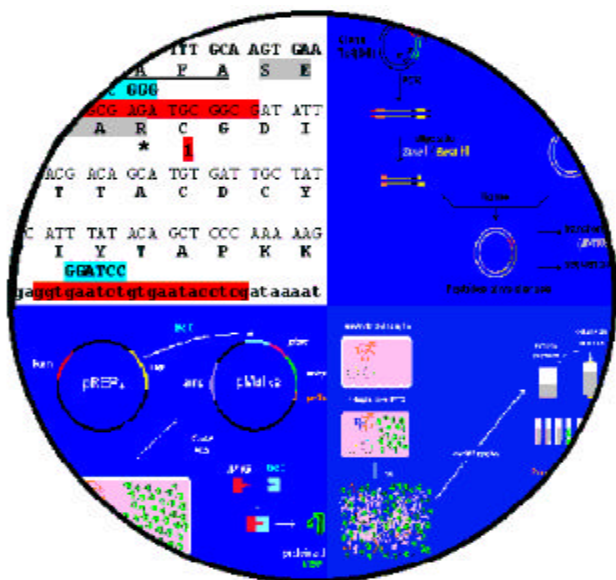




Clonagem e Expressão do Gene Bioinseticida TX4(6-1) em Sistema Heterólogo

José Edson Fontes Figueiredo¹
Tales Lima Rocha²
Evanguedes Kalapothakis³
Marcus Vinício Gomez⁴
Antônio Álvaro C. Purcino⁵
Ivan Cruz⁵

A produção nacional de milho deve atingir 45,8 milhões de toneladas em 2003. Essa produção poderia ter sido maior se as perdas verificadas no processo produtivo fossem minimizadas. Diversos fatores contribuíram para isso. Entre eles, o dano causado pela lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) é significativo, com prejuízos de até 34% da produção. A base do controle de pragas é o uso de inseticidas químicos, de custo elevado e consequências de toxicidade negativas ao homem e ao meio ambiente. O controle biológico e a produção de plantas transgênicas são excelentes alternativas para minimizar os danos causados pela lagarta-do-cartucho, reduzindo os custos de produção e preservando a saúde pública e ambiental.

Atividades inseticidas têm sido descritas em polipeptídeos isolados das glândulas de veneno de diferentes espécies de aranhas

(Adams *et al.*, 1989; Branton *et al.*, 1987; Dulubova *et al.*, 1996; Magazanik *et al.*, 1992; Skinner *et al.*, 1989, 1992; Stapleton *et al.*, 1990). O veneno da aranha armadeira sul-americana (*Phoneutria nigriventer*) é rico em polipeptídeos com ação neurotóxica, que se caracterizam pelo baixo peso molecular e por se ligarem com alta afinidade e especificidade aos canais iônicos celulares, alterando seu comportamento (Araujo *et al.*, 1993; Diniz, 1963; Entwistle *et al.*, 1982; Fontana e Brazil, 1985; Guatimosin *et al.*, 1997; Hoover *et al.*, 1996; Prado *et al.*, 1996; Shenberg e Pereira Lima, 197). Desse modo, toxinas de aranha surgem como importante e ainda inexplorada alternativa para o controle biológico. Bioensaios com proteínas recombinantes em sistema heterólogo e a produção de plantas transgênicas sintetizando toxinas inseticidas endogenamente constituem estratégia promissora nessa área.

¹Biólogo, Doutor, Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, Brasil.

²Biólogo, Doutor, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/DF, Parque Estação Biológica Final Av. W/5 Norte, 70770-900, Brasília-DF, Brasil.

³Biólogo, Dep. de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Pampulha, CEP 30000-000, Belo Horizonte, MG, Brasil.

⁴Médico, Dep. de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Pampulha, CEP 30000-000, Belo Horizonte, MG, Brasil.

⁵Eng. Agr., Doutor, Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, Brasil.

No último caso, os níveis e a localização da expressão dos transgenes podem ser regulados, permitindo a presença contínua da toxina em toda a planta ou em tecidos específicos. Esse processo possibilita a incorporação de novos genes àqueles utilizados pelo melhoramento genético clássico, ampliando as perspectivas de obtenção de genótipos mais produtivos.

