). Um poço, 37, foi mais específico para o peptídeo inseticida. Considerando que em cada poço havia uma mistura de clones, já que não chegamos a realizar a diluição limitante, espera-se que a especificidade para cada isoforma e para o peptídeo seja maior após o isolamento de cada clone.

A obtenção dos anticorpos monoclonais contra as isoformas de urease é dificultada pela necessidade de obter cada isoforma pura e em quantidade suficiente para as imunizações. Nesse trabalho pudemos observar que esse pré-requisito não é fundamental para a produção de anticorpos monoclonais, pelo menos nas etapas de imunização. Além disso, a sobrevivência dos camundongos também é fator que exige atenção, pois a CNTX é uma proteína letal para esses animais quando administrada por via intraperitoneal, sendo que a quantidade de proteína administrada em cada imunização obviamente não pode ultrapassar a dose letal da toxina (cerca de 2 mg/kg).

Ainda que não tenha sido possível testar a imunoreatividade da urease de algodão contra esses anticorpos monoclonais, ou utilizá-los para os ensaios de imunolocalização, muito provavelmente será possível encontrar um monoclonal que reconheça apenas as ureases de *C.ensiformis*, sem ter imunoreatividade cruzada com a urease endógena do algodão.

Outras abordagens para um estudo histoquímico ainda são possíveis, como a marcação da urease com um fluoróforo, e visualização “direta” da proteína no tecido-alvo. Resultados preliminares mostraram que a marcação da urease com 2-(4'-isothiocyanate-2'-hydroxyphenyl)benzothiazole (4b) (Rodembusch *et al.* 2005) é eficiente, no entanto os homogeneizados de tecidos dos insetos emitem uma fluorescência intrínseca no mesmo comprimento de onda desse fluoróforo. O uso de outros tipos de sondas fluorescentes seria uma alternativa para contornar esse problema.

A interação das ureases com membranas de eritrócitos (Follmer *et al.*, 2001), com proteínas da hemolinfa do bicho da seda (Kurahashi *et al.*, 2005) ou do barbeiro (Ferreira-daSilva *et al.*, 2000) já foram descritos. Sabe-se que, após ingestão, essa proteína é absorvida, passando do lúmen intestinal para a hemolinfa do inseto (Kurahashi *et al.*, 2005). Ainda que o peptídeo derivado da urease após digestão seja provavelmente o principal agente tóxico para o inseto, a holoproteína também parece exercer efeitos per se. Assim, Stanisçuaski (2007), descreveu a interação *in vitro* da urease com vários órgãos de *Rhodnius prolixus*, como túbulos de Malpighi e o estômago.

No presente trabalho, não conseguimos observar a interação das ureases com nenhum dos tecidos avaliados nos ensaios, mesmo utilizando diferentes condições. É provável que, a interação esteja ocorrendo, mas seja muito lábil, e não esteja sendo

detectada pelos métodos aqui utilizados. Novas modificações deverão ser feitas nos ensaios visando possibilitar a visualização ou medida dessa interação, como por exemplo, cross-linking entre a urease e as estruturas-alvo, ou estudos por ressonância plasmônica de superfície.

CONCLUSÕES

As metodologias utilizadas para visualizar a interação entre moléculas presentes nos homogeneizados dos insetos e a urease mostraram-se ineficazes nas condições testadas.

Os anticorpos policlonais contra JBU reconhecem GHU com uma afinidade cerca de 100 vezes menor. Apesar disso, a imunorreatividade cruzada com a GHU ou fragmentos provenientes do algodão ingerido, presentes nos tecidos de *D.peruvianus*, inviabilizaram o uso de técnicas de imunohistoquímicas para identificação de alvos da urease no inseto.