O polipeptídeo Tx4(6-1), isolado de *P. nigriventer*, é uma toxina específica para insetos e sem efeito tóxico em aves e mamíferos (Gomes & Kalapothakis, comunicação pessoal). Testes *in vitro*, realizados com a mosca caseira, gafanhotos e baratas, mostraram que esse polipeptídeo foi letal quando inoculado no abdomen do inseto, em doses entre 0,02 e 2,5 ng/mg. Os insetos estudados apresentaram sintomas de intoxicação logo após a injeção e não foram capazes de reverter o quadro de tremor, movimentos desordenados e morte (Figueiredo *et al.*, 1995). Biotestes de toxicidade dessas proteínas em insetos-praga da cultura do milho poderão fornecer importantes resultados

em termos de alternativas para tecnologia de transgênicos visando resistência de plantas. Contudo, a baixa concentração de Tx4(6-1) nos extratos totais de veneno e as dificuldades de purificação da proteína em grande escala inviabilizam a realização de bioensaios. A clonagem e a expressão de Tx4(6-1) em sistemas heterólogos possibilitariam contornar essa limitação. Figueiredo *et al.* (1995) isolaram o cDNA que codifica o polipeptídeo Tx4(6-1), que codifica uma proteína precursora com 82 resíduos de aminoácidos, dos quais 16 resíduos no N-terminal correspondem ao peptídeo sinal de endereçamento do polipeptídeo nascente para o retículo endoplasmático (Figura 1). No lúmen da glândula de veneno, o propeptídeo é clivado por proteases específicas, originando o peptídeo ativo (48 aa), que exibe atividade inseticida. Dois primers flanqueando as regiões 5' e 3' do cDNA de Tx4(6-1) foram utilizados em reação de PCR, para amplificar a região codificadora do peptídeo ativo (Forward: 5'- GAAGAATCGCCCGGG TGCGGCG-3' e Reverse: 5'- CGAGGTATTACGGATCCACC-3' (Figura 2).

```

ATG AAG GTT GCA ATC GTG TTC CTC TCT CTT CTG GTA CTT GCT TTT GCA AGT GAA TCC ATT
M  K  V  A  I  V  F  L  S  L  L  V  L  A  F  A  S  E  S  I

GAA GAA AAT AGG GAA GAG TTC CCT GTT GAA GAA TCG GCG AGA TGC GGC GAT ATT AAT GCT
E  E  N  R  E  E  F  P  V  E  E  S  A  R  C  G  D  I  N  A
                                *  1

GCT TGC AAA GAG GAT TGC GAC TGC TGT GGA TAT ACG ACA GCA TGT GAT TGC TAT TGG TCA
A  C  K  E  D  C  D  C  C  G  Y  T  T  A  C  D  C  Y  W  S

AAG AGC TGT AAA TGT AGA GAA GCT GCT ATT CTC ATT TAT ACA GGT CCC AAA AAG AAA CTC
K  S  C  K  C  R  E  A  A  I  V  I  Y  T  A  P  K  K  K  L

48
ACG TGC TAA gctgataataaTagtattattacatttttgagggtgaatctgtgaatacctcgataaaaataaacgttg
T  C  ***

```

Figura 1. Sequência parcial do clone de cDNA e do propeptídeo TX4(6-1). A sequência de aminoácidos grifados corresponde ao sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático e os resíduos sombreados são removidos por proteases no lúmen da glândula do veneno. O peptídeo ativo está numerado de 1 a 48 e o asterisco assinala a posição em que foi introduzida uma glicina após a clonagem em pMal. As regiões sombreadas na sequência de DNA do clone Tx4(6-1) correspondem aos primers sintetizados para amplificação e clonagem do peptídeo ativo. As mutações criando os sítios de restrição (*Sma* I e *Bam* HI) para clonagem do inserto amplificado também estão indicadas.

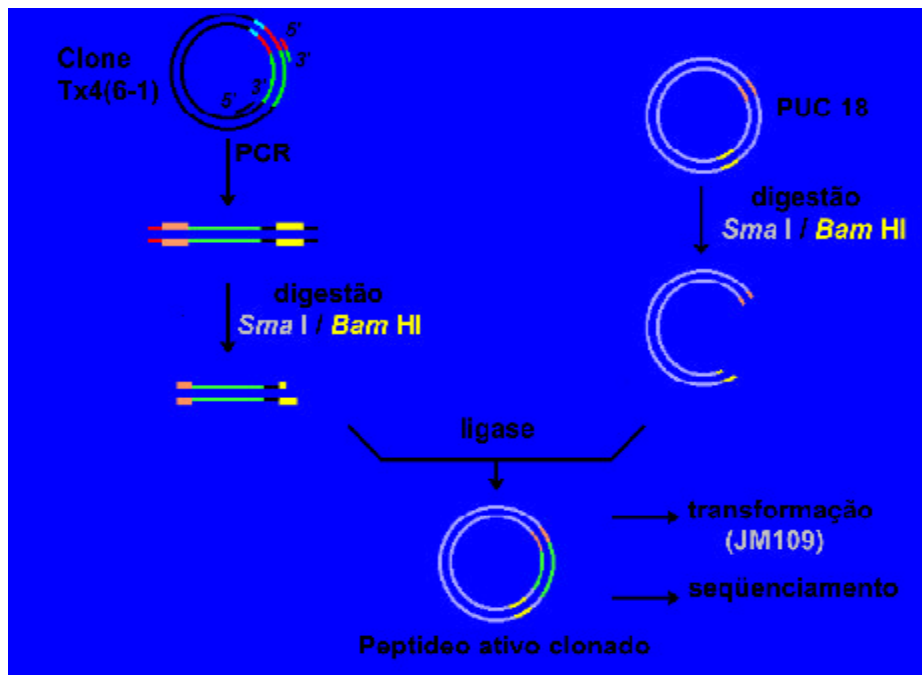


Figura 2. Esquema da clonagem do peptídeo ativo Tx4(6-1) em pUC 18. O DNA codante para o peptídeo ativo de Tx4(6-1) foi amplificado por PCR, utilizando primers contendo os sítios para enzimas de restrição *Sma* I e *Bam* HI. A reação de ligação foi realizada após a digestão do inserto e do vetor pUC 18 com as enzimas de restrição adequadas. Em seguida, o produto da ligase foi usado para transformar *E. coli* JM109.

O fragmento amplificado com aproximadamente 144 pb foi purificado do gel de agarose 0,8%, digerido com as enzimas de restrição *Sma* I e *Bam* HI, clonado no vetor pUC 18 e sequenciado para determinar a fidelidade do PCR. A introdução do codon GGG foi confirmada na posição 5' da sequência de DNA que codifica para o peptídeo ativo Tx4(6-1). De fato, isso era esperado, pois a clivagem com *Sma* I, realizada entre o triplete CCC e GGG na sequência de DNA introduz um resíduo Glicina na região amino-terminal do peptídeo Tx4(6-1). Em seguida, o inserto codificador do peptídeo ativo modificado foi retirado do vetor pUC 18, usando as mesmas enzimas de restrição e clonado em fusão com o gene da maltose binding protein (MBP) nos sítios *Xmn* I e *Bam* HI do vetor pMAL de expressão em bactérias (Figura 3). O programa Peptide Mass foi utilizado para calcular a massa relativa das proteínas envolvidas na clonagem. A proteína MBP nativa possui massa molecular de aproximadamente 50831,22 Da. A digestão do gene da MBP com a enzima de restrição *Xmn* I gera um peptídeo de 42469,93 Da. O peptídeo ativo Tx4(6-1) possui massa

molecular de aproximadamente 5308,16 Da e a proteína de fusão MBP/Tx4(6-1) apresenta massa molecular equivalente a 47760,08 Da. Essas informações foram importantes para auxiliar na identificação das proteínas expressas e para monitorar os experimentos. As bandas nos blots apresentados possuem massa molecular equivalentes àqueles preditos pelo Peptide Mass.