Demonstramos ainda que é possível produzir anticorpos monoclonais que diferenciam as isoformas de urease de *C.ensiformis*, apesar das proteínas apresentarem no mínimo 85% de identidade. Assim, a obtenção de anticorpos monoclonais que discriminem ureases de diferentes fontes pode ser uma alternativa para os estudos imunoquímicos visando determinar tecidos-alvos em insetos que se alimentem de fontes produtoras de urease, como o *Dysdercus peruvianus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARCELOS, J.; WASSERMANN, G. E.; OLIVERA-SEVERO, D.; CARLINI, C. R. Purification and Characterization of Urease(s) in *Gossypium hirsutum*. In: *XXXIII Reunião Anual da SBBq, Caxambú – MG. XXXIII Reunião Anual Programas e índices*, 2004.
2. BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J. A. & CARLINI, C. R. Canatoxin, a plant protein, induces insulin release from isolated pancreatic islets. *Endocrinology*, 128: 675-679, 1991a.
3. BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J. A. & CARLINI, C. R. Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon*. 29: 453-460, 1991b.
4. BENNETT, J & WREN, E.A. The interaction of p-nitrophenyl carbamate with urease, *Biochim. Biophys. Acta*, 482: 421-426, 1977.
5. BECKER-RITT, A. B.; MARTINELLI, A. H. S.; MITIDIERI, S.; FEDER, V.; WASSERMANN, G. E.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; OLIVEIRA, J. T. A.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G. & CARLINI, C. R. Antifungal activity of plant and bacterial ureases, *Toxicon*, 50(7): 971-983, 2007.
6. BLUM, H., BEIER, H. & GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 8:93-99, 1987.
7. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72: 248-254, 1976.

8. CARLINI, C. R. & GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin-A. *Toxicon*, 19: 667-676, 1981.
9. CARLINI, C.R. & GUIMARÃES, J. A. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon*, 29: 791-806, 1991.
10. CARLINI, C. R.; GOMES, C. B.; GUIMARÃES, J. A.; MARKUS, R. P.; SATO, H. & TROLIN, G. Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. *Acta Pharmacol. Tox.*, 54: 161-166, 1984.
11. CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A.; RIBEIRO, J. M. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. *Br. J. Pharmacol.*, 84: 551-560, 1985.
12. CARLINI, C. R.; OLIVEIRA, A. E.; AZAMBUJA, P.; XAVIER-FILHO, J.; WELLS, M. A. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *J. Econ. Entomol.*, 90: 340-348, 1997.
13. CARLINI, C. R., & UDEDIBIE, A. B. Comparative effects of processing methods on hemagglutinating and antitryptic activities of *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brazilienses* seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 4372-4377, 1997.
14. CCAC *guidelines on: antibody production*. 43 pg. Canadian Council on Animal Care, 2002.

15. DIXON, N. E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R. L. AND ZERNER, B. Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). Letter: A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *Journal of the American Chemical Society*, 97: 4131-4133, 1975.
16. DIXON, N. E.; HINDS, J. A.; FIELLY, A. K.; GAZZOLA, C.; WINZOR, D. J.; BLAKELEY, R. L. & ZERNER, B. Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). IV. The molecular size and the mechanism of inhibition by hydroxamic acids. Spectrophotometric titration of enzyme with reversible inhibitors. *Canadian Journal of Biochemistry*, 58: 1321-1334, 1980.
17. FEIR, D. *Oncopeltus fasciatus*: a research animal. *Rev. Ent.*, 19: 81-96, 1974.
18. FERREIRA-DASILVA, C. T.; GOMBAROVITS, M. E.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C. M. & CARLINI, C. R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch Insect Biochem Physiol.*, 44 (4): 162-71, 2000.
19. FISHBEIN, W. N. The structural basis for the catalytic complexity of urease interacting and interconvertible molecular species (with a note on isozyme classes). *Annals New York Academy of Sciences*, 147: 857-881, 1969.
20. FITCHES, E.; WOODHOUSE, S. D.; EDWARDS, J. P.; GATEHOUSE, J. A. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin: GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. *Journal of Insect Physiology*, 47: 777-787, 2001.
21. FOLLMER, C.; BARCELLOS, G. B.; ZINGALI, R. B.; MACHADO, O. L.; ALVES, E. W.; BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J. A & CARLINI, C. R.