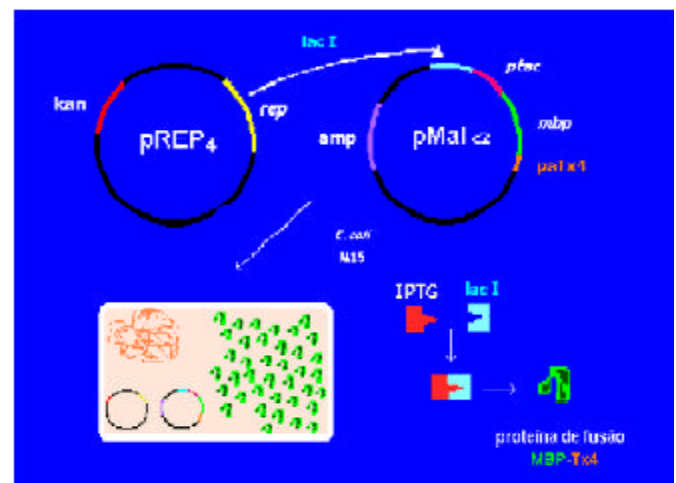


Figura 3. Esquema da indução da proteína de fusão MBP/Tx4(6-1) em *Escherichia coli*. Na ausência de IPTG, o produto lac I do vetor pREP liga-se ao *ptac*, prevenindo a expressão basal da proteína de fusão clonada em pMAL. Na presença do indutor *ptac*, é desbloqueado, ocorrendo a síntese da proteína de fusão MBP/Tx4(6-1).

A construção MBP/Tx4(6-1) no vetor pMal foi utilizada para co-transformar a estirpe M15 de *Escherichia coli* com o plasmídeo pRep. O plasmídeo pRep é um repressor forte do operon Lac e, dessa forma, impediu a expressão basal da proteína de fusão. Essa medida foi adotada para prevenir possíveis efeitos de toxicidade da proteína de fusão para *E. coli*. As bactérias M15 transformadas foram selecionadas e as colônias positivas foram crescidas durante oito horas em meio LB enriquecido com maltose. Após quatro horas de indução com IPTG (isopropylthiogalactoside) em concentração final de 0,3 mM, a cultura foi centrifugada a 3000 x g por dez minutos a 4 °C. Em seguida, o sedimento foi ressuspensionado em tampão da coluna (1M Tris-HCl, pH 7,4, 0,3 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,7 M azida sódica) e incubado a – 20 °C durante oito horas. Após esse período, a suspensão foi sonicada por dois minutos em pulsos de 15 segundos e centrifugada a 9000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi diluído cinco vezes em tampão da coluna e cromatografado em coluna de amilose (Figura 4). Após lavagem da coluna com 12 volumes de tampão da coluna, a proteína de fusão foi eluída com tampão da coluna contendo maltose 10 mM. O grau de pureza da proteína

de fusão foi evidenciado em gel SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue (Figura 5A) e por “western blot” (Figura 5B). Em seguida, a proteína de fusão foi clivada com fator Xa (Figura 6) e usada em biotestes com a lagarta-do-cartucho do milho. Quantidades equivalentes a 15,0 µg de proteína de fusão foram administradas na cavidade abdominal de 20 larvas e de 20 insetos adultos, que apresentaram diminuição de movimentos e tetania logo após as injeções. Contudo, não foi observada mortalidade de larvas e de insetos adultos. Ressalta-se que as larvas inoculadas com a proteína recombinante tiveram seu período de desenvolvimento prolongado por aproximadamente dez dias, quando comparadas com as lagartas-controle. Utilizaram-se como controle larvas e formas adultas, inoculadas separadamente com 10 µL de água destilada autoclavada, 10 µL de tampão da coluna, 10 µL de tampão de amostra contendo a proteína recombinante não clivada e 10 µL de tampão de amostra contendo 15 µg de proteína MBP. Alternativamente, pequenos pedaços de folhas de milho foram embebidos na mesma quantidade de proteína (15 µg da toxina recombinante clivada com fator Xa) e fornecidas como dieta alimentar de larvas. Nesses casos, foi observado 100% de mortalidade em apenas 30 minutos. Portanto, foi verificado que o peptídeo Tx4(6-1), expresso em bactéria, possui ação inseticida eficaz quando adicionado à dieta das larvas.

Foram produzidos anticorpos policlonais anti-MBP/Tx4 em coelho, usando a proteína de fusão eletroeluída após SDS-PAGE (Figura 7). O anticorpo será essencial em etapas posteriores do projeto, para verificar o nível e a integridade da proteína que será expressa em plantas e em estudos imunocitoquímicos para análise do endereçamento de proteínas nas células.

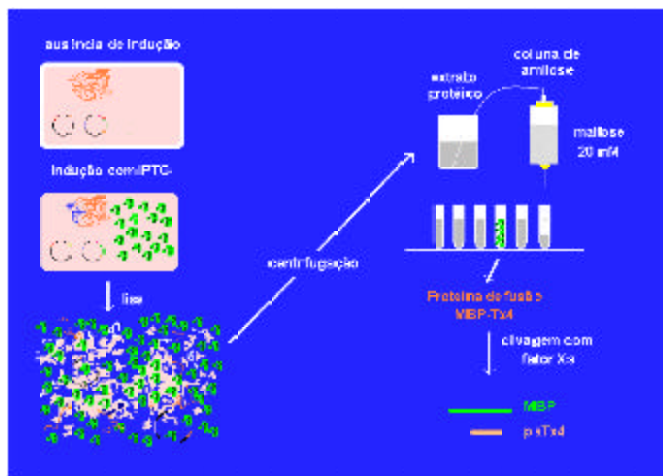


Figura 4. Esquema da purificação da proteína de fusão MBP/Tx4(6-1). Após quatro horas de indução com IPTG, a cultura bacteriana é lisada, sonicada e centrifugada. O sobrenadante é diluído e aplicado à coluna de amilose. Em seguida, 20 mM de maltose são aplicados à coluna, liberando a proteína de fusão MBP/Tx4(6-1). A fração contendo a proteína recombinante é tratada com fator Xa de coagulação e o peptídeo ativo é liberado da MBP.

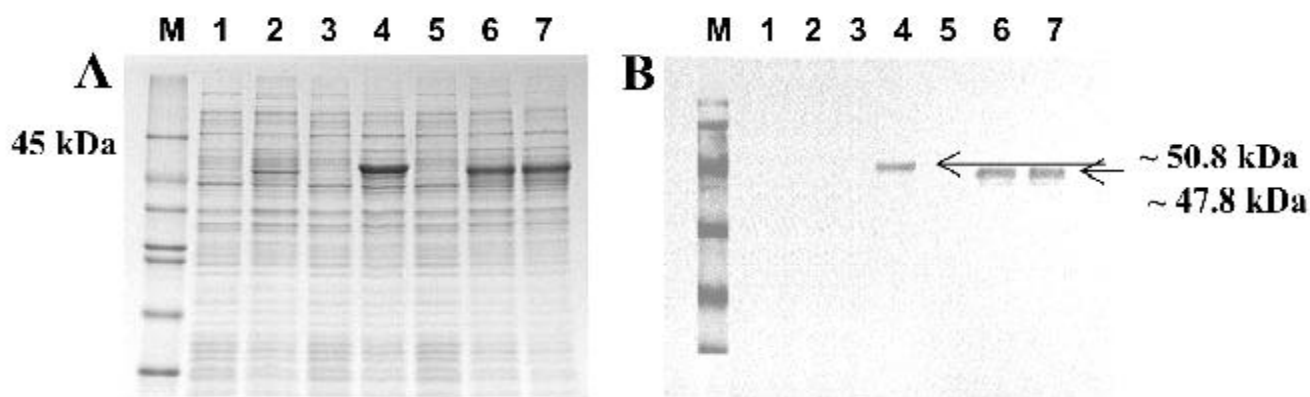


Figura 5. Eletroforese em SDS-PAGE a 12,5% (A) e western blot sondado com anticorpo anti-MBP (B) do extrato protéico total de *E. coli* induzido com IPTG. As linhas 1, 3 e 5 foram carregadas com M15 pREP, M15 pMAL e M15 pMAL/proteína de fusão na ausência de indução, respectivamente, e as linhas 2 e 4 foram carregadas com M15 pREP e M15 pMAL/MBP após indução com 10 mM IPTG, respectivamente; 6 e 7 = M15 pMAL/proteína de fusão após 2 e 8 horas de indução respectivamente. **M** = marcador de peso molecular rainbow (New England Biolabs).