- Canatoxin, a toxin 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: 217-24, 2001.
22. FOLLMER, C.; YONEMA, M. L.; DIAS, J. F.; CARLINI, C. R. PIXE analysis of urease isoenzymes isolates from canavalia ensiformis (jack bean) seeds. *Nuclear Instr. Meth. Phys. Res., Part B*, 189: 482-486, 2002.
23. FOLLMER, C.; WASSERNANN, G. E.; CARLINI, C. R. Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Science*, 167:241-246, 2004.
24. FOLLMER, C. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*, 69(1):18-28, 2008.
25. GALLO, D (Ed.). Manual de Entomologia Agrícola. Segunda Edição. CERES. São Paulo. 649p. 1988.
26. GHAZALEH, F. A.; FRANCISCHETTI, I. M.; GOMBAROVITS, M. E.; CARLINI, C. R. Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin: methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP. *Arch. Biochem. Biophys.*, 15: 339(2):362-7, 1997.
27. GOLDRAIJ, A. & POLACCO, J. C. Arginase is inoperative in developing soybean embryos. *Plant Physiol.*, 119(1): 297-304, 1999.
28. GOMBAROVITZ, M. C. Peptídeos Entomotóxicos gerados a partir da Canatoxina: obtenção, isolamento, propriedades biológicas e caracterização físico-química. *Dissertação de Mestrado, UFRJ, Brasil*, 1999.

29. GOOLDCHILD, A. J. P. Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. *Biol. Rev.*, 41: 97-140, 1966.
30. HIRAYAMA, C.; SUGIMURA, M.; SAITO, H.; NAKAMURA, M. Host plant urease in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 46:1415-1421. 2000
31. HIROTA, K.; NAGATA, K.; NOROSE, Y.; FUTAGAMI, S.; NAKAGAWA, Y. SENPUKU, H.; KOBAYASHI, M. & TAKAHASHI, H. Identification of an antigenic epitope in *Helicobacter pylori* urease that induces neutralizing antibody production. *Infection and Immunity*. 69(11): 6597-6603, 2001.
32. HORI, K. Digestive carbohydrases in the salivary gland and midgut of several phytophagous bugs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 50B: 145-151, 1975.
33. HUBER-LUKAC, M.; JAQUET, F.; LUETHY, P.; HUETTER, R.; BRAUN, D. G. Characterization Specificities of Monoclonal Antibodies to a Crystal Protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Infection and Immunity*, 54(1):228 –232, 1986.
34. HUBER-LUKAC, M.; HERBST, H.; LUETHY, P. & BRAUN D. G. Monoclonal Antibodies Against functionally distinct sites on delta δ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thurigiensis*. *Experientia*, 38: 1103 –1105, 1982.
35. HUBER-LUKAC, M.; LUTHY, P. & BRAUN, D. G. Specificities of Monoclonal Antibodies Against the Activated δ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thurigiensis*. *Infection and Immunity*, 40 (2): 608–612, 1983.
36. KARMALI, A. & DOMINGOS, A. Monoclonal antibodies against urease from *Canavalia ensiformis*. *Biochimie*, 73 (11): 1001-1006, 1993.

37. KHAN, M. R. & FORD, J. B. The distribution and localization of digestive enzymes in the alimentary canal and salivary glands of the cotton stainer *Dysdercus fasciatus*. *J. Insect Physiol.*, 13: 1619-1628, 1967.
38. KING TP. Lectin cytochemistry and intestinal epithelial cell biology. Pusztai A and Bardocz S, ed. Lectins – Biomedical Perspectives. London UK.: Taylor & Francis, 183-210. 1995.
39. KOHLER, G. & MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495-497, 1975.
40. KURAHASHI, H.; ATIWETIN, P.; NAGAOKA, S.; MIYATA, S.; KITAJIMA, S.; SUGIMURA, Y. Absorption of mulberry root urease to the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 51:1055-1061, 2005.
41. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685. 1970.
42. LAUREMA, S.; VARIS, A L. & MIETTINEN, H. Studies on enzymes in the salivary glands of *Lygus rugulipennis* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochem.*, 15: 211-224, 1985.
43. LEENAARS, M. & HENDRIKSEN C. F. M. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *ILAR Journal*, 46(3): 269 -279, 2005.
44. LITTLE, M.; KIPRIYANOV, S. M.; LE GALL, F. & MOLDENHAUER, G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunology Today*, Vol. 21(8): 364-370, 2000.

45. MENEGASSI, A.; WASSERMANN, G. E.; OLIVERA-SEVERO, D.; BECKER-RITT, A. B.; MARTINELLI, A. H. S.; FEDER, V.; CARLINI, C. R. Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds: isolation, physicochemical characterization and antifungal properties of the protein. ARTIGO SUBMETIDO. 2007.
46. MILANO, P.; CONSOLI, F. L.; ZERIO, N. G. & PARRA, J. R. P. Thermal requirements of the cotton stainer *Dysdercus peruvianus* Guerin-Menenville (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 28:233-238, 1999.
47. MILES, P. W. The saliva of Hemiptera. *Adv. Insect Physiol.*, 9: 183-255, 1972.
48. MOBLEY, H. L.; ISLAND, M. D. & HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.*, 59:451-480, 1995.
49. 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. Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides*, 28: 2042-2050, 2007.
50. MULROONEY, S. B.; PANKRATZ, H. S. & HAUSINGER, R. P. Regulation of gene expression and cellular localization of clone *Klebsiella aerogenes* (*K. Pneumoniae*) urease. *J. Bacteriol.*, 135: 1769-1776, 1989.
51. NAGATA, K.; MIZUTA, T.; TONOKATU, Y.; FUKUDA, Y.; OKAMURA, H.; HAYASHI, T.; SHIMOYAMA, T. AND TAMURA, T. Monoclonal antibodies against the native urease of *Helicobacter pylori*: synergistic inhibition of urease activity by monoclonal antibody combinations. *Infection and Immunity*, 60(11): 4826-4831, 1992.

52. OLIVEIRA, A. E. A.; GOMES, V. M.; SALES, M. P.; FERNANDES, K. V. S.; CARLINI, C. R.; XAVIER-FILHO, J. The toxicity of jack bean *Canavalia ensiformis*(L.) DC. Canatoxin to plant pathogenic fungi. *Ver. Brasil. Biologia*, 59: 59-62, 1999.
53. OLIVEIRA-SEVERO D.; WASSERMANN G. E.; CARLINI C.R. Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 39:851-861, 2006.
54. OUCHTERLONY, O. *Progr. All.* 5:1. 1958.
55. PAES, N. S.; GERHARDT, I. R.; COUTINHO, M. V.; YOKOYAMA, M.; SANTANA, E.; HARRIS, N.; CHRISPEELS, M. J.; GROSSI DE SÁ, M. F. The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. *Journal of Insect Physiology*, 46:393-402, 2000.
56. PIGGOT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 71(2):255-281, 2007.
57. PIOVESAN, A. R. Processamento de urease de *Canavalia ensiformis* por ninfas e adultos de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Trabalho de Conclusão, Curso de Ciências Biológicas Ênfase Molecular, Celular e Funcional, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.
58. POLACCO, J. C. & HOLLAND, M. A. Roles of urease in plant-cells. *Internacional Review of Cytology – A Survey of Cell Biology*, 145:65-103, 1993.

59. POLACCO, J. C. & WINKLER, R. G. Soybean leaf urease – A seed enzyme. *Plant Physiol.*, 74: 800-803, 1984.
60. REAL-GUERRA, R. Aspectos biológicos e estruturais das ureases de *Canvalia ensiformis*. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.
61. REICHE, N.; JUNG, A.; BRABLETZ, T.; VATER, T.; KIRCHNER, T.; FALLER, G. Generation and Characterization of human monoclonal scFv antibodies against *Helicobacter pylori* antigens. *Infection and Immunity.*, 4158-4164, 2002.
62. RODEMBUSCH, F. S.; LEUSIN, F. P.; MEDINA, L. F. C.; BRANDELLI, A.; STEFANI, V. Synthesis and spectroscopic characterization of new ESIPT fluorescent protein probes. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 4:254-259. 2005.
63. SAXENA, K. N. Digestion and absorption of carbohydrates in the alimentary canal of the red cotton bug, *Dysdercus koenigii*. Fabr. (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Physiol. Zool.*, 31: 129-138, 1958.
64. SILVA, C. P. & TERRA, W. R. Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 24: 493-505, 1994.
65. SILVA, C. P.; RIBEIRO, A. F.; GULBENKIAN, S. & TERRA, W. R. Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. *J. Insect Physiol.*, 41: 1093-1103, 1995.

66. SIRKO, A. & BRODZIK, R. Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica*, 47:1189-1195, 2000.
67. STANISÇUASKI, F. Ureases de *Canavalia ensiformis*: Processamento e mecanismo de ação em insetos. Tese de doutorado. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.
68. STANISÇUASKI, F., FERREIRA-DASILVA, C. T.; MULINARI, F.; PIRES-ALVES, M.; CARLINI, C. R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon*, 45: 753-760, 2005.
69. STANISÇUASKI, F., TE BRUGGE, V., CARLINI, C. R. & ORCHARD, I. Effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox 2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. 46th Annual Meeting of the Canadian Society of Zoologist, Montreal, C nada, 2007.
70. SUMNER, J. B. & HOWELL, S. F. Identification of the hemagglutinin of jack bean with Con A. *J. Bacteriol.*, 32: 227, 1936.
71. SUMNER, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.*, 69: 435 – 441, 1926.
72. TAKANONA, T. & HORI, K. Digestive enzymes in the salivary glands and midgut of the bug *Stenotus binotatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47^A: 521-528, 1974.
73. WANG, J. H. & TARR, D. A. On the mechanism of urease action *J. Am. Chem. Soc.*, 77:6205-6206, 1955.

74. WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39: 971-974. 1967.
75. UBATUBA, F. B. Occurrence of a trypsin inhibiting factor in the seeds of *Canavalia ensiformis*. *Ver. Bras. Biol.*, 15: 1 – 8, 1955.
76. VEIGA, A.B.G., BLOCHTEIN, B., GUIMARÃES, J.A, 2001. Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae). *Toxicon* 39, 1343-1351.
77. ZERNER, B. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, Urease. *Bioorganic Chemistry*, 19: 116 – 131, 1991.

ANEXO 1

CURRICULUM VITAE

(Postal, M.)

1 - DADOS PESSOAIS

Nome: Melissa Postal

Nascimento: 21/10/1980 - São Jorge/RS - Brasil

Endereço profissional: Laboratório de Proteínas Tóxicas, Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43422, SALA 204, CEP. 9150-970. Porto Alegre, RS

2 - FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2005 - Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2000 - 2004 Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

3 – FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2006 – PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS.

Curso do Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia – CBAB. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

4 - ESTÁGIOS

2001 –2002: FAPERGS – Análise ambiental da Bacia Hidrográfica do Arroio Itapuã: Moluscos. Laboratório de Malacologia, Departamento de Zoologia, UFRGS. Orientação: Inga L. V. Mendes.

2002 – 2003: CNPQ – Microanatomia do trato digestivo de formas jovens de *Dysdercus peruvianus* (Hemíptera, Pyrrhocoridae). Laboratório de Proteínas Tóxicas, UFRGS. Orientação: Célia R. Carlini.

2003 – 2004: PIBIC/CNPQ – Identificação de tecidos alvos de ureases no percevejo *Dysdercus peruvianus*. Laboratório de Proteínas Tóxicas, UFRGS. Orientação: Célia R. Carlini.

5 - CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

1. MENDES, Inga Ludmila Veitheimer, POSTAL, M.

Os Moluscos In: Análise ambiental da bacia hidrográfica do Arroio Itapuã: Caderno para Educação Ambiental.1 ed.Porto Alegre : Gráfica daUFRGS, 2002, v.1, p. 1-104.

6 – ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS:

1. 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. Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides*, 28: 2042-2050, 2007.

7 – COMUNICAÇÕES E RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS OU PERIÓDICOS (RESUMO)

1. POSTAL, M., STANICUASKI, F., SETEMBRINI, B., KREUTZ, F., CARLINI, C. R.

Produção de anticorpos monoclonais contra as diferentes isoformas de ureases de *Canavalia ensiformis* e Imunolocalização de tecidos alvos da toxina em insetos suscetíveis In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Ufrgs, 2006, Porto Alegre.

Livro de resumos PPGBCM. , 2006. p.01 - 137

2. POSTAL, M., CARLINI, C. R.

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra as diferentes isoformas de urease de *Canavalia ensiformis* In: VII reunião anual do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular do centro de biotecnologia da UFRGS, 2005, porto alegre.

PPGBCM: Livro de Resumos. , 2005.

3. STANICUASKI, F., POSTAL, M., CARLINI, C. R.

Proteolysis of Canatoxin: Characterization of *Callosobruchus maculatus* Digestive Enzymes Involved in the Process. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Aguas de Lindóia.

Livro de Resumos da XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. , 2005.

4. POSTAL, M., STANICUASKI, F., BLOCHTEIN, B., CARLINI, C. R.

Identificação de tecidos alvos de ureases no percevejo *Dysdercus peruvianus* In: XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado.

XX Congresso Brasileiro de Entomologia. , 2004.

5. STANICUASKI, F., POSTAL, M., SALVADORI, J., CARLINI, C. R.

Isolamento e Caracterização das Enzimas Digestivas de *C. maculatus* Responsáveis pelo Processamento da CNTX In: XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado.

XX Congresso Brasileiro de Entomologia. , 2004. v.U.

6. POSTAL, M., STANICUASKI, F., CARLINI, C. R., BLOCHTEIN, B.

Histological Analyses of Canatoxin Effects on the Digestive Tract of *Dysdercus peruvianus*(Hemiptera; Pyrrhocoridae) Nymphs. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2003, Caxambu.

XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. , 2003.

7. STANICUASKI, F., POSTAL, M., Ferreira-da-Silva, C, CARLINI, C. R.

Insecticidal Effect of Canatoxin in *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) dependent on the life cycle stage. Partial Characterization of Digestive Enzymes of nymphs and adults. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Biologia molecular - SBBq, 2003, Caxambu.

XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Biologia molecular - SBBq. , 2003.

8. STANICUASKI, F., POSTAL, M., SALVADORI, J., CARLINI, C. R.

Isolamento e caracterização das enzimas digestivas de insetos envolvidas pelo processamento da CNTX In: V Reunião anual do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular do centro de biotecnologia da UFRGS, 2003, Porto Alegre.

Livro de Resumos PPGBCM. , 2003. v.U.

9. POSTAL, M., STANICUASKI, F., CARLINI, C. R., BLOCHTEIN, B.

Microanatomia do trato digestivo de formas jovens de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera; Pyrrhocoridae) In: V Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e

Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2003, Porto Alegre.

Livro de Resumos PPGBCM. , 2003. v.u.

10. STANICUASKI, F., POSTAL, M., Ferreira-da-Silva, C, CARLINI, C. R.

Efeito inseticida da canatoxina em diferentes estágios de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Caracterização das enzimas envolvidas In: XIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2002, Porto Alegre.

XIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS. , 2002.

11. POSTAL, M., STANICUASKI, F., Ferreira-da-Silva, C, CARLINI, C. R., BLOCHTEIN, B.

Microanatomia do trato digestivo de formas jovens de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera; Pyrrhocoridae) In: XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2002, Porto Alegre.

XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS. , 2002.

12. MENDES, I. L. V., POSTAL, M.

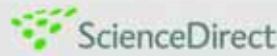
Análise ambiental da bacia hidrográfica do Arroio Itapuã: moluscos In: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 2001, ITAJAÍ.

8 – ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2004/02 – 2005/01: CNPQ – Bolsista de apoio técnico de Nível superior.
Laboratório de Proteínas Tóxicas, Departamento de Biofísica, UFRGS.

2007(junho – outubro): Programa de Combate à Dengue da Prefeitura Municipal de Porto Alegre: Processo seletivo 1/07 para Admissão Temporária - Função: Supervisor de Campo.

ANEXO 2

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

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

F. Mulinari^a, F. Stanisçuaski^a, L.R. Bertholdo-Vargas^{a,b}, M. Postal^a,
O.B. Oliveira-Neto^c, D.J. Rigden^d, M.F. Grossi-de-Sá^{a,c,*}, C.R. Carlini^{a,e}

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

^b Institute of Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

^c 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

^d School of Biological Sciences, University of Liverpool, Liverpool L69 7ZB, UK

^e 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 β -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

rely 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 (M.F. Grossi-de-Sá).

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

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 μ l reaction, containing 500 ng of pGEMT-easy/JBURE-II as the template DNA, 400 nM of each primer, 200 μ M 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 MgCl₂ and pET 101 vector. Chemically competent *E. coli* (TOP 10) cells were transformed with 3 μ l of the ligation reaction and grown overnight in LB medium containing 100 μ g/ml ampicillin. The positive transformants were analyzed by PCR, using whole colonies as a source for DNA template. The amplification of *Jaburetox-2Ec*

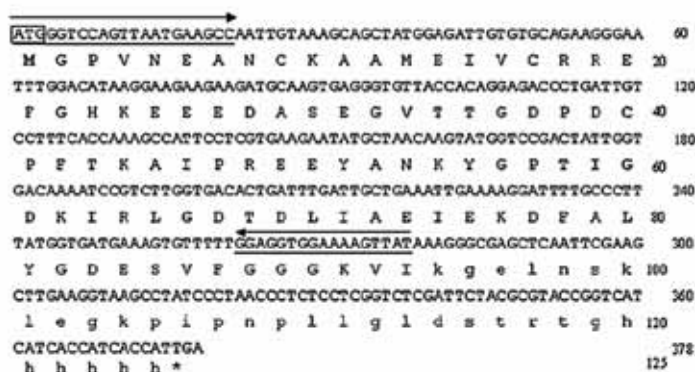


Fig. 1 – Nucleotide and its deduced amino acid sequence of a cDNA for the *Jaburetox-2Ec*. The deduced amino acid sequence is shown below their respective codons. Nucleotide and amino acid numbers of *Jaburetox* sequence are indicated on the right side. The box indicates an additional start codon. The 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 OD₆₀₀ 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 (OD₆₀₀ = 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 Na₂HPO₄·7H₂O, pH 7.3), and 0.05% Tween. After washing, the membrane was incubated with a rabbit IgG anticanatoxin 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 Stanisçuaski 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 mm²) 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 LD₅₀ [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.e.I, *Canavalia ensiformis* JBURE-II (AAN08919) C.e.II, *Glycine max* embryo-specific (AAO85884) G.m.E, *Glycine max* ubiquitous (AAO8583) G.m.U, *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.p.B, *Bacillus pasteurii* chain C (4UBPC) B.p.C and *Klebsiella aerogenes* chain C (AAA25149) K.a.C. 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 Ni²⁺ 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-

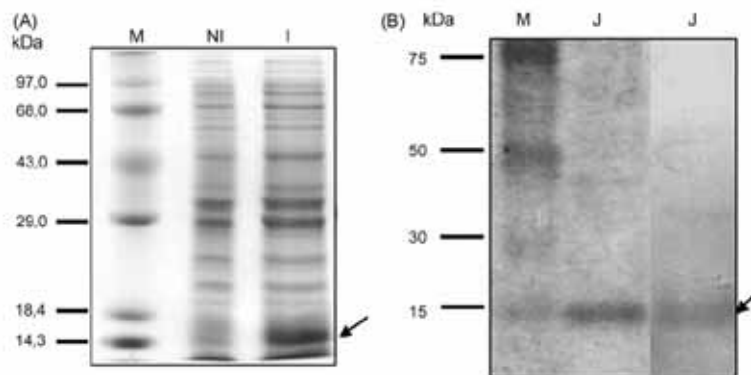


Fig. 3 – Production of recombinant Jaburetox-2Ec. (A) SDS-PAGE analysis of the recombinant Jaburetox-2Ec in cell lysates. Lane NI, without induction. Lane I, 1-h induction with 0.75 mM IPTG. (B) SDS-PAGE analysis of purified Jaburetox-2Ec. Lane J: 10 µg protein eluted from the Ni²⁺ affinity column chromatography. 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.

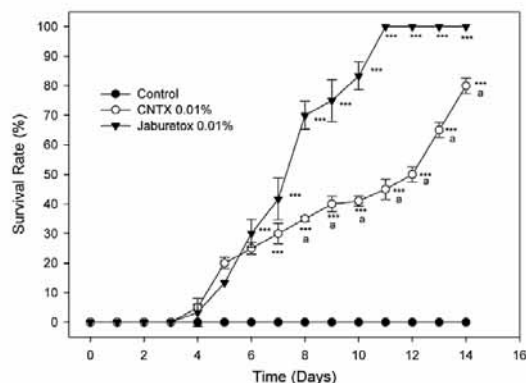


Fig. 4 – Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec on *D. peruvianus*. Third instar nymphs fed on artificial seeds containing 0.01% (w/w) Jaburetox-2Ec. Surviving insects were counted daily. Results are expressed as mean mortality and S.E.M. of three independent experiments in triplicates. Level of significance 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 μg 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 μg 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_{50} [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

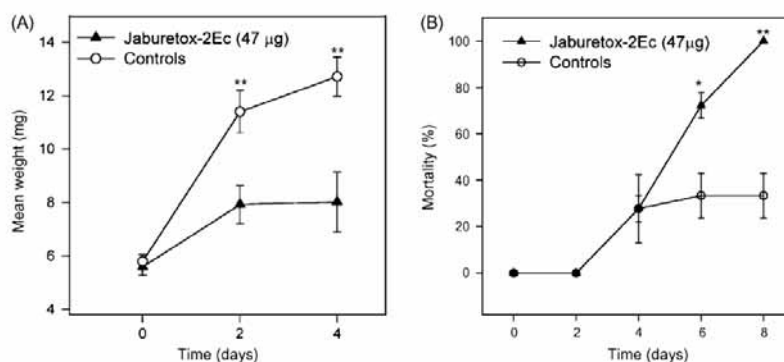


Fig. 5 – Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec in *S. frugiperda*. Three groups of six third instars *S. frugiperda* received at days 0, 2 and 4, a foliar (*P. vulgaris*) disc containing 16.3 μg air-dried Jaburetox-2Ec. (A) Weight gain of individual insects at days 0, 2 and 4. (B) Mortality (%) of larvae 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.

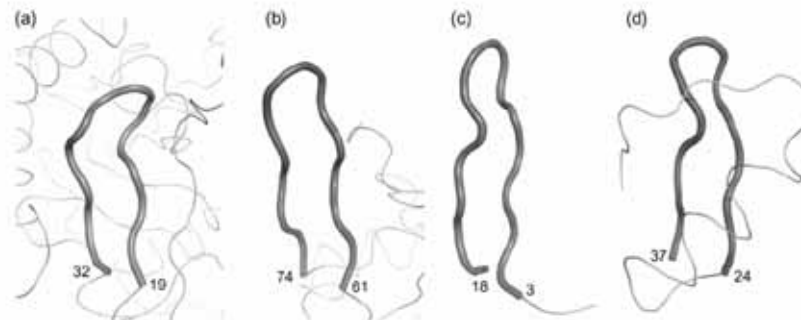


Fig. 6 – Ab Initio modeling of Jaburetox-2Ec and comparison to other β -hairpin motifs. β -Hairpin motifs (shown as cartoon representation in darker color) in (a) the intact *H. pylori* urease [24] (PDB code 1e9y), (b) one of the top 10 ab initio models of Jaburetox-2Ec, (c) protegrin [1] (PDB code 1pg1) 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 α -helices, with a single exception, they contained a large, generally exposed, β -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 LD₅₀ 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 δ -endotoxins, form pores by insertion of an α -helical hairpin (two α -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 β -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 β -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⁺) 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 (10⁻¹² M) of Jaburetox-2Ec inhibit in a [K⁺]-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 β -hairpin motif in the free peptide. The absence of the N-terminal part of the Jaburetox sequence in bacterial ureases would compromise this

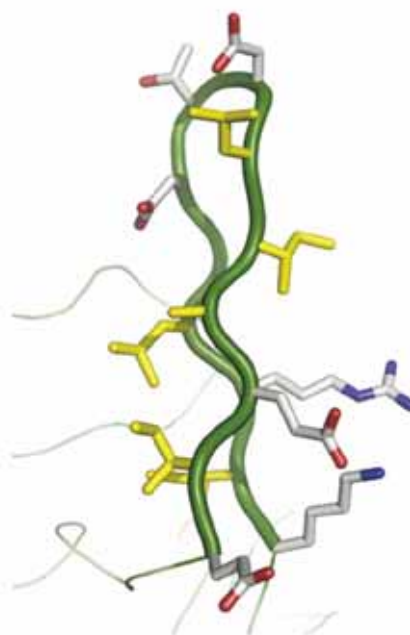


Fig. 7 - The amphiphilic character of the β -hairpin motif in one of the top 10 *ab initio* models of Jaburetox-2Ec. Hydrophobic residues (yellow carbon) predominate on the left face while hydrophilic residues (white carbon) form the majority of the other face. (For interpretation of the references to 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 β -hairpin motif has a pronounced amphiphilic character [9]. *Ab initio* models of Jaburetox contain β -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 β -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 concanavalin-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;115:58–62.
- [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.