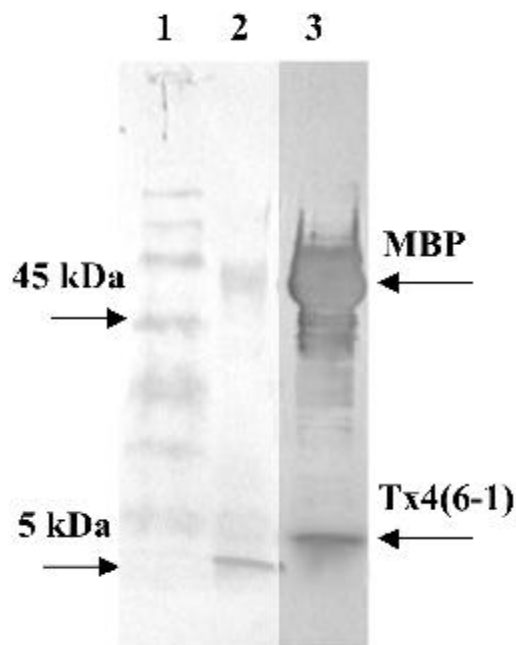


Figura 6. SDS-PAGE da proteína recombinante MBP/Tx4(6-1) purificada e clivada com fator Xa de coagulação. **A**- extrato protéico total com MBP induzida (1), extrato protéico total com proteína de fusão MBP/Tx4(6-1) induzida (2) e proteína de fusão purificada em coluna de amilose (PR). **B** - extrato protéico total com proteína de fusão MBP/Tx4(6-1) induzida (1), proteína de fusão purificada em coluna de amilose (PR) e proteína de fusão clivada com fator Xa. M = marcador de peso molecular.

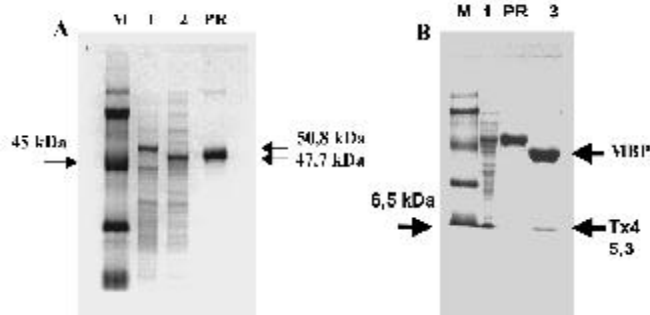


Figura 7. Western blot da proteína de Fusão MBP/Tx4(6-1). A proteína recombinante foi clivada com fator Xa e sondada com anticorpo policlonal anti-proteína de fusão diluído 3000X (3). Marcadores de peso molecular corados com Ponceau (1 e 2). Banda intensa superior, MBP e banda intensa inferior, peptídeo ativo Tx4(6-1).

Referências Bibliográficas

ADAMS, M.E.; HEROLD, E.E. ; VENENA, V.J Two classes of channel-specific toxins from funnel web spider venom. **Journal of Comparative Physiology A**, Berlin, v.164, p.333-342, 1989.

ALDEMITA RR and HODGES TK Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. **Planta**, Berlin, v.199, p. 612-617, 1996.

ARAÚJO, D.A.M. ; CORDEIRO, M.N. ; DINIZ, C.R ; BEIRÃO, P.S.L. Effects of a toxin fraction, PhTX2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. **Archives of Pharmacology**, Berlin, v. 347, p. 205-208, 1993.

BRANTON, W.D.; KOLTON,L.; JAN, N.Y. Neurotoxins from Plectreurys spider venom are potent presynaptic blockers in *Drosophila*. **Journal of Neuroscience**, New York, v. 7 p. 4195-4200, 1987.

DINIZ, C.R. Separation of proteins and characterization of active substances in the venom of the Brazilian spiders. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 283-291, 1963.

DULUBOVA, I.E.; KRASNOPEROV, V.G.; KHVOTCHEV, M.V.; PLUZHNIKOV, K.A.; VOLKOVA, T.M.; GRISHIN,E.V.; VAIS,H.; BELL, D.R.; USHERWOOD, P.N.R. Cloning and structure of d-latroitoxin, a novel insect-specific member of the latrotoxin family. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, p. 7535-7543, 1996.

ENTWHISTLE, I.D.; JOHNSTONE, R.A.W.; MEDZIHRADESKY, D.; MAY, T.E Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and its neurophysiological activity on an insect femur preparation. **Toxicon**, Elmsford, v. 20, p.1059-1067, 1982.

FIGUEIREDO, S.G.; GARCIA, M.E.; VALENTIM, A.C.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin TX4(6-1) from the venom of the "armed" spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). **Toxicon**, Elmsford, v. 33 p. 83-93, 1995.

FONTANA, M.D.; BRAZIL, V.O. Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.18, p. 557-565, 1985.

GUATIMOSIN, C.; ROMANO-SILVA, M.A.; CRUZ, J.S.; BEIRÃO, P.S.L.; KALAPOTHAKIS, E.; MORAES-SANTOS, T.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; GOMEZ, M.V.; PRADO, M.A.M. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 122, p. 591-597, 1997.

HOOVER, K.; HERRMANN, R.; MOSKOWIT, H.; BONNING, B.C.; DUFFEY, S.S.; MCCUTCHEN, B.F.; HAMMOCK, B.D. The potential of recombinant baculoviruses as enhanced bioinsecticides. **Pesticide Outlook**, Cambridge, v. 20, p. 21-17, 1996.

MAGAZANIK, L.G.; FEDEROVA, I.M.; KOVALEVSKAYA, G.I.; PASHKOV, V.N.; BULGAKOV, O.V.; GRISHIN, E.V. Selective presynaptic insectotoxin (α -latroinsectotoxin) isolated from black widow spider venom. **Neuroscience**, Elmsford, v. 46, p. 181-188, 1992.

PRADO, M.A.A.; GUATIMOSIM, C.; GOMEZ, M.V.; DINIZ, C.R.; CORDEIRO, M.N.; ROMANO-SILVA, M.A. A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin TX3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. **Biochemical Journal**, London, v. 314, p.145-150, 1996.

SHENBERG, S. ; PEREIRA LIMA, F.A. *Phoneutria nigriventer* venom In: BURCHEL, W.; BUCKLEY, E. L. eds. **Venoms animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1971. v. 3, cap. 52.

SKINNER, W.S.; ADAMS, M.E.; QUISTAD, G.B.; KATAOKA, H.; CESARIN, B.J, ENDERLIN, F.E.; SCHOOLY, D.A Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, p. 2150-2155, 1989.

SKINNER, W.S.; DENNIS, P.A. ; LI, J.P. ; QUISTAD, G.B. Identification of insecticidal peptides from venom of the trap-door spider, *Aptostichus schlingeri* (ctenizidae). **Toxicon**, Elmsford, v. 30, p.1043-1050, 1992.

STAPLETON, A.; BLANKENSHIP, D.T.; ACKERMANN, B.L.; CHEN, T.M.; GORDER, G.W.; MANLE, G.D.; PALFREYMAN, M.G. ; COUTANT, J.E. ; CARDIN, A.D. Curtatoxins: neurotoxic insecticidal polypeptides isolated from funnel-web spider *Hololena curta*. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 265, p. 2054-2059, 1990.

Comunicado Técnico, 64

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Caixa Postal 151 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: 0xx31 3779 1000
Fax: 0xx31 3779 1088
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

1ª edição
1ª impressão (2003) Tiragem: 200

Comitê de Publicações

Presidente: Ivan Cruz
Secretário-Executivo: Frederico Ozanan Machado Durães
Membros: Antônio Carlos de Oliveira, Arnaldo Ferreira da Silva, Carlos Roberto Casela, Fernando Tavares Fernandes e Paulo Afonso Viana

Expediente

Supervisor editorial: José Heitor Vasconcellos
Revisão de texto: Dilermando Lúcio de Oliveira
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa