

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

Urease de *Canavalia ensiformis*: processamento diferencial por
ninfas e adultos de *Dysdercus peruvianus* e formação de
canal *in vitro*.

Angela Regina Piovesan

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular da UFRGS,
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini
Co-orientação: Prof. Dr. Jean-Louis Schwartz, Université de Montréal

Porto Alegre
Outubro de 2009

A primeira parte deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Proteínas Tóxicas, do Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini. O trabalho realizado teve suporte financeiro da CAPES, CNPq, FAPERGS e FINEP.

A segunda parte deste trabalho foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Jean-Louis Schwartz, no Groupe d'étude des protéines membranaires, do Departamento de Fisiologia, na Université de Montréal durante o intercâmbio pelo programa GSEP, com suporte do governo canadense.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer todas as pessoas que de uma forma ou outra contribuíram para a finalização deste trabalho.

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora Célia pela oportunidade, atenção e dedicação ao meu trabalho, sempre disposta a ouvir e ajudar.

Ao meu co-orientador de Montréal, Jean-Louis Schwartz, que durante meu intercâmbio foi muito presente e atencioso, sempre disposto a responder questões e ensinar novos conceitos.

Aos amigos que fiz na Université de Montréal, Valbona e Marc, que compartilharam comigo seis longos meses do inverno canadense e me ensinaram o que eu sei de eletrofisiologia na prática. Ao Marc especialmente por me ajudar com a análise dos dados mesmo à distância.

Aos meus colegas de laboratório, que tornam os dias de trabalho mais agradáveis. Em especial à Fernanda, que me ajudou de todas as formas no período em que estive no Canadá.

Ao meu pai Abilio e minha mãe Fátima, sempre orgulhosos, acreditando em mim e incentivando a vencer os desafios.

Às minhas irmãs lindas Márcia e Alice pela amizade, amor e compreensão de todas as horas, mesmo que distantes. Ao Renato, meu sobrinho querido, pelos momentos de alegria ao teu lado.

À Duti, minha mãe de coração, pela atenção, carinho e apoio nesses anos.

À minha chará Angela que há anos tenho a mais verdadeira amizade e é quem está do meu lado nos momentos de alegria, tristeza e angústia.

Às meninas que moram ou já moraram comigo: Giovana, Carina, Karine, Carla e Júlia pelos momentos de conversa e descontração ao longo desses anos.

Ao Gustavo, pelo amor incondicional, que me acompanha desde o início, sempre compartilhando, ouvindo, apoiando e me acalmando em todos os momentos que passei até aqui.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Elisabeth Nogueira Ferroni Schwartz
Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade de Brasília

Dr. Hugo Verli
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – CBIOT.
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dr^a. Nádyá Pesce da Silveira
Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LISTA DE ABREVIATURAS

A: absorbância
Abz: ácido *o*-aminobenzóico
ATP: adenosina tri-fosfato
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indocil fosfato
Ch: colesterol
DTT: ditioneitol
E64: L-trans-epoxy succinil-L-leucylamido(4-guanidino)-butano
EDDnp: *N*-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina
EDTA: ácido etilenodiamino-tetracético
F: farad
g: condutância
I: corrente iônica
JBU: jackbean urease
kDa: quilodaltos
MCA: 7-amido-4-metilcumarina
MP: membrana plasmática
mU: miliunidade
mV: milivolt
MW: marcador de massa molecular
OD: optical density
pA: picoampere
PC: fosfatidilcolina
PE: fosfatidiletanolamina
Pep-A: pepstatina A
PLB: planar lipid bilayer
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil
pS: picosiemens
PVDF: difluoreto de polivinilideno
R: resistência
RFU: unidade relativa de fluorescência
S: siemens
SBU: soybean urease
SDS: dodecil-sulfato de sódio
SDS-Page: gel de poliacrilamida para eletroforese com dodecil-sulfato de sódio
TCA: ácido tricloroacético
TTBS: tris-HCl salino contendo 0,05% de tween 20
U: unidade
V: volt
µm: micrômetro

RESUMO

Ureases são enzimas que realizam hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono e são isoladas de plantas, fungos e bactérias. A urease de *C. ensiformis* (JBU) tem algumas atividades biológicas independentes da sua atividade enzimática, como por exemplo: agregação plaquetária e efeito inseticida. O efeito inseticida é devido à liberação de um peptídeo interno por enzimas digestivas específicas dos insetos. Este peptídeo foi isolado, caracterizado e um análogo recombinante foi obtido e denominado Jaburetox-2Ec. Somente insetos com enzimas digestivas acídicas, como catepsinas, são capazes de liberar o peptídeo tóxico a partir da hidrólise de JBU. Insetos com enzimas básicas do tipo tripsina não são suscetíveis pois não há formação do peptídeo tóxico. Ninfas de *D. peruvianus* são sensíveis aos efeitos da JBU enquanto adultos não são. Este trabalho teve como objetivo estudar as diferenças enzimáticas entre os dois estágios do inseto para elucidar o processamento diferencial da JBU. Realizando a hidrólise *in vitro* da JBU com o homogeneizado de intestino de ninfas e adultos foi visto que tanto adultos como ninfas hidrolisam a JBU, mas somente ninfas liberam o peptídeo tóxico identificado pelo anticorpo específico anti-Jaburetox-2Ec. Ainda, através de ensaios enzimáticos utilizando substratos fluorogênicos e inibidores específicos, foi observada uma diferença no pH ótimo de atividade e na susceptibilidade a inibidores das enzimas digestivas presentes nos dois estágios. Substratos fluorogênicos correspondentes às regiões flanqueadoras do peptídeo dentro da JBU intacta foram desenhados e testados com os dois homogeneizados, o que também revelou que os homogeneizados dos dois estágios têm ação diferencial sobre estes substratos, sendo que ninfas liberariam mais eficientemente a extremidade N-terminal do peptídeo quando comparado aos adultos.

Verificamos ainda que, em estudos eletrofisiológicos utilizando a técnica de “Planar Lipid Bilayer”, tanto a JBU como o Jaburetox-2Ec são capazes de se inserir em membrana lipídica planar, formando canais iônicos. Os canais formados pela JBU apresentaram quatro níveis de condutância majoritárias e seletividade para íons cloreto.

ABSTRACT

Ureases are enzymes that hydrolyze urea in ammonium and carbon dioxide and they have been isolated from plants, fungi and bacteria. Jackbean urease, from *Canavalia ensiformis* (JBU) displays biological activities unrelated from its enzymatic activity, as platelet aggregation and insecticide effect. This insecticide effect is due to the release of an internal peptide by insect specific digestive enzymes. This peptide was isolated, characterized and the recombinant peptide obtained was called Jaburetox-2Ec. Only insects that rely on cathepsin-like digestive enzymes are able to hydrolyze JBU and release the toxic peptide. Insects with alkaline enzymes like tripsins are not susceptible because they don't release the toxic peptide. Nymphs of *D. peruvianus* are susceptible to JBU effects while adults are not. The goal of this work was to study the enzymatic differences between both insect stages to elucidate JBU's differential processing.

In vitro hydrolysis were performed with nymphs and adults midgut homogenates and we observed that both adults and nymphs hydrolyze JBU but only nymphs are able to release the toxic peptide identified by Jaburetox-2Ec antibodies. Furthermore, in enzymatic assays using different fluorogenic substrates and specific inhibitors a difference in optimum pH and susceptibility to inhibitors of the digestive enzymes in both stages was observed. Fluorogenic substrates corresponding to the flanking regions of the peptide inside the intact JBU were produced and tested with both homogenates. Homogenates from both stages have differential action upon these substrates, considering that nymphs hydrolyses more efficiently the N-terminal of the peptide compared to adults.

In electrophysiological studies using the Planar Lipid Bilayer technique we verify that JBU and Jaburetox-2Ec are able to insert in planar lipid membrane forming ionic channels. JBU's channels display four major conductance levels and selectivity for chloride ions.

ÍNDICE

1. Introdução	9
1.1. Ureases	9
1.2. Efeito Inseticida	12
1.3. Membrana Celular	17
1.3.1. Estrutura da Membrana	17
1.3.2. Bicamada Lipídica	19
1.3.3. Fosfolípídeos de Membrana	20
1.4. Canais Iônicos Dependentes de Voltagem	22
1.4.1. Poro X Canal	23
1.4.2. Canais de K ⁺	23
1.4.3. Canais de Na ⁺	25
1.4.4. Canais de Ca ²⁺	27
1.4.5. Canais de Cl ⁻ dependentes de voltagem	29
1.5. Eletrofisiologia	31
1.5.1. Assinaturas de um canal	35
1.6. Lei de Ohm	36
2. Objetivos	38
2.1. Objetivo Geral	38
2.2. Objetivos específicos	38
CAPÍTULO I – Processamento diferencial de urease de <i>Canavalia ensiformis</i> por ninfas e adultos de <i>Dysdercus peruvianus</i> .	40
Objetivos específicos Capítulo I	41
Resumo Capítulo I	42
CAPÍTULO II – canais iônicos formados por JBU e Jaburetox-2Ec	53
I. Objetivos específicos Capítulo II	54
II. Materias e Métodos	55
a. Reagentes e JBU	55
b. Jaburetox-2Ec	55
c. Ensaio de Membrana Lipídica Planar (Planar Lipid Bilayer-PLB)	56
III. Resultados	60
a. Atividade de canal em PLB na presença de JBU	60
b. Seletividade Iônica dos canais formados pela JBU	62
c. Atividade de canal em PLB na presença de Jaburetox-2Ec	64
3. Discussão	66
4. Conclusões	71
5. Perspectivas	72
6. Bibliografia	74
7. CURRICULUM VITÆ resumido	83

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ureases

Ureases (EC 3.5.1.5) são enzimas dependentes de níquel que catalisam a hidrólise da uréia para formar amônia e dióxido de carbono (Dixon *et al.*, 1975). Ureases têm sido isoladas de uma ampla variedade de organismos incluindo plantas, fungos e bactérias (Mobley *et al.*, 1989; Sirko & Brodzik, 2000; Follmer, 2007). Enquanto ureases de fungos e de plantas (ex. feijão-de-porco e soja) são proteínas homo-oligoméricas com subunidades de ~ 90 kDa, ureases bacterianas são multímeros de duas ou três subunidades (Mobley *et al.*, 1995). Até agora, apenas ureases bacterianas têm sua estrutura cristalográfica 3D bem resolvida, ex. *K. aerogenes* (1FWJ) (Fig. 1A), *Bacillus pasteurii* (4UBP), e *Helicobacter pylori* (1E9Z) (Mobley *et al.*, 1995, Sirko *et al.*, 2000). Entretanto, a alta similaridade de seqüência de todas ureases indica que elas são variantes de uma mesma proteína ancestral e provavelmente possuem similaridades em suas estruturas terciárias e mecanismo catalítico (Mobley *et al.*, 1995, Sirko *et al.*, 2000). Apesar de suas estruturas e ação enzimática altamente conservadas, pouco se sabe sobre o papel fisiológico de ureases nos organismos onde são encontradas.

As ureases de uma maneira geral apresentam diversas atividades biológicas não relacionadas com sua atividade enzimática.

A Canatoxina (CNTX), isolada de *Canavalia ensiformis* em 1981 por Carlini & Guimarães e posteriormente identificada como uma isoforma da urease clássica (JBU), é letal para ratos e camundongos quando administrada intraperitonelamente mas inativa por via oral. Consiste de um dímero ligado não covalentemente com subunidade de ~ 95 kDa.

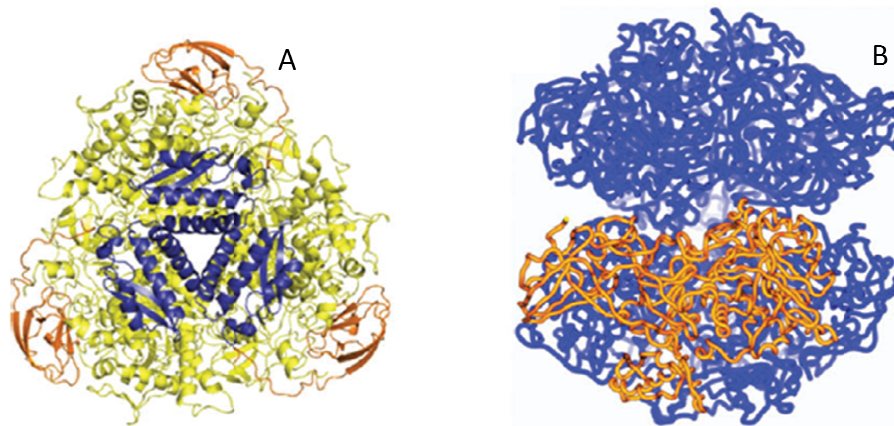


Fig. 1. A) Urease de *Klebsiella aerogenes*, um trímero. (B) Estrutura de urease de *C. ensiformis* ligada a um anticorpo, onde dois trímeros interagem de forma frontal. Sheridan *et al.*, 2002.

A CNTX apresenta, *in vitro*, potente atividade secretagoga sobre vários sistemas celulares isolados, induzindo agregação e secreção de plaquetas (Carlini *et al.*, 1985, Barja-Fidalgo *et al.*, 1991a), secreção de dopamina e serotonina em sinaptossomas de cérebro de rato (Barja-Fidalgo *et al.*, 1991a), liberação de histamina de mastócitos (Grassi-Kassisse *et al.*, 1992) e secreção de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas (Barja-Fidalgo *et al.*, 1991a e 1991b).

A maioria desses efeitos, tanto *in vivo* como *in vitro* aparentemente envolve a ativação do metabolismo do ácido araquidônico, principalmente pela rota da lipoxigenase, já que eles são bloqueados por inibidores de lipoxigenase.

Assim como a CNTX, JBU também é capaz de ativar plaquetas e ter atividade de lectina monovalente (ligação a carboidratos). No entanto, não apresenta efeito tóxico em camundongos quando administrada intraperitonealmente, provavelmente devido ao seu maior tamanho: 540 kDa contra 185 kDa apresentado pela CNTX (Follmer *et al.*, 2001).

Assim como CNTX e JBU, ureases bacterianas de *Helicobacter pylori* e *Bacillus pasteurii* também apresentam atividades biológicas independente de suas atividades ureolíticas, como por exemplo, ativação de plaquetas. Ureases vegetais e microbianas induzem agregação plaquetária pela via da lipoxigenase (Carlini *et al.*, 1985, Olivera-Severo *et al.*, 2006, Wassermann *et al.*, 2009)

CNTX e JBU interagem com polisialogangliosídeos (GD1b e GT1b) e sialoproteínas (mucina, tireoglobulina, fetuína) na superfície de eritrócitos e em microplacas de ELISA (Carlini & Guimarães, 1991, Follmer *et al.*, 2001). Essa propriedade de ligação a carboidratos provavelmente “direciona” as proteínas para as superfícies de células ricas com esses tipos de glicoconjugados e pode ser a explicação para a seletividade tecido-específica.

A ativação de plaquetas induzida por ureases de plantas ou de bactérias requer a produção de eicosanóides derivados da via da 12-lipoxigenase e aumento da concentração citoplasmática de cálcio. Isso foi demonstrado através da inibição da agregação induzida por ureases na presença de diferentes inibidores da 12-lipoxigenase plaquetária, como o ácido nordihidroguairético e a esculetina, e por inibidores da fosfolipase A2 (Carlini *et al.*, 1985, Barja-Fidalgo *et al.*, 1991a e 1991b, Ghazaleh *et al.*, 1997, Olivera-Severo *et al.*, 2006), que

libera o substrato ácido araquidônico, de fosfolípidos da membrana, e pela detecção de um metabólito derivado dessa rota em plaquetas ativadas (Wassermann *et al.*, 2009). A indometacina, um inibidor da via das ciclooxigenases, potencia o efeito agregante das ureases, como consequência dá maior oferta de ácido araquidônico para a via das lipoxigenases (Carlini *et al.*, 1985, Olivera-Severo *et al.*, 2006, Wassermann *et al.*, 2009).

Também foi demonstrado que a agregação plaquetária induzida por urease é inibida por metoxi-verapamil, um bloqueador de canais de cálcio voltagem-dependentes (Ghazaleh *et al.*, 1997, Olivera-Severo *et al.*, 2006, Wassermann *et al.*, 2009). A agregação plaquetária é acompanhada de um aumento da concentração citoplasmática de cálcio livre, que resulta de influxo de cálcio através de canais na membrana plasmática.

1.2. Efeito Inseticida

Ambas isoformas de urease de *C. ensiformis*, CNTX e JBU, como a urease da semente de soja, SBU, são tóxicas para insetos que apresentam enzimas proteolíticas do tipo catepsinas B e D. Essa toxicidade é dependente da liberação de um peptídeo interno de 10 kDa quando a proteína é hidrolisada por essas enzimas ácidas (Carlini *et al.*, 1997, Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Algumas importantes pragas da agricultura são sensíveis a essas proteínas, como por ex.: o caruncho do feijão de corda (*Callosobruchus maculatus*), o percevejo verde da soja (*Nezara viridula*) e o percevejo manchador do algodão

(*Dysdercus peruvianus*) (Carlini & Grossi de Sá, 2002, Stanisçuaski *et al.*, 2005). O barbeiro *Rhodnius prolixus*, vetor da doença de chagas também é sensível aos efeitos das ureases (Carlini *et al.*, 1997). Outros tipos de insetos, como as lagartas *Manduca sexta* e *Anticarsia gemmatalis*, o gafanhoto *Schistocerca americana*, moscas e mosquitos, não são afetados quando ingerem a proteína.

O peptídeo tóxico produzido por hidrólise da CNTX *in vitro* por enzimas da larva de *C. maculatus*, foi purificado, caracterizado e denominado Pepcanatox (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000; Carlini *et al.*, 2000). A partir deste, foi obtido por expressão heteróloga um peptídeo equivalente recombinante, denominado Jaburetox-2Ec (Mulinari *et al.*, 2007). Esse peptídeo tem um espectro mais amplo de ação inseticida (Fig. 2), atuando sobre insetos insensíveis à urease intacta, age mais rápido do que as proteínas de origem e não é tóxico quando administrado por via oral ou injetado em ratos e camundongos (Mulinari *et al.*, 2007).

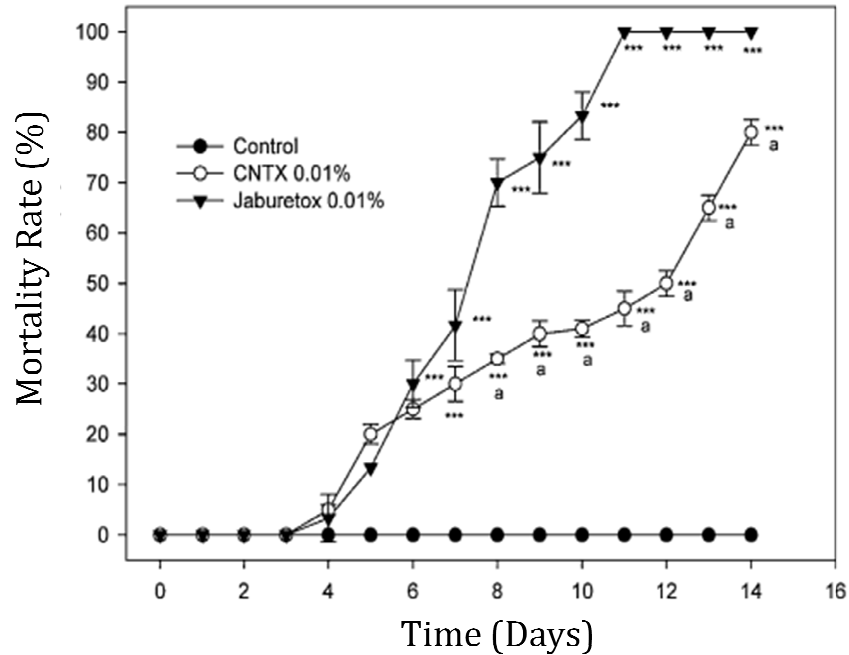


Fig. 2. Efeito inseticida do peptídeo recombinante Jaburetox-2Ec comparado com CNTX. Extraído de Mulinari *et al.*, 2007.

O mecanismo de ação inseticida das ureases ou peptídeos derivados ainda não está completamente elucidado. Já foi demonstrado que JBU e o Jaburetox-2Ec reduzem a diurese de *R. prolixus* após alimentação, sugerindo um efeito no balanço de água e íons na célula. JBU age alterando canais de cálcio enquanto Jaburetox-2Ec altera potencial transmembrana das células dos túbulos de Malpighi (Stanisçuaski *et al.*, 2009).

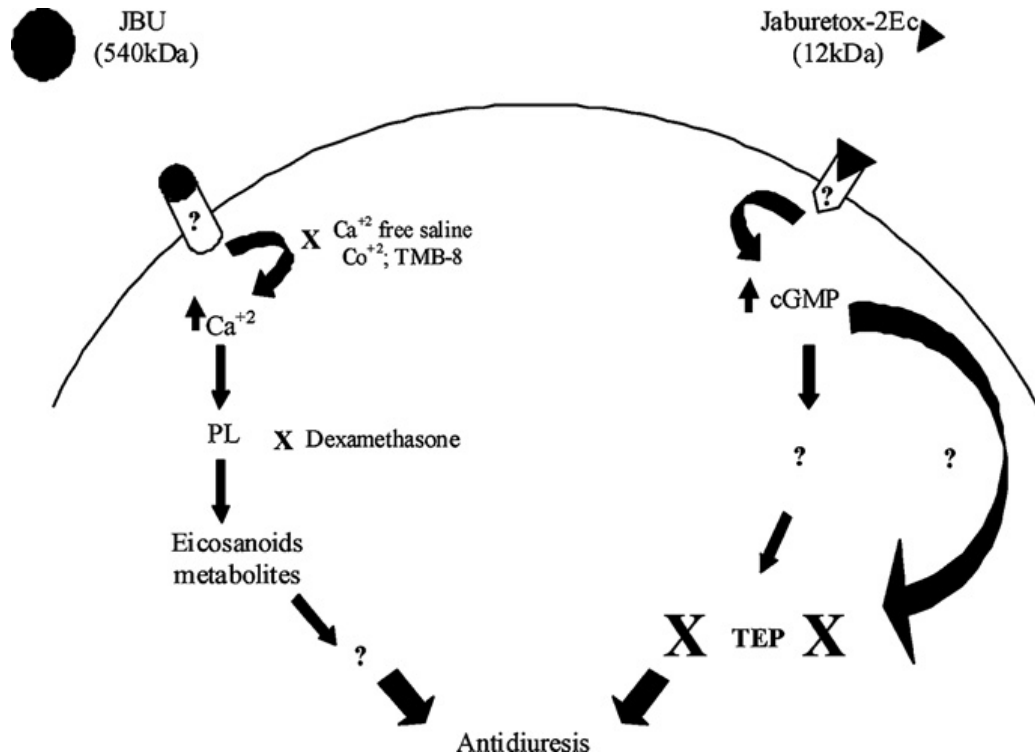


Fig. 3. Possível mecanismo de ação da JBU e Jaburetox-2Ec em túbulos de Malpighi de *R. prolixus*, mostrando que as duas toxinas têm ação antidiurética no inseto recrutando vias diferentes, sendo que apenas o peptídeo altera o potencial transepitalial (TEP). Extraído de Stanisçuaski *et al.*, 2009.

A modelagem molecular do peptídeo Jaburetox-2Ec foi primeiramente feita por Mulinari *et al.*, 2007 para verificar suas propriedades estruturais e poder relacionar com seu modo de ação. Já se sabe que o peptídeo não inibe as enzimas digestivas de insetos. Após ingestão do Jaburetox-2Ec, os insetos são momentaneamente paralisados e mostram movimentos descoordenados de antenas que precede a morte, sugerindo que o peptídeo possa agir como uma neurotoxina.

Recentemente foi visto que Jaburetox-2Ec tem capacidade de romper membranas em bicamadas lipídicas ácidas através da permeabilização de lipossomas e este efeito é fortemente influenciado pelo estado de agregação do peptídeo (Barros *et al.*, 2009).

Corroborando estes dados, Mulinari *et al.*, 2007 e posteriormente Barros *et al.*, 2009, identificaram, por modelagem molecular, um motivo β -hairpin na estrutura do peptídeo (Fig. 4.) similar à estrutura de algumas peptídeos neurotóxicos formadores de poro/canal como *protegrina-1* (PDB ID: 1pg1), *taquipesina-1* (PDB ID: 1wo0), *polifemusina PV5* (PDB: 1x7k) (Barros *et al.*, 2009) ou inibidores de canal de sódio, como *caribdotoxina*.

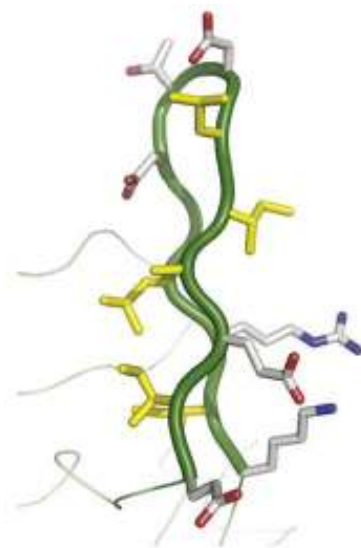


Fig. 4. Modelagem *ab initio* mostrando o motivo β -hairpin, com características anfipáticas, presente na estrutura de Jaburetox-2Ec. Mulinari *et al.*, 2007.

1.3. Membrana Celular

1.3.1. Estrutura da Membrana

Todas as membranas de células eucarióticas separam compartimentos funcionais, mas a membrana da superfície celular – membrana plasmática – é um extremo. A membrana plasmática é uma bicamada lipídica, cuja composição regula o transporte de moléculas entre os arredores da célula e seu interior, e as propriedades da bicamada são diferentes daquelas de qualquer um dos compartimentos sozinhos (Edidin M., 2003). A membrana plasmática corresponde a uma pequena fração do total de membrana presente em uma célula. Mais de 50 % da quantidade de membrana de uma célula é reservada para o retículo endoplasmático, que está presente em quase todos os 220 tipos celulares do corpo humano (Pietzsch J., 2004).

Gradientes iônicos ao longo da membrana, estabelecidos pelas atividades de proteínas de membrana especializadas, podem ser usados para sintetizar ATP, direcionar o movimento transmembrana de solutos selecionados, ou, como em fibras nervosas e em células musculares, para produzir e conduzir sinal elétrico. Em todas as células, a membrana plasmática também contém proteínas que agem como sensores de sinais externos, ou receptores, permitindo a célula mudar seu comportamento em resposta a estímulos ambientais, incluindo sinais de outras células; os receptores transferem informação – ao invés de moléculas – através da membrana.

Apesar de suas diferentes funções, todas as membranas biológicas têm uma estrutura comum: dupla camada lipídica com espessura aproximada de 5 nm que se organiza na presença de proteínas principalmente por interações não-covalentes. A bicamada lipídica confere a estrutura fluida básica da membrana e funciona relativamente como uma barreira impermeável à passagem da maioria das moléculas hidrossolúveis (Fig. 5). As proteínas transmembranas mediam aproximadamente todas as outras funções da membrana, transportando moléculas específicas ou catalizando reações associadas à membrana como, por exemplo, a síntese de ATP. A organização em α -hélice das proteínas transmembranas posiciona os aminoácidos hidrofóbicos em contato direto com o interior da bicamada lipídica e permite que as pontes de hidrogênio da cadeia polipeptídica fiquem no interior da α -hélice. Assim, a formação de uma α -hélice retorcida é termodinamicamente favorável para a região transmembrana das proteínas integrais e é o motivo predominante entre todas as proteínas integrais de membrana (Dowhan & Bogdanov, 2009).

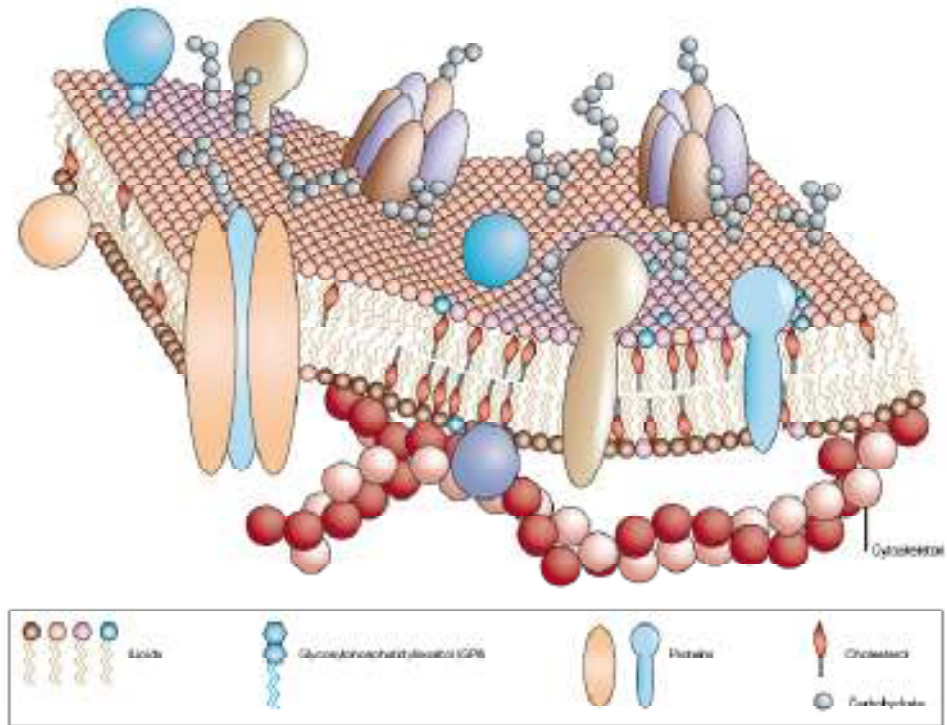


Fig. 5. Modelo Mosaico-Fluido da membrana celular. Como o mosaico, a membrana é uma estrutura complexa composta de muitas partes diferentes, como proteínas, fosfolípídios e colesterol. A quantidade relativa destes componentes varia de acordo com a membrana, bem como o tipo de lipídio. Extraído de Pietzsch, 2004.

1.3.2. Bicamada Lipídica

A bicamada lipídica é a estrutura básica de todas as membranas celulares. É facilmente visualizada por microscopia eletrônica e sua estrutura é atribuída exclusivamente às propriedades especiais das moléculas lipídicas, que interagem espontaneamente formando bicamadas mesmo sobre simples condições artificiais.

Membranas biológicas em geral contêm diversos fosfolípídios e glicolípídeos e esteróis, que correspondem aproximadamente 50% em massa da

membrana, a outra metade é constituída pelas proteínas de membrana (Opekarová & Tanner, 2003)

Todos os lipídios das membranas celulares são anfifílicos, ou seja, uma extremidade apolar e outra polar. Os lipídeos de membrana mais abundantes são os fosfolipídeos. Estes têm a “cabeça” polar e duas caudas hidrofóbicas de hidrocarbonetos. Em células animais, vegetais e bacterianas as caudas são usualmente ácidos graxos e podem diferir em comprimento (normalmente possuem entre 14 e 24 átomos de carbono). Diferenças no comprimento e na saturação das caudas de ácidos graxos influenciam como os fosfolipídeos interagem um com o outro, consequentemente afetando a fluidez da membrana.

1.3.3. Fosfolipídeos de Membrana

Fosfoglicerídeos: principal fosfolipídeo na maioria das membranas celulares animais, é formado por um grupamento glicerol de três carbonos, dois destes carbonos interagem com as duas cadeias de ácido graxo adjacentes, o terceiro carbono se liga a um grupamento fosfato que por sua vez se liga a um de vários tipos diferentes de grupamento polar. Combinando diferentes tipos de ácidos graxos e grupos polares as células produzem muitos diferentes fosfoglicerídeos, como por exemplo: fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilcolina (PC), os principais nas membranas celulares de mamíferos. Entre os fosfolipídios, PC é geralmente considerado o lipídio formador de bicamada e é encontrado na maioria das membranas (Opekarová &

Tanner, 2003). Todas as membranas biológicas têm pelo menos um componente lipídico não formador de bicamada.

Esfingomielina: importante fosfolípídeo construído a partir de esfingosina ao invés de glicerol. Esfingosina é uma longa cadeia insaturada com um grupo amino (NH_2) e dois grupamentos hidroxila (OH) em um extremo da molécula. Para formar a esfingomielína, uma cauda de ácido graxo é ligada ao grupamento amino e um grupamento fosfocolina no grupamento terminal hidroxila.

Além dos fosfolípídeos, as bicamadas lipídicas em muitas membranas celulares contêm colesterol e glicolípídeos. Membranas celulares eucarióticas contêm especialmente grande quantidade de colesterol, cada molécula de PE pode acomodar uma molécula de colesterol enquanto que cada molécula de PC acomoda duas moléculas de colesterol (Mukherjee & Maxfield, 2004). Sendo um esterol, colesterol contém um anel rígido no qual se liga um grupamento hidroxila polar e uma cadeia carbônica não polar curta. As moléculas de colesterol se orientam nas bicamadas com seus grupos polares perto das cabeças polares dos fosfolípídeos adjacentes.

1.4. Canais Iônicos Dependentes de Voltagem

Os canais iônicos dependentes de voltagem são canais que por definição são ativados por uma alteração na diferença de potencial elétrico próximo ao canal. São poros transmembrana encontrados praticamente em todas as membranas celulares de importância fisiológica crucial que permitem a passagem de íons para dentro e fora da célula a favor do gradiente eletroquímico. Suas funções conhecidas incluem estabelecer o potencial de repouso de uma célula, disparar sinal elétrico, controlar o fluxo de íons Ca^{2+} , o volume celular e regular o fluxo de íons e fluidos através das células epiteliais de tecidos secretores e absorptivos.

Canais iônicos são compostos de uma ou mais unidades formadoras de poro, frequentemente associadas com subunidades acessórias. A maioria dos canais se organiza em um tema estrutural comum onde o poro central, pelo qual os íons se deslocam, é formado por quatro ou cinco α -hélices transmembranas que se organizam parecendo as aduelas de um barril.

Existem centenas de diferentes tipos de canais iônicos e eles se diferenciam na sua seletividade iônica, mecanismo de abertura e similaridade de seqüência. Canais iônicos podem ser dependentes de voltagem, dependentes de ligante, dependentes de pH ou ativados mecanicamente. Eles não estão restritos apenas às células excitáveis, são presentes em todas as células animais, células vegetais e de microorganismos: são responsáveis em propagar

a resposta de fechamento da planta mimosa e permitem o *Paramecium* reverter a direção após uma colisão.

1.4.1. Poro X Canal

Duas propriedades importantes distinguem canais iônicos de simples poros. Primeiro, os canais apresentam seletividade iônica, permitindo que alguns íons orgânicos passem, mas não outros. Isso sugere que seus poros devem ser estreitos suficientes em regiões para forçar os íons permeáveis a estabelecer contato íntimo com as paredes do canal de forma que somente os íons com o tamanho e carga apropriados possam passar. Essa propriedade dos canais é conferida pelo *filtro seletivo*.

A segunda importante diferença entre canais iônicos e poros aquosos simples é que canais iônicos não estão continuamente abertos. Ao contrário, eles podem ser ativados, o que os permite abrir brevemente e então fechar novamente. Além disso, com estímulo prolongado (químico ou elétrico) muitos canais entram no período refratário, em que somente poderão ser abertos novamente após o estímulo ser removido.

1.4.2. Canais de K^+

Os canais de potássio são os mais abundantes e possuem a maior diversidade entre os canais iônicos. Foram descobertos por Julius Bernstein em

1902 quando o fisiologista alemão propôs a “Teoria da Membrana” do potencial elétrico em tecidos e células, que foi considerada a primeira explicação físico-química dos eventos bioelétricos. Segundo Bernstein, as células excitáveis eram cercadas por uma membrana seletivamente permeável à íons K^+ no estado de repouso e que durante a excitação a permeabilidade de membrana a outros íons aumentava.

Projetos de genoma e clonagem já revelaram mais de 80 genes de mamíferos relacionados para as subunidades de canais K^+ -seletivos. Embora eles existam em diversas arquiteturas, canais de potássio podem ser reconhecidos por certas características comuns. Todos eles têm P-loops “pore-lining” com uma sequência consenso de aminoácidos, TXXTXGYGD - (-thr-X-X-thr-X-gly-tyr-gly-glu-), que tem sido chamada de “sequência de identificação” (“signature sequence” – Heginbothan *et al.*, 1992, 1994.) do canal de potássio. Os resíduos TXGYG, repetidos nas quatro principais subunidades, alinham o filtro seletivo. Flanqueando a região-P estão pelo menos dois segmentos transmembranas necessários para completar o centro formador do poro. Esta arquitetura mais simples define um canal de K^+ com duas estruturas transmembranas que pode ser a forma primitiva. O canal de K^+ bacteriano KcsA (Fig. 7) , que foi o primeiro a ser revelado em resolução atômica tem esta arquitetura simples (Doyle *et al.*, 1998)

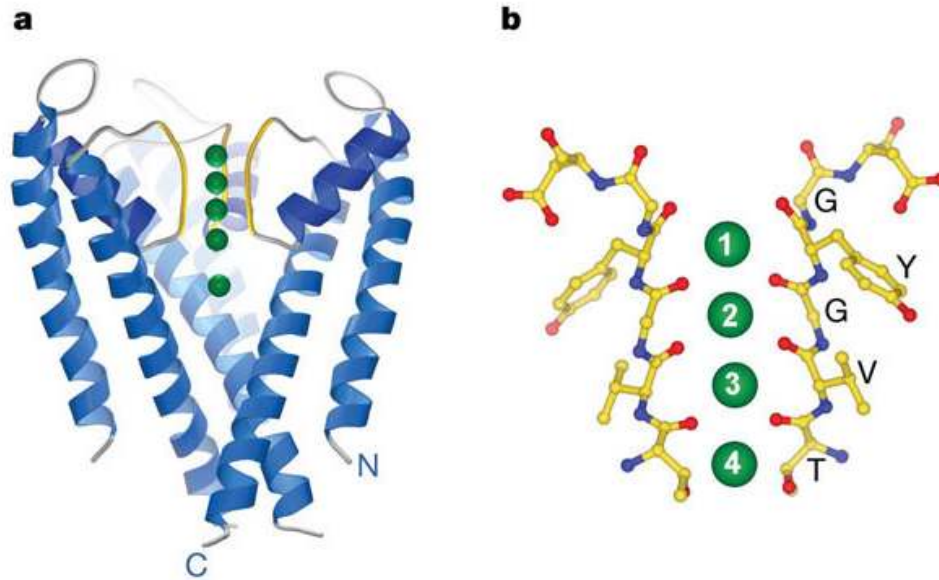


Fig. 7. A) Representação do canal KcsA com as subunidades mais próximas do leitor removidas. Íons de potássio (esferas verdes) se ligam em quatro locais diferentes no filtro seletivo (amarelo) e na cavidade preenchida com água no centro da membrana (íon basal). B) Vista detalhada do filtro seletivo em representação esquemática, com as subunidades frontal e posterior removidas. Os quatro íons de potássio estão numerados para indicar o local dos sítios de ligação no filtro; posição 1 é a mais perto da solução extracelular e posição quatro é mais perto da cavidade. Os aminoácidos-chave para a formação do filtro seletivo estão destacados. Extraído de Morais-Cabral *et al.*, 2001.

1.4.3. Canais de Na⁺

Canais de sódio são elementos chave na função celular já que eles participam da geração e propagação do potencial de ação em neurônios e a maioria de células excitáveis presentes em diferentes tecidos de vários organismos. Quando a membrana celular é despolarizada por poucos milivolts, canais de sódio ativam e inativam dentro de milissegundos. Os canais de sódio dependentes de voltagem formam uma estrutura grande, complexo multimérico (Fig. 8), composto de uma subunidade α formadora de poro (aproximadamente 260 kDa) que pode estar associada com até quatro diferentes subunidades β

(30-40 kDa) (Catterall, 2000). As subunidades α são organizadas em quatro domínios homólogos (I – IV), cada um contendo seis α -hélices transmembranas (S1 – S6) e um poro “lining loop” localizado entre os segmentos S5 e S6.

Em mamíferos, nove isoformas de canais de Na^+ foram identificadas (Goldin *et al.*, 2000). A estrutura primária de canais de Na^+ de insetos é similar à dos mamíferos (Zlotkin, 1999)

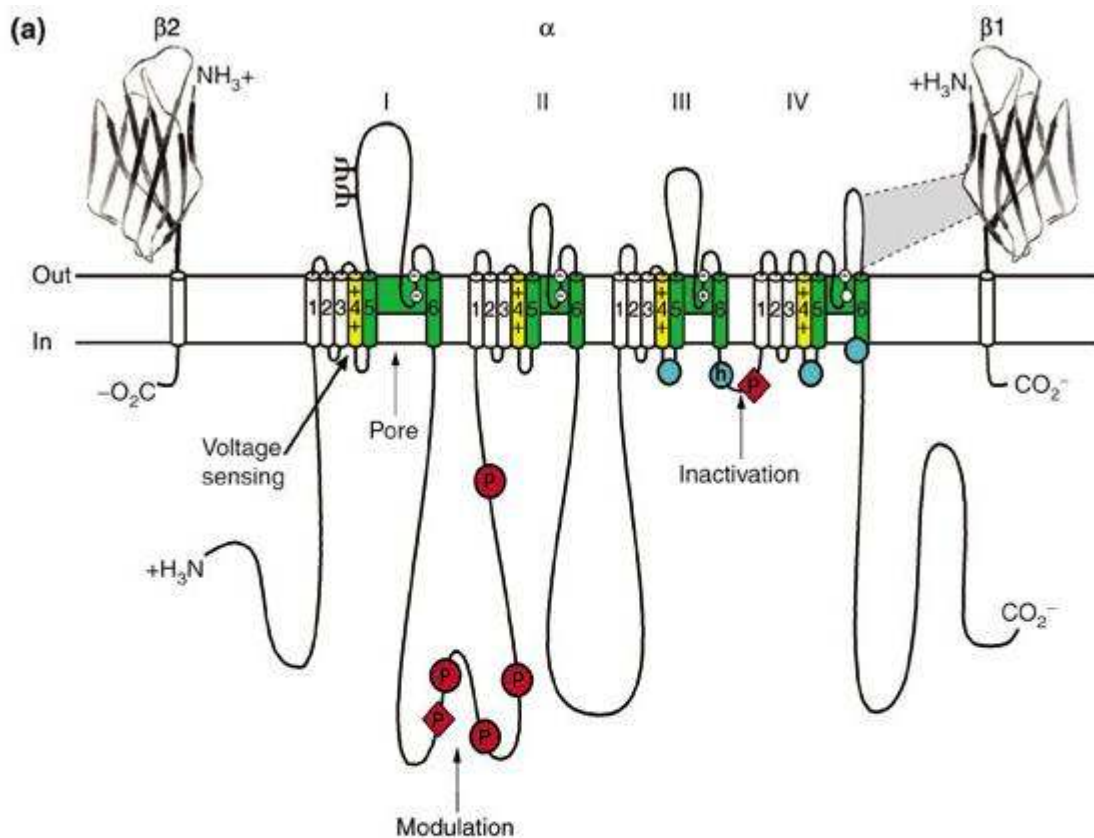


Fig. 8. Estrutura dos canais de sódio. Representação esquemática das subunidades dos canais de sódio. A subunidade α do canal está ilustrada junto com a subunidade $\beta 1$ e $\beta 2$. Numerais romanos indicam os domínios da subunidade α . Os segmentos 5 e 6 (em verde) são responsáveis em formar o poro aos íons. O segmento 4 (amarelo) é o sensor de voltagem. Extraído de Yu & Catterall, 2003.

1.4.4. Canais de Ca^{2+}

Canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCCs) desempenham um papel central na transmissão sináptica, controle de excitabilidade e muitos outros processos celulares. Os canais de cálcio foram primeiramente identificados em músculos de um crustáceo por Paul Fatt e Bernard Katz (1953). Estes autores retiraram o íon Na^+ do meio de solução e observaram que os músculos continuavam gerando potencial de ação. Esses canais foram estudados anos depois extensivamente por Hagiwara *et al.*, 1975 . O Ca^{2+} é geralmente presente em concentrações de poucos mM no meio extracelular mas dentro da célula a concentração citoplasmática situa-se em torno de $0.1 \mu\text{M}$, mantida baixa por diferentes bombas e sistemas tamponantes. VDCCs são encontrados em todos os tipos de células excitáveis de vertebrados, invertebrados em plantas.

Existem diversos tipos de canais de Ca^{2+} com vários modos de modulação. Estes canais podem ser divididos em dois subgrupos baseados em seu limiar de ativação: “low-voltage-activated” (LVA) e “high-voltage-activated” (HVA).

Na década de 80, a proteína formadora do canal de cálcio foi purificada e foram identificadas várias subunidades componentes (Borsotto *et al.*, 1985; Flockerzi *et al.*, 1986; Sieber *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 1987; Vaghy *et al.*, 1987; Leung *et al.*, 1988). A subunidade principal de VDCCs foi chamada de $\alpha 1$, e as auxiliares, β , $\alpha 2$, δ , and γ (Fig. 9). A subunidade $\alpha 1$, que forma o poro condutor iônico é regulada pelas suas subunidades acessórias: subunidade

intracelular β , subunidade transmembrana γ e um complexo formado pela subunidade extracelular α_2 ligado por ponte dissulfeto na porção transmembrana δ . A subunidade α_1 forma o poro iônico, possui funções de gatilho e, em alguns casos, sítio de ligação a drogas. Cada subunidade α_1 tem quatro domínios homólogos (I-IV) que são compostos de seis hélices transmembranas. A quarta hélice de cada domínio contém a função de sensor de voltagem. O poro é formado pelo *cluster* dos quatro domínios α_1 . A subunidade β é localizada intracelularmente e está envolvida principalmente na estabilidade da conformação final da subunidade α_1 e no seu correto posicionamento na membrana celular. A subunidade γ é uma glicoproteína com quatro segmentos transmembrana. A subunidade α_2 é uma proteína extracelular altamente glicosilada que está unida à subunidade δ por pontes dissulfeto. O domínio α_2 fornece suporte estrutural necessário para a estimulação do canal, enquanto o domínio δ modula a ativação dependente de voltagem e inativação “steady-state” do canal.

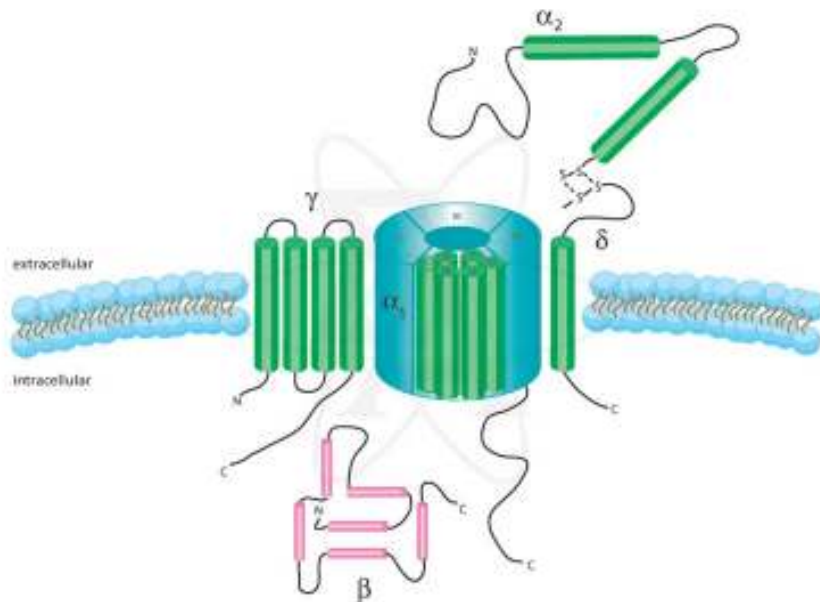


Fig. 9. Estrutura esquemática dos canais de cálcio. Esses canais são heteromultímeros compostos de uma subunidade α_1 e três subunidades auxiliares α_2 - δ , β e γ . Extraído de Jones S.W., 1998.

1.4.5. Canais de Cl^-

Cloreto é o ânion fisiológico mais abundante em tecidos (Riquelme G, 2009), em muitas células ele é distribuído quase em equilíbrio de forma que a concentração citoplasmática de Cl^- está sempre abaixo da concentração extracelular e o potencial de equilíbrio é próximo ao potencial de repouso.

Canais de cloreto (Fig. 10) são permeáveis a muitos outros pequenos ânions, como por exemplo: Br^- , I^- , NO_3^- , HCO_3^- e SCN^- , assim como muitos ácidos orgânicos pequenos. Por isso, eles podem ser igualmente denominados de canais de ânions. Canais ânion-seletivos têm sido classificados em diversos grupos baseados nas propriedades funcionais, como voltagem-dependência, condutância, seletividade, sensibilidade a bloqueadores, cinética, estrutura

molecular e localização subcelular. Estudos eletrofisiológicos e de famílias gênicas revelam grandes diferenças nas propriedades biofísicas dos canais de ânions, como por exemplo, condutância do canal-único, mecanismos de regulação e sensibilidade farmacológica (Riquelme G, 2009).

Mamíferos expressam nove isoformas de canais de cloreto que diferem na distribuição tecidual e localização subcelular. Alguns destes são canais de cloreto da membrana plasmática, que exercem papel importante no transporte transepitelial (Jentsch J, 2008).

O transporte iônico através de canais ocorre via difusão iônica contra o gradiente eletroquímico. As funções dos canais de cloreto, assim como outros canais, carreadores e bombas, incluem a regulação do volume celular, homeostase iônica, transporte transepitelial, regulação da excitabilidade elétrica, secreção, absorção, etc (Riquelme G, 2009).

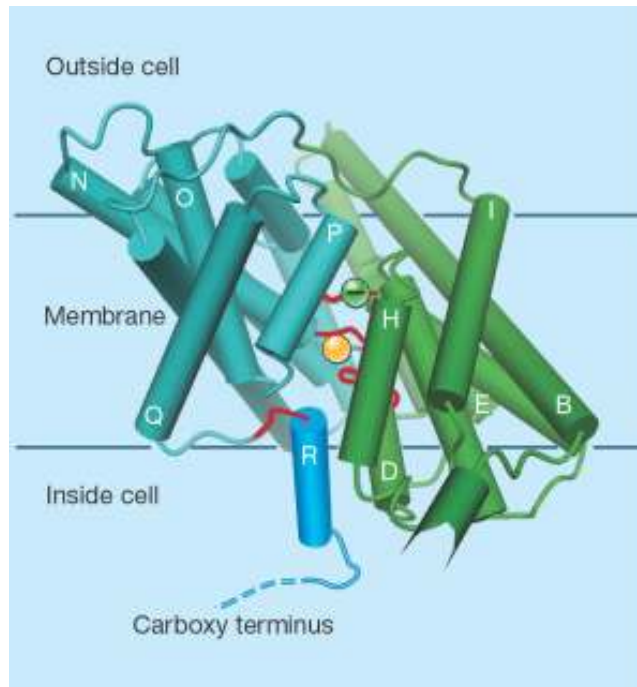


Fig. 10. Vista das duas subunidades de um canal de cloreto onde as α -hélices estão indicadas por cilindros. Regiões diretamente envolvidas na formação do canal do estão coloridas em vermelho. O círculo verde está representando uma carga negativa que deve estar envolvida no gatilho do canal. Íon cloreto representado como uma esfera amarela. A hélice R possui uma tirosina responsável por coordenar o íon cloreto. Extraído de Jentsch T.J., 2002.

1.5. Eletrofisiologia

É o estudo das propriedades elétricas de células e tecidos. Envolve medidas de mudanças de voltagem e corrente iônica em ampla variedade de escalas, de canais iônicos únicos até órgãos inteiros, como o coração. Em neurociência, inclui medidas da atividade elétrica de neurônios, particularmente a atividade de potencial elétrico.

O estudo de eletrofisiologia de um canal iônico implica, pelo menos, caracterizar o estímulo que abre ou fecha o canal (probabilidade de abertura do canal *versus* voltagem, concentração de ligante ou tensão da membrana), a

condutância do canal sob condições iônicas específicas e a especificidade de um canal (quais íons podem passar).

No geral, as atividades de canais iônicos podem ser estudadas na membrana plasmática nativa de células pela técnica de *patch-clamp* ou por técnicas de microeletrodos, ou, após purificação da proteína e reconstituição, em bicamada lipídica planar (planar lipid bilayer ou PLB).

Técnicas de eletrofisiologia:

a) *Patch-clamp*: permite o estudo de múltiplos ou únicos canais iônicos em células. Foi desenvolvida por Erwin Neher e Bert Sakmann no final da década de 1970 o que lhes rendeu em 1991 o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina. A técnica é baseada numa simples idéia: uma pipeta de vidro com uma micro abertura ($\sim 1 \mu\text{m}$) é usada para fazer um estreito contato em uma minúscula área, ou “patch”, de uma membrana celular. Após aplicação de uma leve sucção na pipeta, o selo entre a pipeta e a membrana se torna tão firme que nenhum íon pode fluir no espaço entre a pipeta e a membrana. Então, todos os íons que fluem quando um canal iônico está aberto devem fluir pela pipeta (Fig. 11). A corrente iônica resultante, apesar de pequena, pode ser medida com um amplificador eletrônico ultrasensível conectado à pipeta, onde estará anexado o eletrodo. Existem diversas variações da técnica mas o princípio básico é este descrito acima.

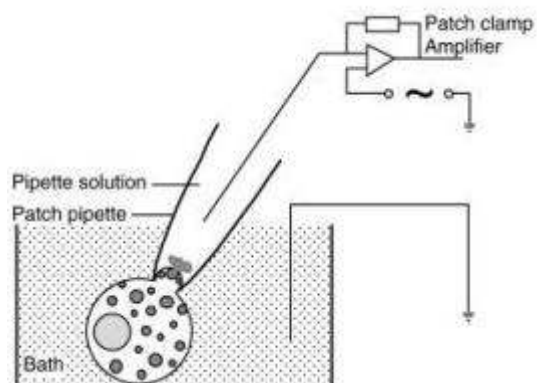


Fig. 11. Técnica de Patch-Clamp convencional, em que uma micropipeta de vidro é selada através de leve sucção na membrana celular permitindo assim medir a corrente de um único canal iônico. Adaptado de Dernick et al., 2007.

- b) *Planar Lipid Bilayer*: Esta técnica (Fig. 12) permite demonstrar a capacidade de uma proteína em permeabilizar membranas lipídicas através da medida da atividade de canais iônicos em membranas lipídicas artificiais. Consiste em formar uma membrana bilipídica planar numa abertura que conecta dois compartimentos aquosos, *cis* e *trans*. Após, a molécula a ser testada é adicionada no lado *cis* e pode se incorporar na membrana. O sistema está sob voltagem e a corrente que flui pelo canal inserido na membrana é monitorada. Maiores detalhes da técnica serão descritos na seção “Material e Métodos”.

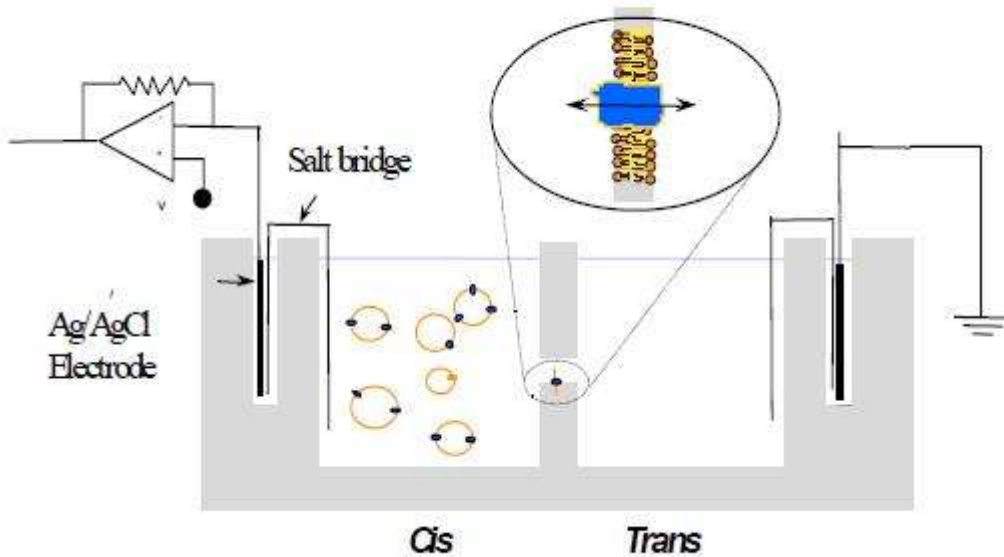


Fig. 12. Esquema do sistema da técnica de PLB, em que a bicamada lipídica é formada na abertura de 250 μm entre os compartimentos *cis* e *trans*, como exemplificado na figura. Extraído de Ghazi, 2003.

- c) Registro Intracelular: é a medida de corrente e/ou voltagem através da membrana de uma célula. Para realizar este registro intracelular a ponta de um fino e afiado microeletrodo deve estar inserido dentro da célula de forma que o potencial de membrana possa ser medido. Tipicamente, o potencial de repouso de uma célula saudável estará entre -60 e -80 mV, e durante um potencial de ação o potencial de membrana poderá atingir +40 mV. Geralmente a pipeta é feita de vidro, a ponta tem um diâmetro menor que 1 μm e uma resistência de vários megaohms. As micropipetas são preenchidas com uma solução de composição iônica semelhante ao fluido intracelular. A voltagem medida pelo eletrodo é comparada à voltagem do eletrodo de

referência, normalmente um fio de prata cloretado em contato com o fluido extracelular ao redor da célula.

1.5.1. Assinaturas de um canal

Canais iônicos têm assinaturas que precisam ser determinadas para bem caracterizar a atividade de um canal em estudos relacionados com estrutura-função.

(1) *Condutância*: é a habilidade que um canal tem em conduzir ions através da membrana; é medida em siemens (S). A Lei de Ohm exerce papel fundamental nos estudos de biofísica de membranas porque cada canal iônico é um condutor elementar inserido na membrana celular. A condutância elétrica de uma membrana é a soma de todos essas condutâncias elementares em paralelo. É uma medida de quantos canais iônicos estão abertos, quantos íons estão disponíveis para fluir através dos canais, e o quão facilmente os íons passam. A Lei de Ohm será discutida em detalhes em seguida.

(2) *Retificação*: essa característica é observada quando a condutância de ions através do canal muda de acordo com a voltagem de tal forma que flui melhor em uma direção em relação a outra.

(3) *Seletividade*: se refere à habilidade que os canais têm em discriminar espécies iônicas, permitindo alguns passar e restringindo outros. O

movimento de íons através de um canal depende do gradiente eletroquímico ao longo da membrana e a seletividade do poro.

(4) *Voltagem-dependência*: expressa a dependência do comportamento do canal ao potencial de membrana (voltagem aplicada). É principalmente observada pela probabilidade de abertura de um canal.

(5) *Cinética (atividade)*: a cinética usualmente contém o estudo da taxa de mudança que um canal sofre durante a modulação, passagem de íons, etc. A cinética é frequentemente usada para descobrir os mecanismos específicos dos canais iônicos ilustrados pela mudança de um estado para outro e para explicar o fenômeno de gatilho (gating), “jumps”, “bursts”, tempo de transição, modos de sub-condutâncias, interação de ligantes, etc.

1.6. Lei de Ohm

No começo do século XIX, Georg Simon Ohm mostrou experimentalmente que a corrente iônica, em condutor, é diretamente proporcional à diferença de potencial ou voltagem aplicada e inversamente proporcional à resistência do material entre eles. A equação matemática que descreve essa relação é:

$$I=V/R$$

onde V é a diferença de potencial em volts; I é a corrente medida em amperes e R é a resistência do condutor medida em ohms. Desta fórmula inicial obtém-se $R=V/I$. Sabendo que a resistência de um circuito é o oposto de sua condutância,

para estudar os canais iônicos, esta fórmula pode ser escrita em termos de condutância (g):

$$g=I/V$$

Na prática do laboratório a medida de condutância é rapidamente definida calculando a relação entre corrente iônica em pA que passa pelo canal e a voltagem em mV, e multiplicando o valor por 1000 para gerar o resultado em pS: (pA/mV*1000). Por ex: $g=50\text{pA}/20\text{mV}*1000$; $g=2500$ pS.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAIS

- Caracterizar o processamento enzimático da JBU por ninfas e adultos de *Dysdercus peruvianus* e correlacionar com a susceptibilidade estágio-específica ao efeito inseticida das ureases
- Caracterizar a interação de JBU e do Jaburetox-2Ec com membranas lipídicas *in vitro* através de uma abordagem eletrofisiológica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: serão apresentados no início de cada capítulo da parte experimental

A parte experimental dessa dissertação é composta de dois capítulos.

O **Capítulo I** consiste do artigo intitulado “Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: Role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease”, publicado no periódico *Insect Biochemistry and Molecular Biology*.

O **Capítulo II** consiste de dados ainda não publicados.

Cada capítulo apresenta uma seção de materiais e métodos específica, assim como as referências bibliográficas pertinentes.

Após a Discussão Geral, segue a relação de todas as referências citadas na dissertação.

CAPÍTULO I

Processamento diferencial de urease de *Canavalia ensiformis* por ninfas e adultos de *Dysdercus peruvianus*.

Este capítulo está apresentado na forma de um artigo publicado na revista *Insect*

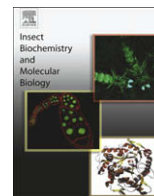
Biochemistry and Molecular Biology

I. Objetivos específicos

- Caracterizar as proteases presentes no trato digestório de insetos adultos e ninfas de *Dysdercus peruvianus*, definindo pH ótimo de atividade, perfil de inibição com inibidores classe-específicos e substratos protéicos e sintéticos.
- Realizar a hidrólise *in vitro* da urease com o homogeneizado de intestino de ninfas e adultos com a finalidade de verificar a formação de peptídeo(s) reconhecido(s) pelo anticorpo anti-Jaburetox-2Ec.

Resumo

As ureases de *Canavalia ensiformis* são tóxicas a insetos de diferentes ordens. A entomotoxicidade das ureases é devido a liberação de um peptídeo interno de 10 kDa por proteases do trato digestório do inseto. Anteriormente observamos que, administrada oralmente, a urease é tóxica para ninfas de *Dysdercus peruvianus*, mas não afeta adultos. Aqui nós caracterizamos as atividade proteolíticas majoritárias dos homogeneizados de intestino de *D. peruvianus* e investigamos a hidrólise *in vitro* do peptídeo entomotóxico de 10 kDa pelos homogeneizados. Cisteíno, aspártico e metaloproteases estão presentes em ambos homogeneizados. Variações no pH ótimo e suscetibilidade a inibidores indicaram diferenças no perfil enzimático nos dois estágios de desenvolvimento. Apenas homogeneizado de ninfas libera fragmento(s) de 10 kDa da urease, reconhecido por anticorpos contra o peptídeo entomotóxico. Substratos fluorogênicos contendo sequências parciais da urease que flanqueiam a extremidade N ou C-terminal do peptídeo entomotóxico foram clivadas eficientemente pelo homogeneizado de ninfas, mas muito mais lento pelo homogeneizado de adultos. Classes enzimáticas diferentes nos homogeneizados clivaram os dois substratos sugerindo que a liberação *in vivo* do peptídeo entomotóxico resulta da ação combinada de pelo menos duas proteases diferentes. Esses dados suportam a idéia de que um processamento diferencial da urease ingerida pelos insetos explica, pelo menos em parte, a ausência de toxicidade em adultos.



Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: Role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease

Angela R. Piovesan^{a,1}, Fernanda Stanisçuaski^{b,*,1}, Juliana Marco-Salvadori^a, Rafael Real-Guerra^a, Marina S. Defferrari^a, Célia R. Carlini^{a,b}

^a Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Building 43421, CEP 91501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Department of Biophysics and Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Building 43422, CEP 91501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2008

Received in revised form 24 August 2008

Accepted 11 September 2008

Keywords:

Dysdercus peruvianus

Urease

Proteolytic enzyme

Insecticidal peptide

Enzyme inhibitor

ABSTRACT

Canavalia ensiformis ureases are toxic to insects of different orders. The entomotoxicity of urease is due to a 10 kDa internal peptide released by proteinases in the insect digestive tract. We previously observed that, given orally, urease is toxic to nymphs of *Dysdercus peruvianus*, but does not affect adults. Here we characterized the major proteolytic activities of *D. peruvianus* midgut homogenates and investigated their *in vitro*-catalyzed release of the 10 kDa entomotoxic peptide from urease. Cysteine, aspartic and metalloproteinases are present in both homogenates. Variations in optimal pH and susceptibility to inhibitors indicated differences in the enzyme profiles in the two developmental stages. Only nymph homogenates released ~10 kDa fragment(s) from urease, recognized by antibodies against the entomotoxic peptide. Fluorogenic substrates containing urease partial sequences flanking the N-terminal or the C-terminal portion of the entomotoxic peptide were efficiently cleaved by homogenates from nymphs, but much more slowly by the adult homogenate. Different classes of enzymes in the homogenates cleaved both substrates suggesting that *in vivo* the release of the entomotoxic peptide results from the concerted action of at least two different proteinases. Our findings support the view that a differential processing of ingested urease by the insects explains at least in part the lack of toxicity in adults.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ureases (urea amidohydrolase; EC 3.5.1.5), nickel-dependent enzymes that catalyze the hydrolysis of urea to ammonia and carbon dioxide, are synthesized by plants, fungi and bacteria (Mobley et al., 1995; Follmer, 2008). In plants, ureases are homotrimers or hexamers of a ~90 kDa subunit and participate in the use of urea as nitrogen source (Polacco and Holland, 1993; Sirko and Brodzik, 2000; Follmer, 2008). Canatoxin, a toxic protein isolated from *Canavalia ensiformis* seeds (Carlini and Guimarães, 1981) and more recently identified as a minor isoform of urease (Follmer et al., 2001), displays insecticidal properties (Carlini et al., 1997). Canatoxin and the major isoform of urease of *C. ensiformis* seeds (herein designated “urease”) are toxic to *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae), and this toxicity is independent of their ureolytic

activity (Follmer et al., 2004a; Stanisçuaski et al., 2005; Follmer et al., 2004b).

Insects with cathepsin-like digestive enzymes are susceptible to the toxic effects of urease, while insects with trypsin-like digestive enzymes are not (Carlini et al., 1997), possibly due to differences in the proteolytic processing of ureases in the insects. The entomotoxic activity is due to a 10 kDa internal peptide released from ureases by insect digestive enzymes. This peptide, called pepcanatox, was isolated and characterized (Ferreira-DaSilva et al., 2000). A recombinant peptide, Jaburetox-2Ec equivalent to pepcanatox, obtained by heterologous expression in *Escherichia coli* (Mulinari et al., 2004, 2007), is highly insecticidal and did not affect mice or neonate rats when administered by oral or intraperitoneal routes (Mulinari et al., 2007). Interestingly, Jaburetox-2Ec kills insects that are resistant to intact ureases, such as *Spodoptera frugiperda* (Mulinari et al., 2007) or adults of *Triatoma infestans* (Tomazzeto et al., 2007).

The cotton stainer bug *D. peruvianus* feeds on cotton seeds (*Gossypium hirsutum*), staining the cotton fibers, damaging the seeds, besides being a vector for phytopathogenic microorganisms, and thus can cause heavy losses in cotton production (Gallo, 1988).

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 7606; fax: +55 51 3308 7003.

E-mail address: fernanda.staniscuaski@ufrgs.br (F. Stanisçuaski).

URL: <http://www.ufrgs.br/laprotex>

¹ These authors have contributed equally to this work.

Nymphs are susceptible to canatoxin or urease, while adults are not. In a previous work, we showed that adults and nymphs have distinct repertoires of gut enzymes, and differences in the processing of ureases by stage-specific enzymes were proposed to explain the lack of susceptibility of adults (Stanisçuaski et al., 2005).

Digestive proteinases play two critical roles in insect physiology: breaking down proteins into amino acids essential for growth and development, and inactivating protein toxins ingested as a consequence of feeding (Terra et al., 1996). Endoproteinases belong to one of six groups based on the active site amino acid residue, or metal ion, involved in peptide bond hydrolysis (Barret et al., 1998): serine, cysteine, aspartic acid, glutamic acid, threonine, and metalloproteinases. Insects having midguts with pH in the neutral or alkaline range usually rely on serine proteinases. In contrast, insects having acidic or mildly acidic midguts generally utilize cysteine and aspartic proteinases (Terra et al., 1996; Terra and Ferreira, 1994; Silva et al., 1996; Wilhite et al., 2000).

In this study, we aimed to investigate further the processing of ureases by nymphs and adults of *D. peruvianus*. Because the release of the entomotoxic peptide could be due to the concerted or sequential action of more than one enzyme, we decided to study the enzymatic profile of whole midguts' homogenates. We characterized the enzymatic activities present in these homogenates and performed *in vitro* hydrolysis of urease with gut homogenates. We show that homogenates from nymphs and adults generate different fragments from urease and that a 10 kDa peptide recognized by anti-Jaburetox-2Ec antibodies is formed only by nymph homogenates.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Azocasein, *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido (4-guanidino)-butane (E-64), pepstatin-A, phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), methylcoumarin amide (MCA)-coupled substrates, anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase, nitro-blue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) were purchased from Sigma Chemicals Company (Saint Louis, USA). Hybond-P membrane (PVDF, 0.45 μ m) was from Amersham Biosciences (Little Chalfont, England). Molecular mass markers were from Invitrogen Life Technologies (California, USA). The synthetic peptide substrates coupled to Abz-EDDnp were a kind gift from Dr. Luis Juliano Neto and Dr. Maria Aparecida Juliano (Dept. Biophysics, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil).

2.2. Insects

A colony of *D. peruvianus*, established and operated in our laboratory for five years, is maintained as described (Stanisçuaski et al., 2005). The insects develop from eggs through five nymphal stages in about 20–25 days. The insects were fed with cotton seeds (*G. hirsutum*) and had free access to water.

2.3. Urease and Jaburetox-2Ec

C. ensiformis major urease was purified as previously described (Follmer et al., 2001, 2004b). Briefly, seed meal (100 g) was extracted with buffer A (20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 1 mM EDTA, and 2 mM 2-mercaptoethanol) for 1 h at 4 °C. The meal was removed by centrifugation and 28% (v/v) ice-cold acetone (final concentration) was added to the supernatant. After removing the precipitate, the concentration of acetone in the supernatant was increased to 31.6% (v/v). The new precipitate was discarded, the supernatant was dialyzed against buffer B (20 mM sodium

phosphate, pH 7.5, 1 mM EDTA, and 5 mM 2-mercaptoethanol) and then mixed with 40 mL of Q-Sepharose in buffer B. The urease-enriched fraction was eluted by adding 300 mM NaCl in buffer B. This material was concentrated and gel-filtered on a Superose 6 HR 10/30 column in buffer B. The active peak was dialyzed against 20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.5 M NaCl (buffer C) and submitted to immobilized metal affinity chromatography using 10 mL of Co²⁺ loaded iminodiacetic acid-Sepharose (IDA-Co²⁺), equilibrated in buffer C. This step separates the isoforms of jack bean urease, the major urease being recovered in the non-retained fraction (Follmer et al., 2004b).

The recombinant urease-derived entomotoxic peptide Jaburetox-2Ec, produced and purified as described in Mulinari et al. (2007), was used to immunize rabbits and prepare anti-Jaburetox-2Ec polyclonal antibodies (Tomazzeto et al., 2007).

2.4. Bioassay of urease insecticidal activity

The bioassay was carried out essentially as described in Stanisçuaski et al. (2005). Third instars or adults of *D. peruvianus* were fed on artificial cotton seeds, consisting of gelatin capsules (size 2, Elli Lilly Co.) containing cotton seed flour and 0.01–0.04% (w/w) freeze-dried urease. Survival rates were recorded daily until day 16.

2.5. Gut homogenates

Homogenates of whole intestines of *D. peruvianus* were used for determination of proteolytic activities. For that, non-starved fourth instars or adult males were anaesthetized in ice and the whole intestines were removed and stored at –20 °C in 50% v/v glycerol in water, in a proportion of 20 intestines per milliliter. To prepare the homogenates, the material was thawed, homogenized manually with an ice-cold Potter pestle, centrifuged at 4 °C at 4000g (twice, 10 min each) and then at 12,000g for 5 min. The final supernatants were kept frozen at –20 °C until used. Homogenates of nymphs' guts and adults' guts are referred from now on as NH and AH, respectively.

2.6. Enzymatic assays

For determination of azocaseinolytic activity, the homogenates (2.5 mg protein/mL) were incubated with azocasein (final concentration 0.5%) in sodium acetate 0.05 M, pH 5.6, at 37 °C, in 300 μ L, with or without 1 mM PMSF. After 1 h, 250 μ L of 10% trichloroacetic acid (TCA) was added, followed by centrifugation (5 min, 18,000g). The supernatant (450 μ L) was mixed with 250 μ L of NaOH (2 M) and read at 420 nm. One unit of azocaseinolytic activity was defined as the amount of enzyme releasing 1.0 A₄₂₀ of acid-soluble azopeptides per hour at 37 °C.

Different fluorogenic synthetic substrates were employed to characterize the enzymatic activities in the homogenates. Aliquots of the homogenates were incubated in microplates at 37 °C, with 20 μ M of substrates Abz-AIAFFSRQ-EDDnp or N-Cbz-Phe-Arg-MCA, in 100 μ L final volume. Synthetic substrates corresponding to the N- and C-terminal regions flanking the entomotoxic peptide within urease sequence (Mulinari et al., 2007) were also tested, at 20 μ M final concentration. The substrates were Abz-NAIADGPVQ-EDDnp (equivalent to the N-terminal region) and Abz-KVIRDGMGQ-EDDnp (equivalent to the C-terminal region). The pH was varied using 50 mM citrate-phosphate buffer (pH 2.0–6.0) or Tris-HCl (pH 7.0–9.0). Reactions were monitored for 1 h in an F-Max fluorometer (Molecular Devices Inc.), using 320 nm excitation – 420 nm emission filters for EDDnp substrates and 370 nm excitation – 460 nm emission filters for the MCA substrate. Results are shown as relative fluorescence in milliunits (mRFU) per min per mg of homogenate.

To investigate the classes of the proteinases present in the homogenates, aliquots were pre-incubated 30 min at room temperature with either 10 μ M E-64, 10 μ M pepstatin-A, 1 mM EDTA or 1 mM PMSF, and then tested for proteolytic activity (Barret et al., 1998). Results are shown as percentage of the activity in the absence of the inhibitor.

2.7. In vitro hydrolysis of urease

Digestion of urease with *D. peruvianus* proteinases was performed as described in Ferreira-DaSilva et al. (2000) using a ratio of 0.5 mU azocaseinolytic activity of homogenates per microgram urease, in 5 mM ammonium formate, pH 5.6, at 37 °C, under continuous stirring. The reaction was stopped by freeze-drying the samples.

2.8. Western blot

The hydrolysis of urease was followed by Western blot (Towbin et al., 1979) after SDS-PAGE (Weber and Osborn, 1969) in 10–18% polyacrylamide gels. After being transferred to 0.2 μ m PVDF filters, the membranes were incubated for 2 h with anti-Jaburetox-2Ec antibodies (1:25,000) and then exposed for 2 h to anti-rabbit IgG coupled to alkaline phosphatase (1:30,000). The color reaction was developed with NBT and BCIP in buffer containing $MgCl_2$, pH 9.6.

2.9. Determination of cleavage site by LC–ESI-MS

The synthetic substrates (2 nmol) were incubated with the homogenates (100 μ g protein) at pH 4.0, 37 °C, overnight. The reaction was stopped by sample lyophilization. Digestion analysis was performed on a Q-TOF Micro instrument (Waters Corporation) with a nanoflow electrospray probe, capillary voltage at 3500 V and a cone voltage of 30 V, calibrated in the m/z region 50–2000 using phosphoric acid. A lock spray interface with phosphoric acid was employed, the lock mass data being averaged over 5 scans for correction. Chromatographic separations for LC–MS were performed in a Nano Acquity Ultra Performance LC (Waters Corporation), equipped with columns Symmetry C18 and BEH 130-C18 (Waters Corporation), and a linear gradient of 0–90% acetonitrile in 0.1% formic acid. The mass spectrometric data were collected in a full scan mode from m/z 50 to 1400 in positive mode. Data were processed and analyzed using Mass Lynx software.

2.10. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard deviation. Significance of differences between means was determined using one-way ANOVA. Data were considered statistically different when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Urease insecticidal effect

Fig. 1 shows the insecticidal effect of *C. ensiformis* urease fed to third instar *D. peruvianus* reaching 100% of mortality after 11 days. In contrast, adults survived 14 days ingesting a concentration of urease 4-fold higher. The adult insects, however, were as susceptible to sodium azide as the nymphs. These results are very similar to our previous observation for canatoxin, a minor isoform of urease present in the same seed (Stanišcuaski et al., 2005).

3.2. Enzymatic activity upon azocasein

Azocasein is a nonspecific protease substrate. Both homogenates have azocaseinolytic activity at pH 5.6. This activity is

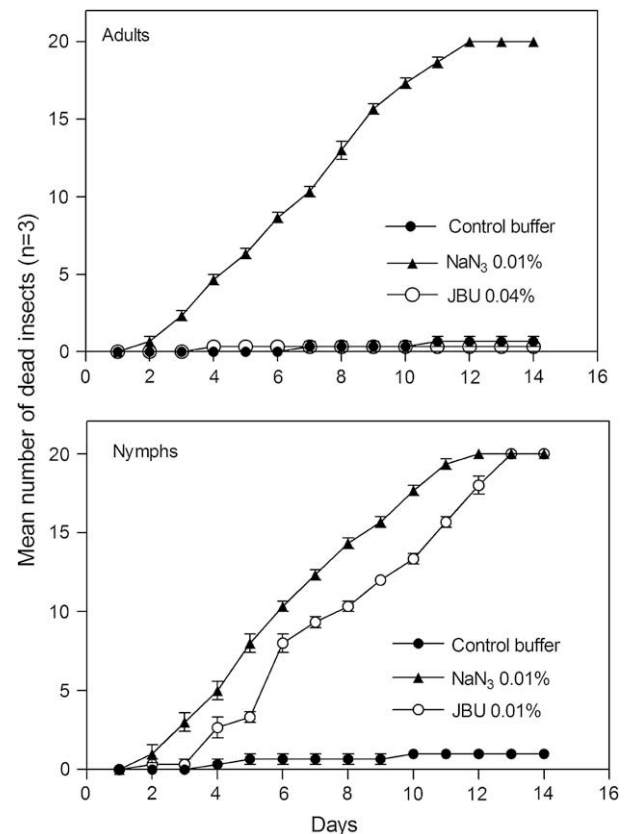


Fig. 1. Insecticidal effect of urease on *Dysdercus peruvianus*. Adults (upper panel) or nymphs (third instar) (lower panel) fed on artificial seeds containing urease, buffer alone (controls) or 0.01% w/v sodium azide. Surviving insects were counted daily up to 16 days. Results are expressed as mean and standard deviations of triplicated points ($N = 20$ per point).

strongly inhibited by PMSF (a serine protease inhibitor) in adult's homogenate (AH) (~65% inhibition). In contrast, no inhibition by PMSF of nymph's homogenate (NH) activity was observed (Fig. 2).

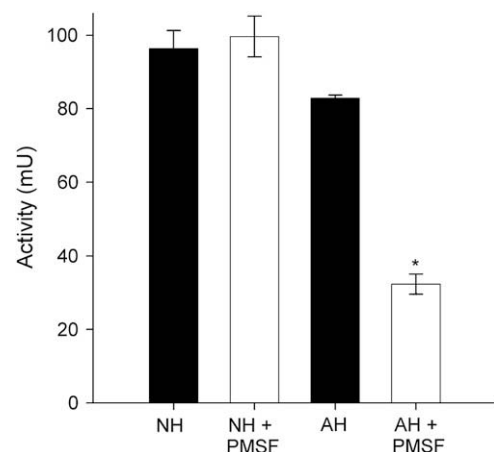


Fig. 2. Hydrolysis of azocasein by NH and AH and effect of PMSF. The homogenates (2.5 mg protein/mL) were incubated with 0.5% w/v azocasein at 37 °C, pH 5.6. For the PMSF treatment, homogenates were pre-incubated with the inhibitor (1 mM) for 30 min before the addition of the substrate. The release of soluble azopeptides derived from azocasein was quantified colorimetrically. Activity is expressed as mU (described in Section 2). Values are means and standard deviation ($N = 4$). * Indicates a statistically significant difference between the control and the PMSF treatment ($p < 0.05$).

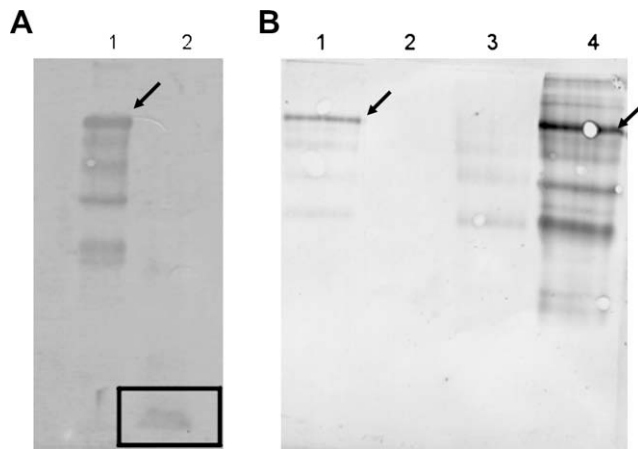


Fig. 3. Western blot of urease in vitro hydrolysis developed with anti-jaburetox antibodies. (A) Urease hydrolysis by NH. Lane 1: urease incubated at 37 °C, pH 5.6 in the absence of NH; lane 2: urease incubated at 37 °C, pH 5.6 in the presence of NH. (B) Urease hydrolysis by AH. Lane 1: urease incubated at 37 °C, pH 5.6 in the absence of AH; lane 2: AH; lane 3: urease incubated at 37 °C, pH 5.6 in the presence of AH. Lane 4: urease incubated at 37 °C, pH 5.6 in the presence of AH and PMSF (1 mM). The arrows indicate intact urease. The square highlights the ~10 kDa fragment recognized by anti-jaburetox antibodies.

3.3. In vitro hydrolysis of urease

Because the release of the entomotoxic peptide could be due to the concerted or sequential action of more than one enzyme, we decided to analyze homogenates of whole midguts. The fragmentation patterns of urease produced by NH and AH were clearly distinct. After 24 h of incubation at 37 °C, pH 5.6, urease was extensively hydrolyzed by NH, and formed a ~10 kDa fragment, recognized by anti-Jaburetox-2Ec antibodies (Fig. 3A). By size and antigenicity criteria this peptide is equivalent to the entomotoxic peptide characterized by Ferreira-DaSilva et al. (2000). Under the same reactions conditions, AH also hydrolyzed urease, but no 10 kDa fragment recognizable by anti-Jaburetox-2Ec antibodies was formed (Fig. 3B, lane 3). When the hydrolysis was performed in the presence of PMSF (1 mM), the fragmentation of urease by AH was reduced (Fig. 3B, lane 4), but no inhibition was observed in hydrolysis produced by NH (data not shown).

3.4. Enzymatic activity upon synthetic substrates

Four synthetic substrates were used to characterize the proteinases present in the homogenates (data summarized in

Table 1). Abz-AIAFFSRQ-EDDnp was developed for cathepsin-D like aspartic proteinases (Sorgine et al., 2000). Both homogenates have similar activity upon this substrate, but each with a different pH optimum. For NH (Fig. 4, left panels), the optimal pH was 3.0, while AH (Fig. 4, right panels) showed maximal activity at pH 5.0. The activity of NH was completely inhibited by pepstatin-A between pH 2.0 and 6.0 (Fig. 4B). On the other hand, inhibition of AH activity by pepstatin-A was less significant, with a residual activity of 36% at pH 5.0 (Fig. 4F). Although both adult and nymph digestive tracts have aspartic proteinases, the differential susceptibility to inhibitors and the different pH optima suggest that different members of this proteinase family are present according to insect stage. EDTA was also effective in inhibiting AH activity upon this substrate, mainly at pH 6.0 (Fig. 4H), but no inhibition was observed for NH (Fig. 4D).

N-Cbz-Phe-Arg-MCA is a substrate suitable for the cysteine proteases cathepsins B and L (Sorgine et al., 2000; Renard et al., 2000). NH showed two distinct peaks of activity with this substrate (Fig. 5, left panels), one at pH 4.0 and a second at pH 6.0. AH activity was relatively equally distributed over pH 3.0–6.0 (Fig. 5, right panels). The activity of NH upon this substrate was about 2.5-fold higher than AH at pH 4.0 and 2-fold at pH 6.0 (Table 1). E-64 completely abolished the proteolytic activity of both homogenates in the pH 3.0–4.0 range, inhibiting to a lower extent the activity at pH 5.0–7.0 (Fig. 5C and F). Again, the data suggest the presence of different members of the cysteine protease family according to stage of *D. peruvianus*.

We assayed NH and AH protease action on synthetic substrates that correspond to the N- and C-terminal regions flanking the entomotoxic peptide within urease to gain further insights into gut processing of urease. NH has a higher activity upon the substrate Abz-NAIADGVPVQ-EDDnp (equivalent to the N-terminal region), with an optimal pH at 4.0. For AH, the pH optimum is 3.0 (Fig. 6A). While AH activity upon this substrate is inhibited by E-64 (Fig. 6B), the activity of NH is not (Fig. 6E). Pepstatin-A failed to inhibit either AH or NH activities (Fig. 6C and F), while EDTA was a strong inhibitor of both (Fig. 6D and G).

Both homogenates showed similar activities upon the C-terminal substrate, Abz-KVIRDGMGQ-EDDnp, with optimal pH at 4.0–4.5 (Fig. 7A). As observed for the N-terminal substrate, inhibition by E-64 was higher for AH than NH activity (Fig. 7E and B). At pH 4.0, E-64 inhibited about 50% of NH activity and almost 100% AH activity. Pepstatin-A had no effect (Fig. 7C and F) on either of the gut homogenates. Contrasting with the results with the N-terminal substrate, NH and AH activities were not significantly inhibited by EDTA (Fig. 7D and G).

Table 1

Major proteolytic activities of midgut homogenates of nymphs (third instars) or adult *Dysdercus peruvianus*.

Substrate	Nymph's midgut homogenates			Adult's midgut homogenates		
	Optimal pH	mU/min/mg or $A_{280}/3 \text{ h/mg}^a$	Inhibitor(s) ^b	Optimal pH	mU/min/mg or $A_{280}/3 \text{ h/mg}^a$	Inhibitor(s) ^b
Azocasein, pH 5.6	n.d.	95.0	Not inhibited by PMSF	n.d.	82.0	PMSF
Hemoglobin**	3.5	0.26	E-64, EDTA, pepstatin-A	5.0	0.20	Pepstatin-A
				8.5	0.11	PMSF
Abz-AIAFFSRQ-EDDnp (substrate designed for cathepsin-D)	3.0	820	Pepstatin-A	3.0	400	No inhibition
				5.0	800	PMSF, EDTA, Pepstatin-A
N-Cbz-Phe-Arg-MCA (substrate designed for cathepsin-B)	4.0	3700	E-64	3–5	1600	E-64
	6.0	2100	E-64			
Abz-NAIADGVPVQ-EDDnp (N-terminal flanking sequence)	4.5	22,000	EDTA	3.0	9000	E-64, EDTA
Abz-KVIRDGMGQ-EDDnp (C-terminal flanking sequence)	4.5	25,000	E-64	4.0	30,000	E-64

n.d. – Not determined.

^a Hemoglobinolytic activity was measured as $A_{280}/3 \text{ h/mg}$ (** data taken from Stanisçuaski et al. (2005)).

^b Inhibition greater than 40–50%. Inhibitors tested were 10 μM pepstatin-A, 10 μM E-64, 1 mM PMSF and 1 mM EDTA.

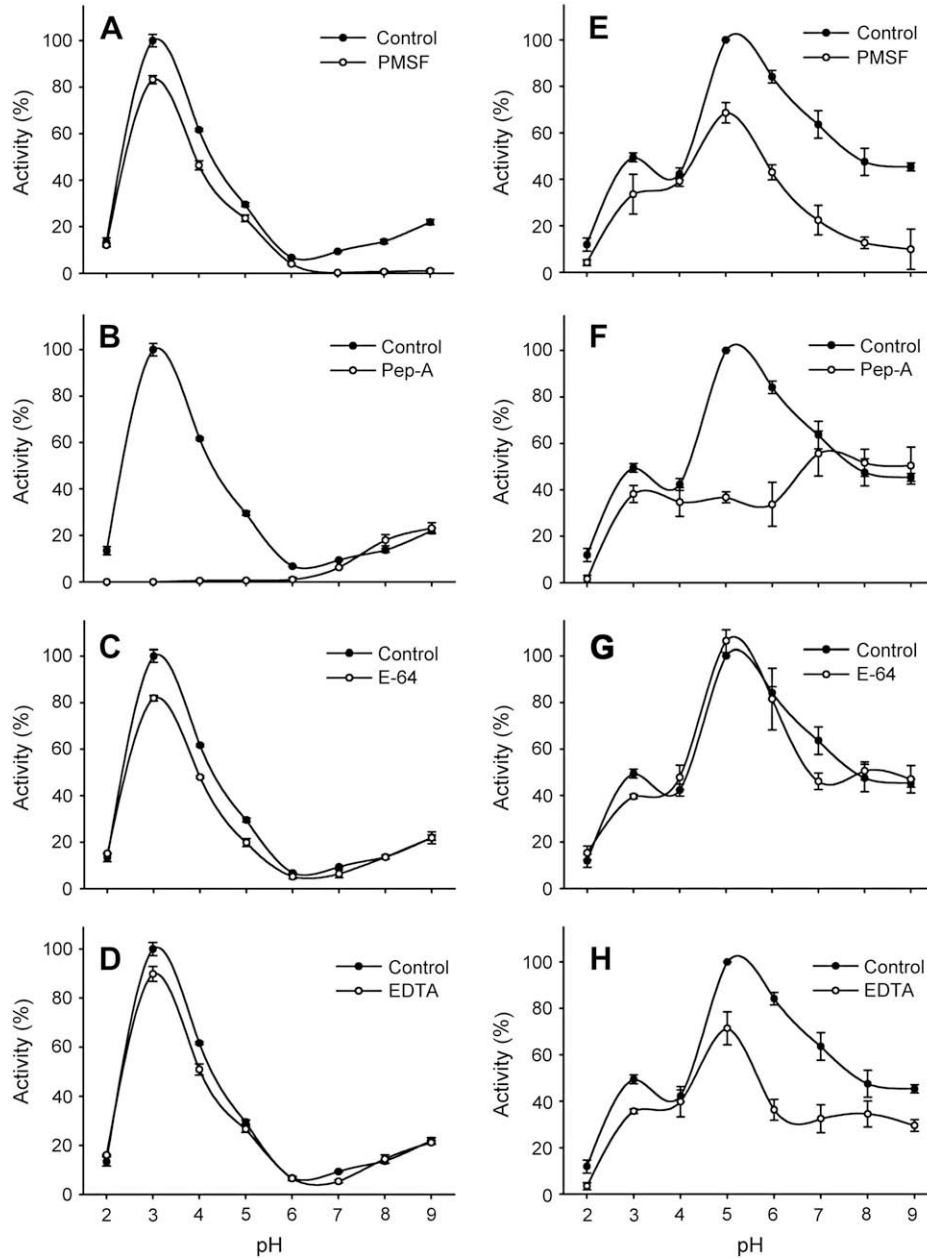


Fig. 4. Effect of inhibitors on Abz-AIAFFSRQ-EDDnp hydrolysis by NH (A–D) and AH (E–H). Final concentration of the substrate was 20 μ M. Activity was assayed at 37 $^{\circ}$ C for 1 h in the presence of 1 mM PMSF (A, E), 10 μ M pepstatin-A (B, F), 10 μ M E-64 (C, G) or 1 mM EDTA (D, H). Results are expressed as mean and standard deviation ($N = 4$).

3.5. Determination of cleavage site by LC-ESI-MS

The cleavage site(s) of Abz-NAIADGPVQ-EDDnp and Abz-KVIRDGMGQ-EDDnp by the homogenates were determined by LC-ESI-MS (Table 2). For the hydrolysis of the N-terminal substrate Abz-NAIADGPVQ-EDDnp at pH 4.0 by either of the homogenates, the fragment DGPVQ-EDDnp (m/z 723,302) was the most abundant. The fragment GPVQ-EDDnp was also present, but less abundant. These results indicate that both homogenates preferentially cleave between Ala and Asp residues in this substrate, but they are also effective in cleaving the bond between Asp and Gly residues. When the hydrolysis was performed at pH 5.6, which resembles the condition of the midgut of *D. peruvianus*, the preferred cleavage site in Abz-NAIADGPVQ-EDDnp was Asp–Gly for both homogenates (data not shown). In the case of the hydrolysis of the C-terminal substrate Abz-KVIRDGMGQ-EDDnp by the homogenates at pH 4.0,

the most abundant fragment was DGMGQ-EDDnp (m/z 317,703), indicating that AH and NH preferentially cleave between Arg and Asp residues. For the hydrolysis with AH, a second fragment, Abz-KVIRD (m/z 374,204), was observed with a lower intensity. This indicates that AH, but not NH, also cleaves the peptide bond between Asp and Gly residues in this substrate. At pH 5.6, most of Abz-KVIRDGMGQ-EDDnp was cleaved between the Ile and Arg residues by both homogenates (data not shown).

4. Discussion

The primary aim of this work was to investigate the major digestive proteolytic activities of nymphs and adults of *D. peruvianus* and to establish a possible relation between these activities and the stage-dependent resistance to toxic effects of ingested ureases. Because the release of the entomotoxic peptide could be

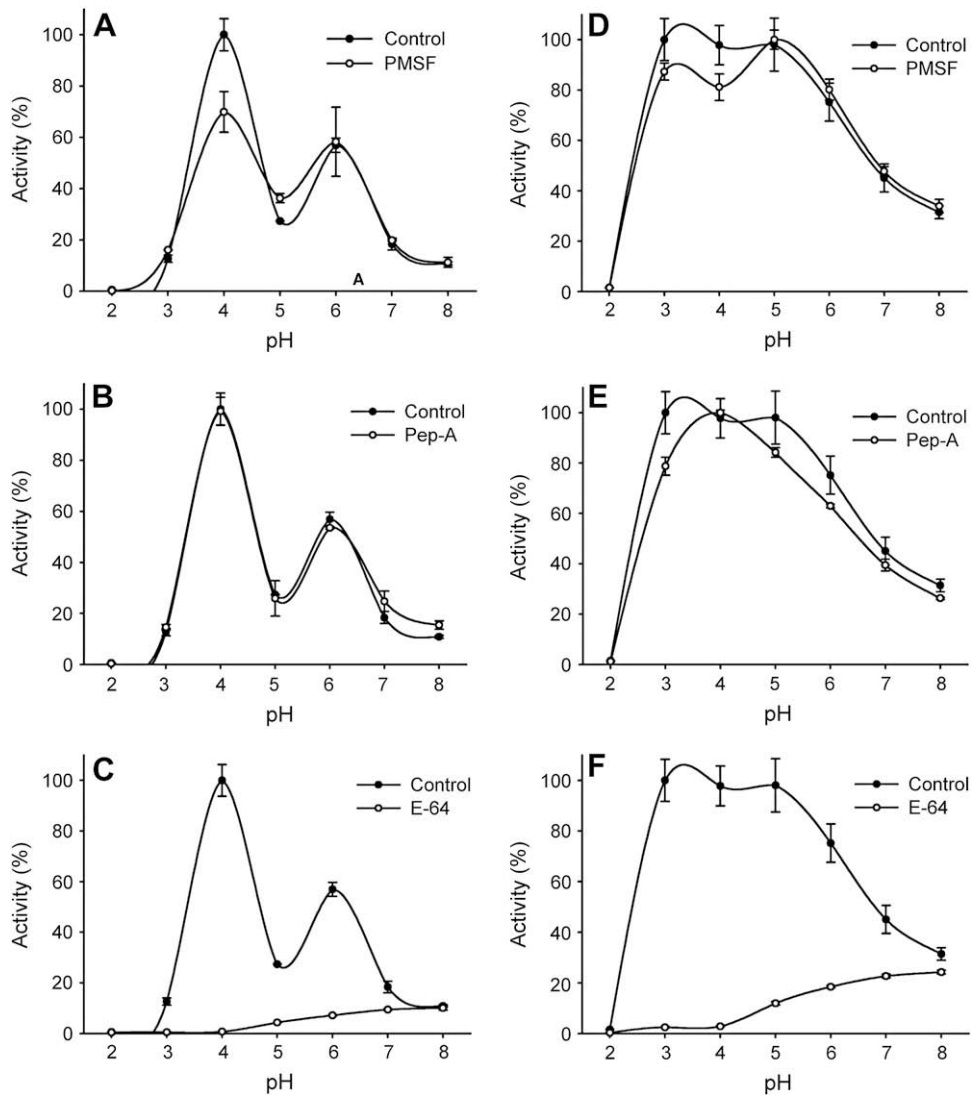


Fig. 5. Effect of inhibitors on N-Cbz-Phe-Arg-MCA hydrolysis by NH (A–C) and AH (D–F). Final concentration of the substrate was 20 μM. Activity was assayed at 37 °C for 1 h in the presence of 1 mM PMSF (A, D), 10 μM pepstatin-A (B, E) or 1 mM EDTA (C, F). Results are expressed as mean and standard deviation ($N = 4$).

due to the concerted or sequential action of more than one enzyme, we decided to work with homogenates of whole midguts.

Ferreira-DaSilva et al. (2000) confirmed the proteolytic activation of canatoxin by enzymes from *Callosobruchus maculatus* larvae, and the release of a toxic peptide of 10 kDa. Here, we showed that *C. ensiformis* major urease is hydrolyzed by *D. peruvianus* NH and AH, but only NH is able to release a ~10 kDa peptide, recognized by anti-Jaburetox-2Ec antibodies. Although we cannot exclude at this point differences regarding midgut permeability, receptor(s), transport across the membranes of epithelial cells, or signal-transduction, this finding strongly suggests that adults of *D. peruvianus* are resistant to urease toxic effects due to differences in the proteolytic processing of the protein. Differences in the response to toxins during the life cycle of insects have been reported. Increased resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin in the late larval stages of *Spodoptera littoralis* as compared to young larvae was attributed to different enzymatic processing of the toxin (Keller et al., 1996).

Silva and Terra (1994) described digestive enzymes, absorptive sites and internal pH along the midgut, divided into three sections (V1–V3), of female adults *D. peruvianus*. They showed a luminal pH variation from 6.2 to 5.6 and that a soluble cysteine proteinase with a pH 5.5 optimum and produced in the V2 region was the most important proteolytic enzyme. However, this type of information is

not available for young forms of any hemipteran. It is reasonable to expect that more acidic microenvironments probably exist in which the enzymes we described here (particularly in nymphs) would approach their maximal activities.

Comparing the enzyme activities in homogenates of fed and starved *D. peruvianus*, Silva and Terra (1994) concluded that cotton meal contributes with an aminopeptidase activity found in the midgut contents. It is not known if symbionts present in hemipteran midgut contribute to the repertoire of enzymes found (Terra and Ferreira, 1994; Silva and Terra, 1994). Since in the present study we used non-starved insects, both stages fed on the same lot of cotton seeds, the differences we found in the repertoire of proteolytic enzymes are likely to be stage-specific. Thus, although there is no change in the feeding habits of young forms and adult *D. peruvianus*, our data point to important differences in the digestive physiology of the insect during its life cycle.

We showed that NH azocaseinolytic activity was not affected by the serine protease inhibitor PMSF, while AH activity was reduced almost 70% (Fig. 2), confirming similar observations in a previous study (Stanisçuaski et al., 2005). More interestingly, urease hydrolysis by AH is inhibited by PMSF, while NH is still able to fully degrade urease in the presence of this inhibitor (data not shown). The data indicate the presence of serine proteinases in adults, but

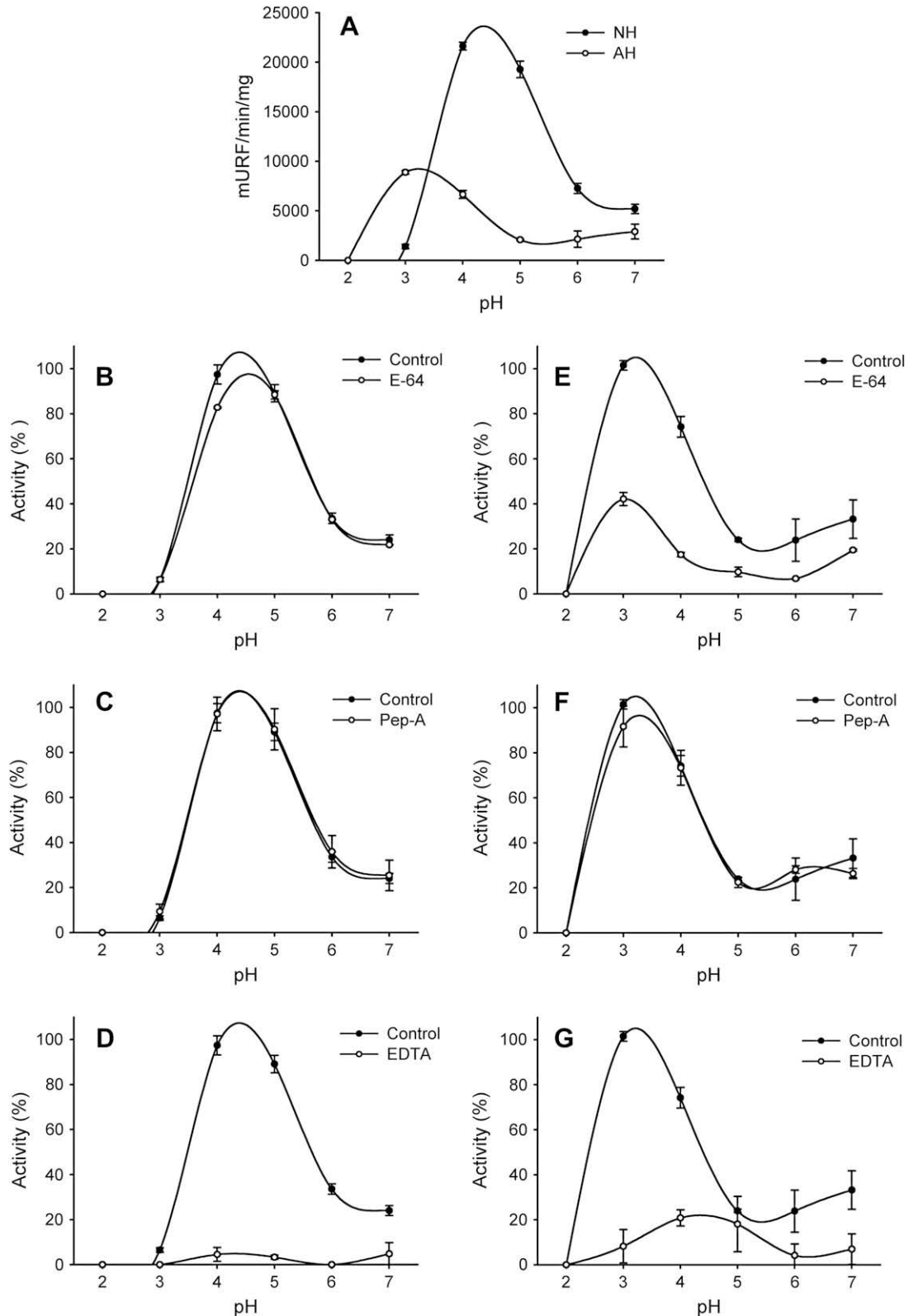


Fig. 6. Effect of pH and inhibitors on the hydrolysis of Abz-NAIADGPVQ-EDDnp (final concentration 20 μ M) by NH and AH. Activity was assayed at 37 $^{\circ}$ C for 1 h in the absence (A) or presence of 10 μ M E-64 (B, E), 10 μ M pepstatin-A (C, F) or 1 mM EDTA (D, G). Results are expressed as specific activity (A) or mean \pm s.d. (B–G) ($N = 4$).

not in nymphs, of *D. peruvianus*. Hemipteran insects are said to rely on cathepsin-like digestive enzymes (Terra and Ferreira, 1994; Cristofaletti et al., 2003). To our knowledge, there are no published reports on the identification of serine trypsin-like digestive enzymes in any hemipteran insect. One alternative explanation

would be that PMSF is nonspecifically inhibiting cysteine proteases (Whitaker and Perez-Villasenor, 1968).

Midgut homogenates of both insect stages were able to cleave several substrates in acidic media up to pH 6.0. The activities upon N-Cbz-Phe-Arg-MCA and Abz-AIAFFSRQ-EDDnp indicate the

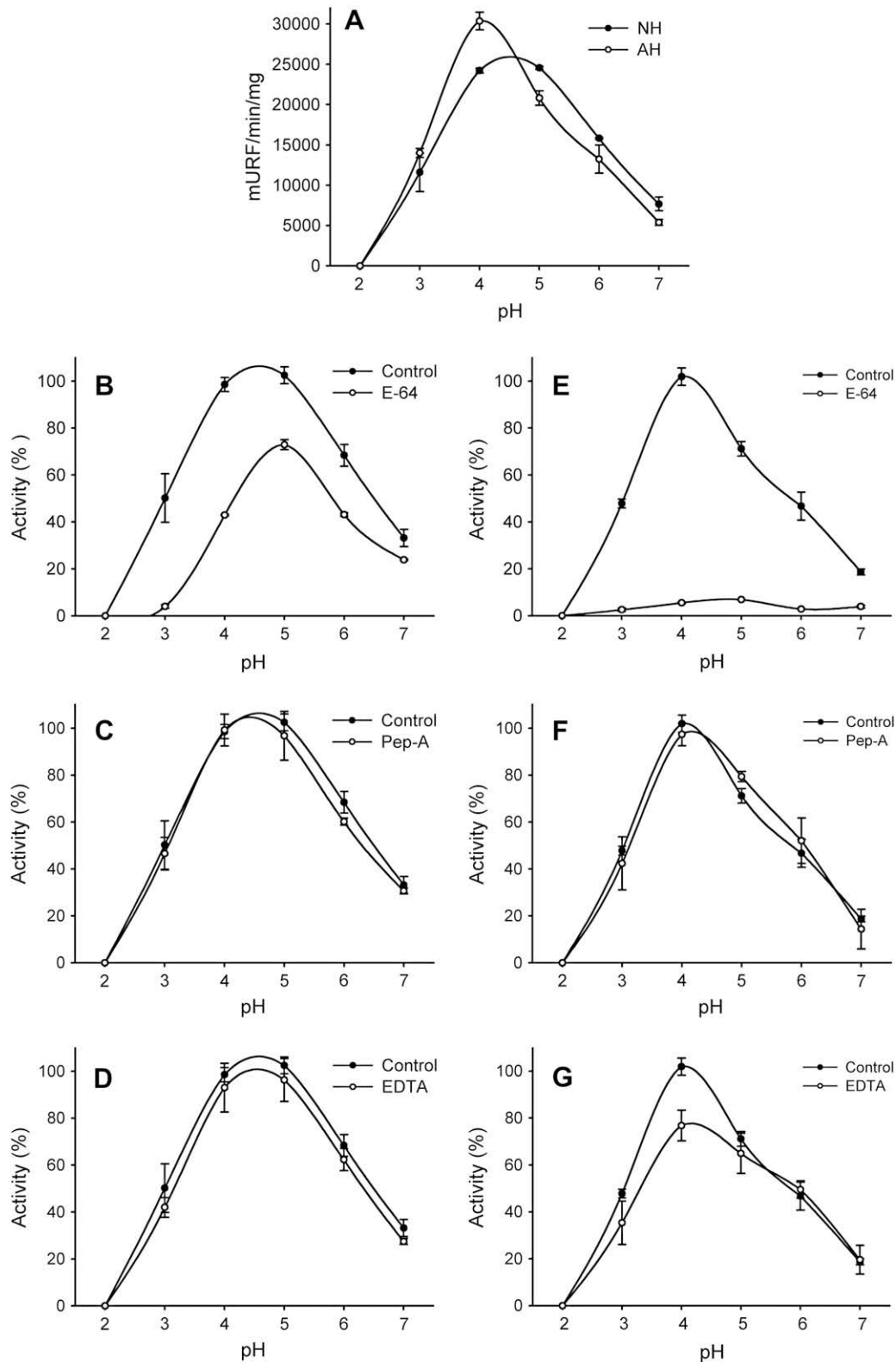


Fig. 7. Effect of pH and inhibitors on the hydrolysis of Abz-KVIRDGMGQ-EDDnp (final concentration 20 μ M) by NH and AH. Activity was assayed at 37 °C for 1 h in the absence (A) or presence of 10 μ M E-64 (B, E), 10 μ M pepstatin-A (C, F) or 1 mM EDTA (D, G). Results are expressed as specific activity (A) or mean \pm s.d. (B–G) ($N = 4$).

presence of cysteine and aspartic proteinases in both homogenates. NH activity upon Abz-AIAFFSRQ-EDDnp was completely inhibited by pepstatin-A (Fig. 4B), while AH was still partially active in the presence of pepstatin-A (Fig. 4F). The data suggest the presence of a different isoform of aspartic proteinase in adults, less sensitive to

pepstatin-A, or alternatively, adults have another proteinase able to cleave this substrate, not susceptible to the inhibitor. Inhibition by E-64 of the cleavage of N-Cbz-Phe-Arg-MCA indicated the presence of cysteine proteinases in both AH and NH (Fig. 5), the activities differing in their pH optima and specific activities.

Table 2

Determination by LC–ESI–MS of cleavage sites of substrates by homogenates at pH 4.0.

Sequence	Mass (predicted)	Mass (observed)	
		Cleaved by AH	Cleaved by NH
<i>N-terminal</i>			
Abz-NAIADGPVQ-EDDnp	506,247	506,246	506,246
Abz-NAIADGPVQ-EDDnp	722,295	722,294 ^a	722,295 ^a
Abz-NAIADGPVQ-EDDnp	621,277	621,280	621,281
Abz-NAIADGPVQ-EDDnp	607,275	607,271	607,267
<i>C-terminal</i>			
Abz-KVIRDGMGQ-EDDnp	633,397	633,383 ^a	633,391 ^a
Abz-KVIRDGMGQ-EDDnp	714,235	714,238	n.o.
Abz-KVIRDGMGQ-EDDnp	748,417	748,409	n.o.
Abz-KVIRDGMGQ-EDDnp	599,215	n.o.	n.o.

The fragments observed are shown in bold. n.o. – not observed.

^a The fragments that were more abundant in the spectrum.

Important differences were observed between NH and AH regarding their activity upon the substrates representing the regions flanking the entomotoxic peptide within the intact urease. We have previously shown that *in vitro* hydrolysis of canatoxin by cathepsins from *C. maculatus* larvae produced a family of entomotoxic peptides, the largest of which, pepcanatox, was the most toxic, the smaller ones probably representing further cleavage of the latter (Ferreira-DaSilva et al., 2000). The N-terminal sequence of pepcanatox was determined by Edman sequencing to be GPVQ- and based on its molecular mass its C-terminal was deduced to be –KVIRD (Mulinari et al., 2007). Here we observed that both homogenates cleaved the N-terminal substrate, and that this hydrolysis is not catalyzed by pepstatin-A-sensitive enzymes. Only AH was inhibited by E-64 when assayed with this substrate. Since EDTA was the only effective inhibitor of the hydrolysis of the N-terminal substrate catalyzed by NH, we suggest that a metalloprotease active at pH 4.0–5.0 is probably involved in the limited proteolysis of urease that releases the entomotoxic peptide in young forms of *D. peruvianus*. The LC–ESI–MS data (Table 2) indicated that both AH and NH at pH 4.0, in which all the activities studied are at or near to their maximal levels, cleave the substrate Abz-NAIADGPVQ-EDDnp preferentially between the residues Ala and Asp. Metalloproteases, as the peptidyl-Asp metallopeptidase, hydrolyzes bonds at the N-terminal side of aspartic acid (Drapeau, 1980; Hagmann, 2004), reinforcing our hypothesis that an enzyme of this class releases the N-terminal side of the entomotoxic peptide from within urease.

The cleavage of C-terminal substrate Abz-KVIRDGMGQ-EDDnp by AH and NH at pH 4.0 occurred between the residues Arg and Asp. The activity of both homogenates upon this substrate was inhibited significantly only by E-64, indicating the participation of cysteine proteinases. Cleavage of RD bonds is described for human cathepsin L (Dahl et al., 2001) and also for trypsin-1 (Nemoto et al., 1997). The data on azocasein hydrolysis suggested that adults have trypsin-like enzymes, while PMSF-sensitive enzymes were not found in nymphs. Diaz-Mendoza et al. (2005) reported that E-64 nonspecifically inhibited trypsin-1 enzymes from insects. The more pronounced effect of E-64 on AH activity upon the C-terminal substrate could thus represent the inhibition of cysteine proteinases plus nonspecific inhibition of trypsin-like enzymes. This may be an important difference in the limited proteolysis of urease by the two stages of *D. peruvianus*. Within the entomotoxic peptide sequence (Mulinari et al., 2007) there are 11 potential cleavage sites for trypsin. If adults in fact have a trypsin-like enzyme(s), it is possible that the entomotoxic peptide is released from urease, but then degraded into smaller, not toxic, fragments. Another fact that supports the hypothesis that the entomotoxic peptide is degraded is that Jaburetox-2Ec is not toxic to *D. peruvianus* adults when administered orally (Stanisçuaski et al., 2005).

A second cleavage site, between Asp and Gly, was observed for both homogenates with Abz-NAIADGPVQ-EDDnp and for AH with Abz-KVIRDGMGQ-EDDnp. When the hydrolysis was performed at pH 5.6, Asp–Gly was the only cleavage site identified in Abz-NAIADGPVQ-EDDnp (data not show). The hydrolytic activities upon these substrates at pH 5.0–6.0 are comparatively very low (Figs. 6A and 7A). Asp–Gly is not a consensus cleavage site for cathepsins either from the aspartic or cysteine protease families. The Peptidase Databank MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) provides literature showing that the bond between Asp–Gly can be cleaved by cysteine proteases such as caspases (Hawkins et al., 2000), metalloproteases as falcilysin (Eggleston et al., 1999), serine proteases as dipeptidase E (Miller, 2004) and also by aspartyl-peptidases (Wilk, 2004). Brinkworth et al. (2001) have shown that cathepsin-D from blood-feeding parasites has unusual cleavage sites, when compared to mammalian cathepsin-D. These differences in substrate cleavage preference reflected subtle but significant differences in the enzyme binding pockets. It is possible that, in the course of evolution, insects had some of their enzymes adapted to their feeding habits and hence diverged their substrates preferences from the expected.

Although we cannot exclude that a single enzyme in *D. peruvianus* nymphs is responsible for the limited proteolysis that releases the entomotoxic peptide from urease, our data indicate that more than one class of enzyme in their midguts is able to hydrolyze the synthetic peptides containing the potential cleavage points, particularly at the C-terminal portion of the peptide. Indeed, in a previous study (Carlini et al., 1997) we demonstrated that simultaneous administration of E-64 or pepstatin-A and canatoxin to third instars *Rhodnius prolixus* significantly reduced the lethality rate, suggesting that both cysteine and aspartic proteinases are involved in the proteolytic activation of the protein. Another important point concerning these results is that the whole native urease is actually not the only substrate to be considered as a partially cleaved protein could be a better substrate for the enzyme(s) releasing the internal entomotoxic peptide.

Table 1 summarizes our data showing the presence of multiple, stage-specific proteinases in the digestive system of *D. peruvianus*. Purification and physicochemical characterization of some of the enzymatic activities detected in this work will be dealt with elsewhere. Insect digestive proteolytic activity is dynamic and depends on the interactions among tissue type, pH, proteinase class and phase of life cycle (Wright et al., 2006). Such complexity could be directly involved in the processing and inactivation of toxic defense proteins produced by plants (Peumans and Van Damme, 1995). The difference in susceptibility to ureases of adults and nymphs of *D. peruvianus* is probably a complex event, with the contribution of multiple factors. Here we have demonstrated that stage-specific differences in the release of the entomotoxic peptide from the intact protein might contribute to the resistance of adult *D. peruvianus* to urease entomotoxic effects. The data also emphasize the need for adequate understanding of insect physiology when considering the potential biotechnological use of insecticidal proteins in protecting crops against insect pests.

Acknowledgments

The authors are thankful to Antonio Polleti from Núcleo de Produção de Sementes de Aguai, SP, Brazil, for the cotton seeds supply, to Roseli Garcia, for maintaining the insect colony, and to Dr. Joseph C. Polacco, Univ. Missouri, Columbia, for critical reading of the manuscript. This project was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul).

References

- Barret, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F., 1998. Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press, San Diego, 1666 pp.
- Brinkworth, R.L., Provic, P., Loukas, A., Brindley, P.J., 2001. Hemoglobin-degrading, aspartic proteases of blood-feeding parasites. *J. Biol. Chem.* 276, 38844–38851.
- Carlini, C.R., Guimarães, J.A., 1981. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon* 19, 667–676.
- Carlini, C.R., Oliveira, A.E., Azambuja, P., Xavier-Filho, J., Wells, M.A., 1997. Biological effects of canatoxin in different insect models. Evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *J. Econ. Entomol.* 90, 340–348.
- Cristofaletti, P.T., Ribeiro, A.F., Deraison, C., Rahbé, Y., Terra, W.R., 2003. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* 49, 11–24.
- Dahl, S.W., Halkier, T., Lauritzen, C., Dolenc, I., Pedersen, J., Turk, V., Turk, B., 2001. Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry* 40, 1671–1678.
- Díaz-Mendoza, M., Ortego, F., García de Lacoba, M., Magana, C., de la Poza, M., Farinos, G.P., Castanera, P., Hernandez-Crespo, P., 2005. Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 1005–1020.
- Drapeau, G.R., 1980. Substrate specificity of a proteolytic enzyme isolated from a mutant of *Pseudomonas fragi*. *J. Biol. Chem.* 255, 839–840.
- Eggleston, K.K., Duffin, K.L., Goldberg, D.E., 1999. Identification and characterization of falcylisin, a metalloproteinase involved in hemoglobin catabolism within the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 274, 32411–32417.
- Ferreira-DaSilva, C.T., Gombarovits, M.E., Masuda, H., Oliveira, C.M., Carlini, C.R., 2000. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44, 162–171.
- Follmer, C., 2008. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry* 69, 18–28.
- Follmer, C., Barcellos, G.B.S., Zingali, R.B., Machado, O.L.T., Alves, E.W., Barja-Fidalgo, C., Guimarães, J.A., Carlini, C.R., 2001. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant from of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem. J.* 360, 217–224.
- Follmer, C., Real-Guerra, R., Wassermann, G.E., Olivera-Severo, D., Carlini, C.R., 2004a. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur. J. Biochem.* 271, 1357–1363.
- Follmer, C., Wassermann, G., Carlini, C.R., 2004b. Separation of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Sci.* 167, 241–246.
- Gallo, D., 1988. Manual de Entomologia Agrícola, second ed. CERES, São Paulo, 649 pp.
- Hagmann, M.L., 2004. Peptidyl-Asp Metalloendopeptidase. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, second ed. Elsevier, London, pp. 1037–1039.
- Hawkins, C.J., Yoo, S.J., Peterson, E.P., Wang, S.L., Vernooy, S.Y., Hay, B.A., 2000. The *Drosophila* caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM. *J. Biol. Chem.* 275, 27084–27093.
- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., Schell, J., Zilberstein, A., 1996. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 365–373.
- MEROPS, <http://merops.sanger.ac.uk/>.
- Miller, C.G., 2004. Dipeptidase E. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, second ed. Elsevier, London, pp. 2033–2035.
- Mobley, H.L., Island, M.D., Hausinger, R.P., 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59, 451–480.
- Mulinari, F., Freitas-Silva, M.A., Grossi-De-Sa, M.F., Moraes, M.G., Kurtenbach, E., Carlini, C.R., 2004. Toxina Praguicida, Construção Gênica e Método de Controle de Pragas. Patent registered at National Institute for Intellectual Property (INPI). Brazil; 08/04/2004 [protocol BRPI0403435A].
- Mulinari, F., Stanisçuaski, F., Bertholdo-Vargas, L.R., Postal, M., Oliveira-Neto, O.B., Ridgen, D.J., Grossi-de-Sá, M.F., Carlini, C.R., 2007. Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides* 28, 2042–2050.
- Nemoto, T., Sato, N., Iwanari, H., Yamashita, H., Takagii, T., 1997. Domain structures and immunogenic regions of the 90-kDa heat-shock protein (HSP90). *J. Biol. Chem.* 272, 26179–26187.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J., 1995. Lectin as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109, 347–352.
- Polacco, J.C., Holland, M.A., 1993. Roles of urease in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 145, 65–103.
- Renard, G., Garcia, J.F., Cardoso, F.C., Richter, M.F., Sakanari, J.A., Ozaki, L.S., Termignoni, C., Masuda, A., 2000. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 1017–1026.
- Silva, C.P., Terra, W.R., 1994. Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 493–505.
- Silva, C.P., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 1996. Enzyme markers and isolation of the microvillar and perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 1011–1018.
- Sirko, A., Brodzik, R., 2000. Plant ureases: role and regulation. *Acta Biochim. Pol.* 47, 1189–1195.
- Sorgine, M.H., Logullo, C., Zingali, R.B., Paiva-Silva, G.O., Juliano, L., Oliveira, P.L., 2000. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 275, 28659–28665.
- Stanisçuaski, F., Ferreira-Dasilva, C.T., Mulinari, F., Pires-Alves, M., Carlini, C.R., 2005. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45, 753–760.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109, 1–62.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Jordão, B.P., Dillon, R.J., 1996. Digestive Enzymes. In: Biology of the Insect Midgut. Chapman & Hall, London, pp. 153–194.
- Tomazzeto, G., Mulinari, F., Stanisçuaski, F., Settembrini, B.P., Carlini, C.R., Ayub, M.A.Z., 2007. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 821–827.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350–4354.
- Weber, K., Osborn, M., 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406–4412.
- Whitaker, J.R., Perez-Villasenor, J., 1968. Chemical modification of papain. 1. Reaction with the chloromethyl ketones of phenylalanine and lysine and with phenylmethylsulphonyl fluoride. *Arch. Biochem. Biophys.* 124, 70–78.
- Wilhite, S.E., Elden, T.C., Brzin, J., Smigocki, A.C., 2000. Inhibition of cysteine and aspartyl proteinases in the alfalfa weevil midgut with biochemical and plant-derived proteinase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 1181–1188.
- Wilk, S., 2004. Beta-aspartyl peptidase. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, second ed. Elsevier, London, pp. 2115–2116.
- Wright, M.K., Brandt, S.L., Coudron, T.A., Wagner, R.M., Habibi, J., Backus, E.A., Huesing, J.E., 2006. Characterization of digestive proteolytic activity in *Lygus hesperus* knight (Hemiptera: Miridae). *J. Insect Physiol.* 52, 717–728.

CAPÍTULO II

Eletrofisiologia: estudo sobre os canais iônicos formados por
JBU e Jaburetox-2Ec

I. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se a urease de *Canavalia ensiformis* e o peptídeo tóxico recombinante Jaburetox-2Ec interagem com membranas lipídicas formando canais iônicos ou poros através da bicamada lipídica. Para isso, utilizar a técnica de eletrofisiologia PLB para visualizar a atividade dos canais formados pelas duas moléculas. A partir das análises, quantificar a corrente iônica que flui pelos canais e determinar suas condutâncias. Ainda, se possível, determinar a seletividade iônica dos canais, ou seja, verificar se o canal tem capacidade de discriminar íons K^+ ou Cl^- .

II. MATERIAIS E MÉTODOS

a. Reagentes e JBU

Os fosfolipídeos foram adquiridos de Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL. JBU foi obtida de uma preparação comercialmente disponível (SIGMA-ALDRICH) e usada em todos os experimentos sem purificação adicional. A proteína liofilizada foi ressuspensa em tampão NaPB 20 mM contendo 1 mM de EDTA e 5 mM de β -mercaptoethanol, pH 7,5. A solução protéica foi usada em uma concentração de 1 mg/mL determinada por A_{280} .

b. Jaburetox-2Ec

O peptídeo recombinante foi purificado de acordo com Mulinari, 2007. Brevemente, 250 mL de meio LB contendo 100 mg/ml de ampicilina foram inoculados com 5 mL de cultura de *Escherichia coli* carregando o plasmídeo recombinante pET 101/Jaburetox-2Ec. As células foram crescidas por 2 horas a 37°C sob agitação constante até atingir $OD_{600}=0,7$ e então 1 mM de IPTG foi adicionado. Após duas horas as células foram extraídas por centrifugação e ressuspensas em 10 mL de tampão de lise (50 mM NaPB, pH 7,0, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% (v/v) glycerol, 0,5% (v/v) Triton X-100 e 10 mM de imidazol), sonicadas e centrifugadas (10.000 X g por 20 minutos). O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de afinidade de Níquel (Ni-NTA-

QIAGEN), previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio (50 mM NaPB pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol). Após 30 minutos, a coluna foi lavada com 20 mL do mesmo tampão contendo 20 mM de imidazol. A proteína foi eluída com o tampão de equilíbrio contendo 200 mM de imidazol e quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As amostras foram dializadas contra tampão NaPB 20 mM contendo 1 mM de EDTA e 5 mM de β -mercaptoethanol, pH 7,5.

c. Ensaio de Membrana PLB

Membranas lipídicas planares (Müller *et al.*, 1963) foram formadas a partir de uma mistura lipídica composta de fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e colesterol (Ch) na proporção de 7:2:1 respectivamente, similar a composição lipídica de células de inseto, conforme Schwartz *et al.*, 1993. Os lipídios foram preparados em clorofórmio e vigorosamente agitados para bem homogeneizar. Após, decano (solvente não polar) foi adicionado para uma concentração final lipídica de 25 mg/ml.



Fig. 13. Imagens do sistema da técnica de PLB (A e B) e o modelo (C) para construção das câmaras onde os experimentos são realizados. A câmara com os compartimentos *cis* e *trans* é feita de PVC (cloreto de polivinila), e a cubeta onde a abertura é localizada é feita de poliacetal.

Os compartimentos aquosos *cis* e *trans* são preenchidos com tampão contendo 500 mM de KCl, 1 mM de CaCl_2 e 10 mM de HEPES, pH 7,5. Antes de montar o sistema, o orifício de 250 μm da cubeta feita de resina poliacetal foi pré-tratado com a mesma mistura lipídica, o que significa cobrir as paredes internas do orifício com uma camada da mistura lipídica, para posteriormente a membrana poder se fixar. Após o pré-tratamento, a cubeta foi submetida a um leve jato de nitrogênio para secar a camada lipídica formada em volta do orifício. Estando as cubetas já imersas no tampão do experimento, a bicamada lipídica foi “pincelada” através do orifício usando uma fino bastão de vidro de ponta arredondada mergulhado previamente na solução lipídica. A pequena gota lipídica formada na extremidade deste bastão foi então espalhada no orifício (Fig. 14).

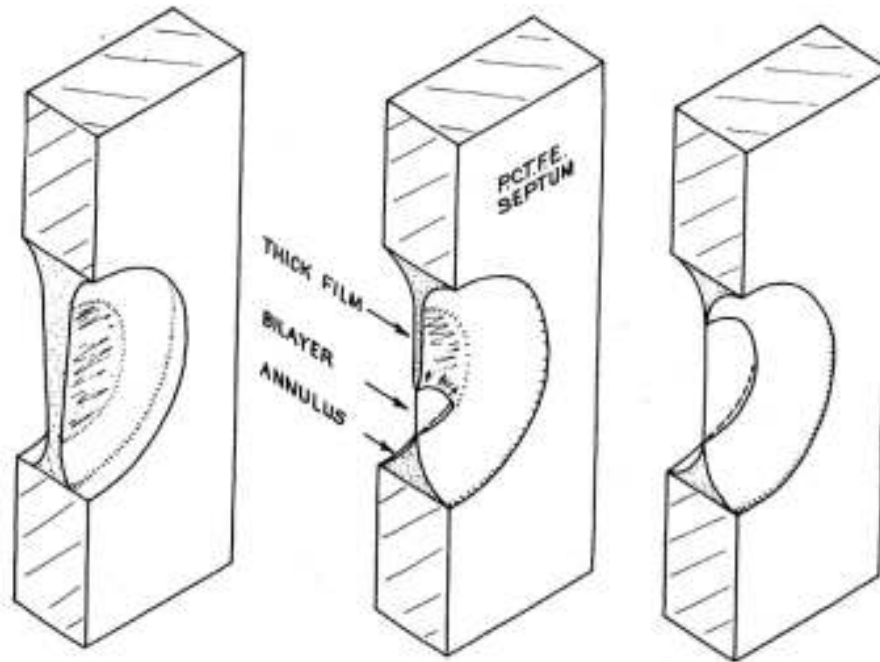


Fig. 14. Formação da bicamada lipídica na abertura de 250 μm. No primeiro momento tem-se uma multicamada (multilayer) que em poucos segundos é estendida em uma bicamada (bilayer). A bicamada é mantida pelo “annulus”, uma estrutura com massa lipídica milhares de vezes maior que a bicamada constituída de micelas lipídicas. Fonte: Miller, 1986.

A membrana funciona como um capacitor, pois é um ótimo isolante elétrico e acumula cargas, sendo que a capacitância de uma membrana é proporcional a suas dimensões. A espessura da membrana foi testada aplicando o teste de capacitância, medida em farad (F).

$$C = \epsilon_r \epsilon_0 \frac{A}{d}$$

Onde C=capacitância; A=área em metros quadrados; d=distância que separa as duas placas do capacitor (em membranas biológicas, seria a espessura da membrana fosfolipídica); ϵ_r = constante dielétrica do material entre

as “placas”, para o vácuo $\epsilon_r=1$; ϵ_0 é a permissividade do vácuo, $\epsilon_0= 8.854 \times 10^{-12}$ F/m.

Valores de capacitância típicos ficaram entre 100 e 200 pF, onde a espessura da membrana é inversamente proporcional ao valor de capacitância, ou seja, quanto maior o valor de capacitância, mais fina era a espessura da membrana. A incorporação da toxina foi realizada adicionando alíquotas da proteína (2,5 - 10 μ g) ao volume de 1 mL da câmara *cis* após a formação da bicamada. Após a inserção da proteína foi possível observar o comportamento do canal. A atividade do canal foi monitorada por mudanças em forma de degraus no registro de corrente iônica durante a aplicação de voltagem através da PLB. Todos os experimentos foram executados a temperatura ambiente (20-22°C).

Para verificar a capacidade da JBU em discriminar espécies iônicas, experimentos de seletividade iônica foram realizados com a JBU já inserida na membrana e apresentando atividade de canal. Então, foi aplicado voltagem zero no sistema e criado um gradiente eletroquímico entre os dois compartimentos através da adição de uma solução concentrada de KCl de forma a estabelecer o gradiente 800:500 mM de KCl (*cis:trans*) que gerará uma mudança na linha de base de corrente iônica. Esta mudança nos informará a espécie iônica que flui pelo canal.

III. RESULTADOS

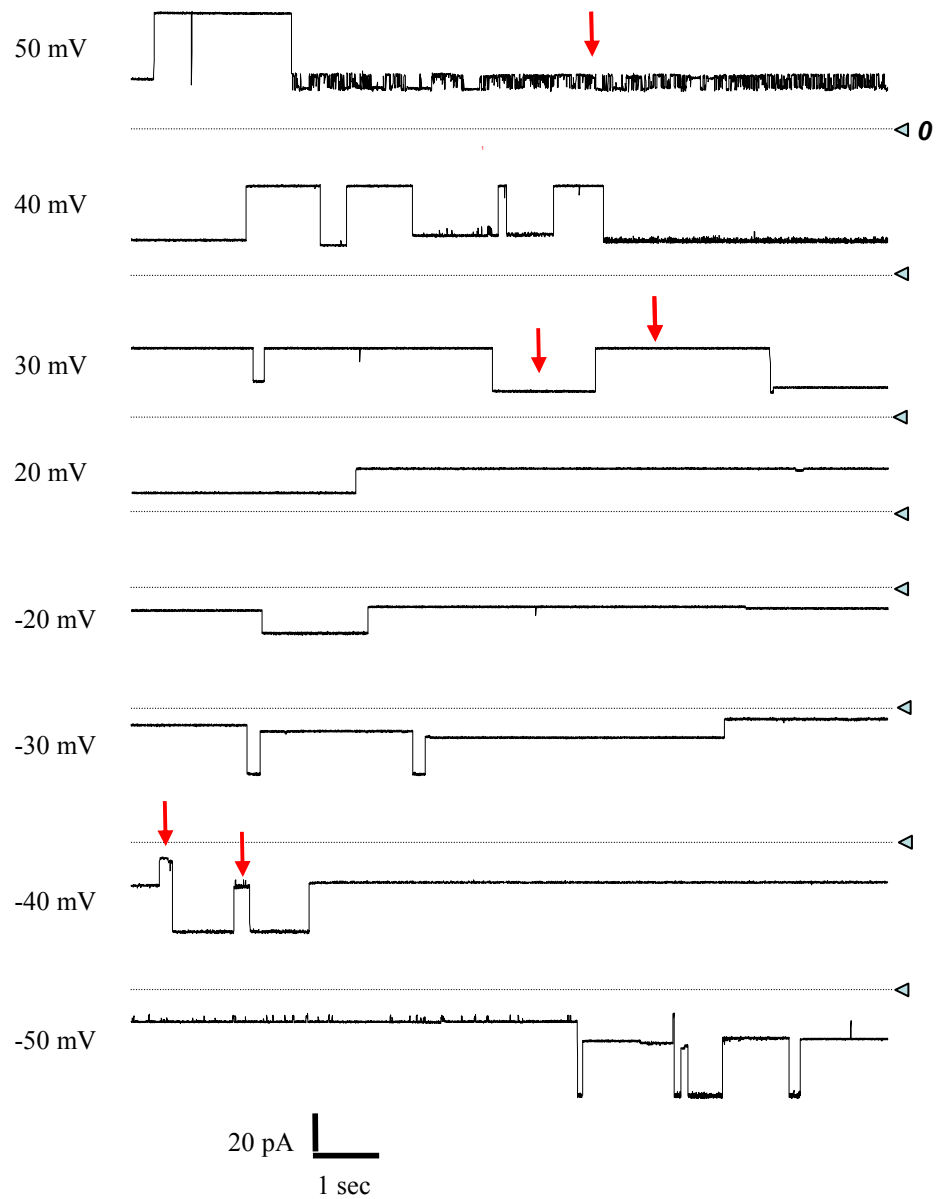
Todos os resultados a seguir foram obtidos durante o intercâmbio pelo programa GSEP (Graduate Student's Exchange Program) oferecido pelo governo canadense, na Université de Montréal, sob orientação do Prof. Dr. Jean-Louis Schwartz.

a. Atividade de canal em PLB na presença de JBU

Atividade de canal pela JBU foi observada quando 10 nM de proteína (5µg/mL) foi adicionada no compartimento *cis*. O tempo de inserção da proteína na membrana artificial variou entre os experimentos, desde poucos minutos até horas. Quando 2,5 µg/mL de proteína foram utilizados nunca foi observado atividade de canal enquanto que utilizando 10 µg/mL de proteína foi observada saturação do sinal de corrente iônica, provavelmente pela grande quantidade de unidades protéicas inseridas na membrana e consequente ruptura da membrana.

O comportamento observado pelos canais formados pela JBU foi complexo (Fig. 15). Diversos níveis de condutância e cinética podem ser visualizados (setas da fig. 15) e uma voltagem dependência também parece ocorrer, pois em altas voltagens (+50 e -50 mV) a atividade do canal, representada pela quantidade de

eventos de abertura e fechamento, aumenta em relação ao número de eventos observados nas voltagens -20 e +20 mV.



**JBU 5 $\mu\text{g/ml}$, 500 mM KCl, 10 mM Hepes pH 7.5
1 mM CaCl_2 , 10 mM B-ME**

Fig. 15. Traçados mostrando a atividade dos canais formados pela JBU (10 nM) sob condições simétricas de 500 mM de KCl, pH 7,5. Setas indicam as diferenças de condutância e diferenças cinéticas. A linha de base de corrente iônica está representada por 0.

O gráfico que correlaciona voltagem aplicada X corrente observada nos mostra diferentes níveis de condutância resultantes dos canais formados pela JBU (Fig. 16). As linhas retas são obtidas através da regressão linear dos valores plotados no gráfico. Cada valor pode significar o número de canais abertos ou alternativamente, conformações diferentes que causam mais que um nível de condutância.

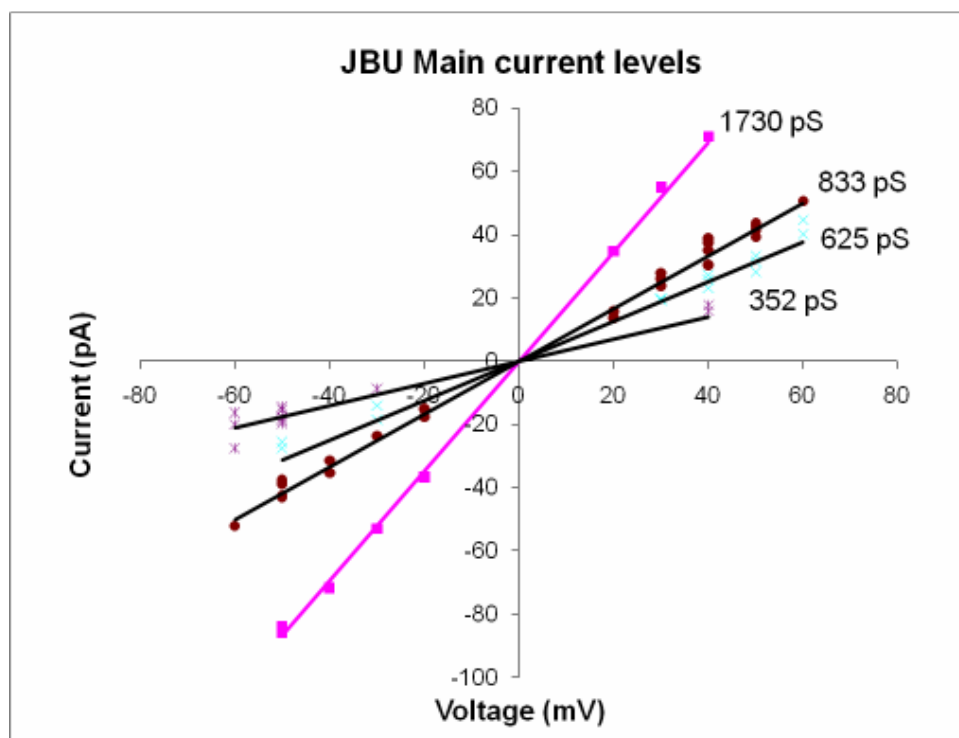


Fig. 16. Curva I/V da atividade de canal de JBU sob diferentes voltagens em condições experimentais simétricas de 500 mM de KCl em cada compartimento, pH 7,5. Os símbolos *, ■, x e ● representam os pontos obtidos a partir da relação de corrente e voltagem.

b. Seletividade iônica dos canais formados pela JBU

Nos experimentos de seletividade iônica constatou-se que a JBU tem seletividade para íons cloreto. Esta característica do canal é determinada através do gradiente eletroquímico gerado enquanto a voltagem no sistema é zero. Por definição, quando a mudança na linha de base da corrente iônica é negativa, diz-se que ânions, neste caso, íons cloreto estão fluindo através do canal. Este resultado pode ser visto na figura 17, quando uma mudança de aproximadamente -5 mV é observada.

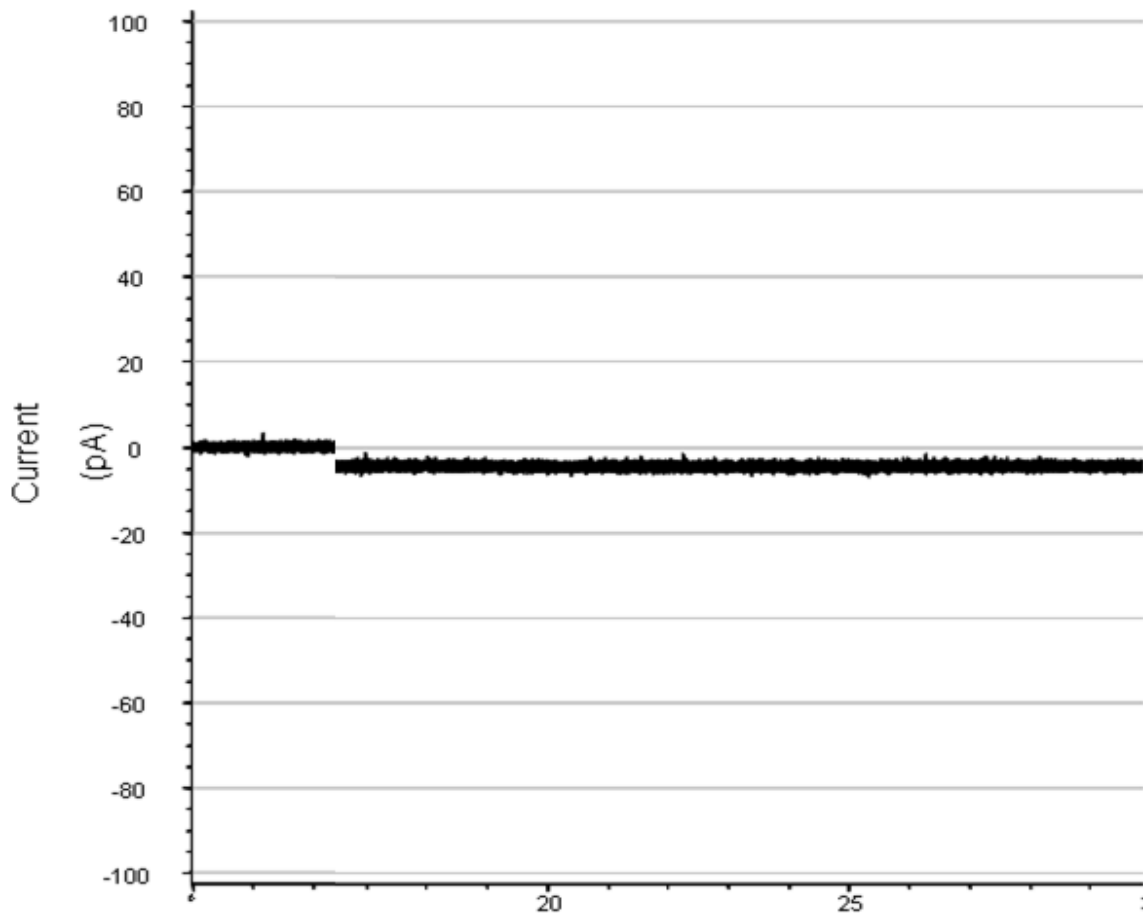


Fig. 17. Experimento de seletividade iônica. A mudança negativa na linha de base foi observada no momento da adição da solução concentrada de KCl, indicando que os canais formados pela JBU têm seletividade para ânions.

A partir da determinação da seletividade iônica é possível também definir o potencial reverso (também conhecido como Potencial de Nernst), que para membranas biológicas é o potencial de membrana em que não há fluxo líquido de íons de um lado da membrana para o outro. Essa característica do canal ainda deve ser determinada para o completo entendimento dos canais formados pela JBU.

Em um sistema iônico único, o potencial reverso é sinônimo de potencial de equilíbrio, pois seus valores numéricos são idênticos. Os dois termos se referem a distintos aspectos da diferença no potencial de membrana. *Equilíbrio* se refere ao fato que o fluxo líquido de íons numa voltagem específica é zero. Ou seja, as taxas de saída e entrada de movimento iônico são as mesmas. *Reverso* se refere ao fato de que uma mudança no potencial de membrana de qualquer lado do potencial de equilíbrio reverte completamente a direção do fluxo iônico.

c. Atividade de canal em PLB na presença de Jaburetox-2Ec

Assim como JBU, o peptídeo tóxico recombinante Jaburetox-2Ec também foi testado em PLB e como resultado prévio, também apresentou atividade de canal. Foi utilizada uma concentração de 5 µg/mL (~ 50 nM). O comportamento do canal pode ser observado na figura 18.

Em decorrência do curto tempo, outras análises não foram possíveis de realizar, como por exemplo a determinação da seletividade iônica dos canais.

Ainda, devido ao pequeno número de experimentos utilizando Jaburetox-2Ec, o gráfico I/V não pôde ser gerado, pois exige uma quantidade grande de dados.

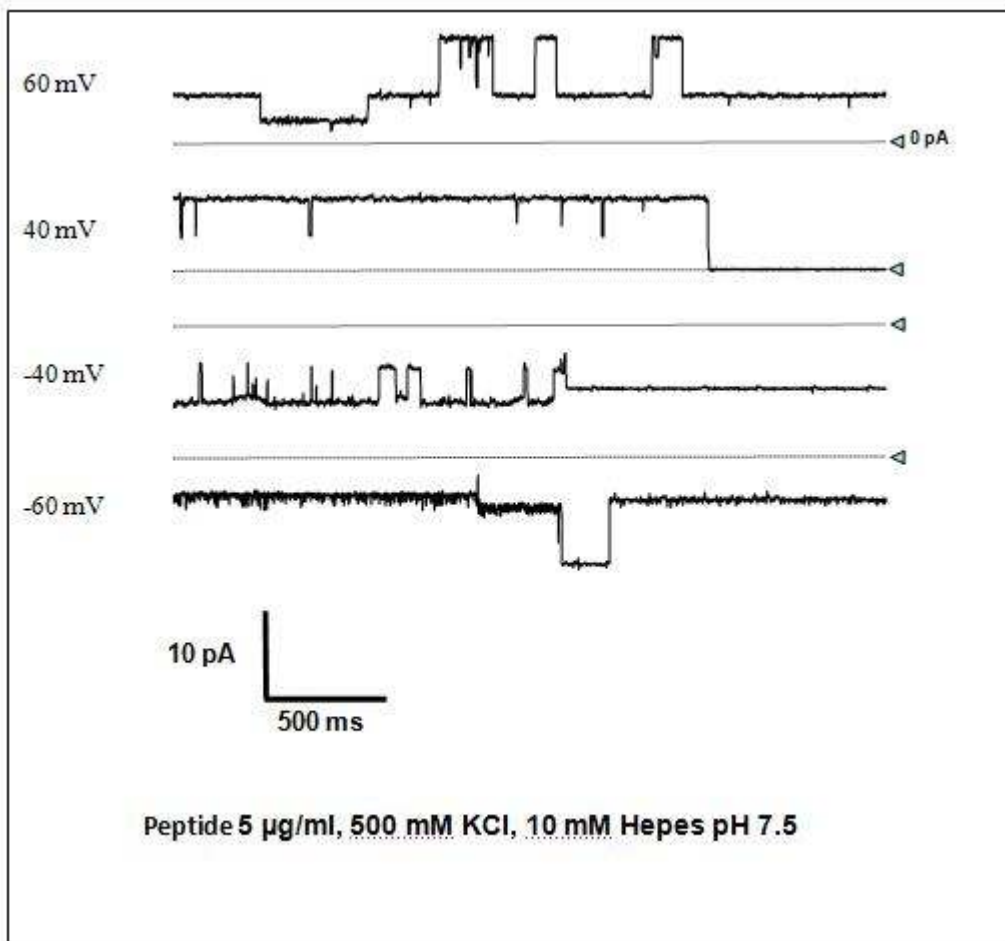


Fig. 18. Traçados de corrente elétrica correspondentes aos canais formados pelo peptídeo Jaburetox-2Ec medidos sob diferentes voltagens em condições simétricas de 500 mM de KCl, pH 7,5.

1. DISCUSSÃO GERAL

O mecanismo de ação de ureases ainda não está completamente elucidado. Para canatoxina (CNTX), uma isoforma minoritária de urease das sementes de *C. ensiformis*, o efeito inseticida depende da ativação proteolítica por enzimas digestivas do intestino do inseto sensível (Carlini *et al.*, 1997), liberando um peptídeo tóxico de aproximadamente 10 kDa.

No primeiro capítulo desta dissertação mostramos que existe uma diferença importante nas enzimas digestivas de ninfas e adultos de *D. peruvianus* que contrasta com a semelhança morfológica que os estágios do inseto apresentam. *D. peruvianus* pertence a ordem Hemiptera cujo desenvolvimento se dá por paurometabolia, onde as ninfas são semelhantes aos adultos porém não têm asas e seus órgãos genitais são imaturos. Ao contrário de *D. peruvianus*, não foi observada uma diferença na atividade de proteases entre ninfas e adultos do hemíptero *Creontiades dilutes* (Hemiptera: Miridae), no entanto, cisteíno e serino proteases também estão presentes no intestino do inseto (Colebatch *et al.*, 2001). Da mesma forma que adultos de *D. peruvianus* o hemíptero *Lygus Hesperus* (Hemiptera: Miridae) também têm atividade de aspártico proteases com atividade ótima em pH 5,0 (Wright *et al.*, 2006).

Existe um paralelismo entre as toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) e as ureases vegetais pois assim como a proteína Cry, JBU também precisa ser

ativada proteoliticamente para ser tóxica aos insetos-alvo. O mecanismo de ação da urease de *C. ensiformis* envolve a hidrólise por enzimas digestivas ácidas do tipo catepsinas liberando um peptídeo tóxico de ~ 10 kDa no intestino dos insetos, por exemplo, *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera). Insetos não suscetíveis têm sua digestão baseada em enzimas alcalinas, do tipo tripsinas. As proteínas Cry, em contrapartida precisam ser hidrolisadas por enzimas alcalinas do tipo tripsina para a protoxina se tornar ativa.

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria de solo gram-positiva que forma cristais durante a fase estacionária de seu crescimento. Estes cristais são predominantemente compostos de uma ou mais proteína (toxinas Cry e Cyt, ou δ -endotoxinas) e são especificamente tóxicos para certas ordens e espécies de insetos, como Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. Durante a esporulação, uma inclusão citoplasmática é sintetizada contendo as proteínas que são tóxicas para a larva do inseto. Ao finalizar a esporulação a bactéria parental sofre lise para liberar o esporo e a inclusão. Nestas inclusões a toxina existe como protoxina inativa. Quando as inclusões são ingeridas pelas larvas dos insetos, o pH alcalino solubiliza o cristal e então a protoxina é convertida em uma toxina ativa após o processamento pelas proteases do hospedeiro presentes no intestino. (Schnepf *et al.*, 1998)

Tem sido reportado que a toxina ativa se liga a receptores inseto-específicos expostos na superfície da membrana plasmática das células epiteliais do intestino e então se insere na membrana para criar poros

transmembranas que causam o aumento de volume citoplasmático levando à lise celular e conseqüentemente a morte do inseto. (Schnepf *et al.*, 1998)

Devido à alta especificidade para estes receptores exclusivos sobre a membrana das células epiteliais do intestino, estas toxinas (delta-toxinas) não são danosas a insetos não-alvos. As toxinas Cry têm três domínios que são, do N para o C terminal: a) *Domínio I*: grupo de sete hélices; b) *Domínio II*: tripla folha beta anti-paralela; c) *Domínio III*: sanduíche de folha-beta.

Com base nos experimentos de eletrofisiologia, observamos que JBU forma canais com várias condutâncias, de 352 pS até 1730 pS diferindo da toxina Cry1C, que induz atividade de canal com 15 valores de condutância diferentes, variando de 21 até 246 pS (Peyronnet *et al.*, 2002). A presença de diferentes condutâncias na atividade de canal de JBU deve ser cuidadosamente interpretada. Considerando que ureases de plantas são trímeros ou hexâmeros com subunidade de 90 kDa e que a forma hexamérica são dois trímeros interagindo de maneira frontal (Carter *et al.*, 2009) é possível que devido a essas diferentes conformações que JBU pode apresentar, existam diferentes canais sendo formados e que, por conseqüência, apresentam níveis de condutância diferentes.

Outro fenômeno que pode explicar as diferentes condutâncias observadas, é o fato de que o contato com membranas lipídicas pode ativar alguma mudança conformacional da proteína, como já observado em outras toxinas, como por exemplo a toxina Cyt de *Bacillus thuringiensis* (Li *et al.*, 2001),

que sofre mudança conformacional de grande escala quando interage diretamente com fosfolipídeos, para então se inserir na membrana. Este possível comportamento poderia favorecer JBU a se inserir em membranas lipídicas com diferentes configurações, alterando sua habilidade em conduzir correntes maiores ou menores. Ainda, JBU poderia se agregar formando oligômeros que favoreceriam sua inserção em membranas, como já foi observado em diversas PFT (pore-forming toxin) bacterianas (Cabiaux *et al.*, 1997). PFTs, por característica, podem existir no estado estável solúvel em água ou como poro integral de membrana. De forma a se converter do estado solúvel ao estado de membrana, a toxina sofre amplas mudanças conformacionais. Na maioria dos casos, PFTs são ativadas pelas proteases dos hospedeiros após ligação a receptores que induz a formação de uma estrutura oligomérica que é competente à inserção. Finalmente, a inserção da membrana é acionada, em muitos casos, por uma diminuição do pH que induz o estado agregado das proteínas (Parker & Feil, 2005). O trabalho de Rausell, (2004) demonstrou que a inserção da estrutura oligomérica pré-poro de Cry1Ab não é afetada pelo pH, entretanto, em pH neutro a alcalino o domínio I se torna mais flexível e isto está relacionado a uma formação de poro mais ativa.

Existem duas famílias de toxinas formadoras de poro, separadas pelo tipo de poro que elas podem formar, na qual praticamente todas as toxinas encaixam, mesmo diferindo em suas estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias: alfa-PFTs e beta-PFTs. As toxinas da primeira família, usam a região de α -hélice para se inserir na membrana, como atoxina diftérica, colicinas,

exotoxina A e as proteínas Cry. As toxinas da segunda família se inserem na membrana formando um β -barril composto de grampos de folhas β , como a aerolisina, α -hemolisina e as toxinas Cyt (Parker and Feil, 2005).

As ureases apresentam um dobramento típico das amidohidrolases, caracterizado pela presença, no C-terminal, de um barril $(\alpha\beta)_8$ (barril TIM), onde se localiza o sítio ativo com os dois átomos de níquel, seguido por um conjunto de folhas β (Jabri *et al.*, 1995; Nagano *et al.*, 2002), ambos formando o domínio α . O domínio β apresenta predominantemente estruturas β , enquanto o domínio γ é formado por estruturas $\alpha\beta$ (Jabri *et al.*, 1995)

JBU mostrou ter capacidade em discriminar espécies iônicas, pois teve seletividade preferencial para íons cloreto, diferindo das toxinas de *B. thuringiensis* Cyt e Cry, que têm seletividade para cátions (Grochulski, 1995 e Butko, 2003). Algumas toxinas vegetais formadoras de canal também possuem seletividade para cátion, como é o caso da toxina β -purotionina, presente em diversos gêneros vegetais, tóxica a fungos, bactérias e até células de mamíferos (Hughes *et al.*, 1999). Assim como JBU, a toxina de *Helicobacter pylori* VacA é uma proteína hexamérica que também forma canais com seletividade para ânions em membrana artificial e tem sua corrente inibida através de bloqueadores de canal de cloreto (Tombola *et al.*, 1999).

2. CONCLUSÕES

Podemos concluir sobre os resultados do capítulo I que existe a presença de múltiplas proteases estágio-específicas no sistema digestório de *D. peruvianus* que respondem a distintos inibidores e possuem atividade ótima em diferentes valores de pH. Tal diferença no perfil enzimático de ninfas e adultos possivelmente contribui para a suscetibilidade diferenciada à ureases, evidenciando que trata-se de um evento complexo.

Os resultados do capítulo II deste trabalho mostram que JBU e o peptídeo recombinante Jaburetox-2Ec são capazes de permeabilizar bicamadas lipídicas planares em experimentos *in vitro*.

A JBU, em concentração de 10 nM, é capaz de se inserir na membrana bilipídica, alterando suas propriedades elétricas, sugerindo a formação de poros que pode resultar na dissipação dos gradientes iônicos essenciais para a manutenção da homeostase das células. A cinética dos canais formados pela JBU é complexa e seus canais são caracterizados por quatro condutâncias principais diferentes, 1730 pS, 833 pS, 625 pS e 352 pS, indicando que a proteína pode interagir com membranas de diferentes maneiras, ora formando um canal maior, ora formando um canal menor. Os canais iônicos formados pela JBU possivelmente apresentam seletividade preferencial para íons cloreto. Jaburetox-2Ec também mostrou ter atividade de canal, conduzindo corrente iônica em membrana lipídica artificial.

3. PERSPECTIVAS

Otimizar as condições experimentais de PLB, utilizando fosfolipídeos carregados, como o fosfatidilserina, para verificar se há interação maior com a JBU. Testar os fosfolipídeos em diferentes concentrações.

Produzir membranas artificiais na presença de gangliosídeos e utilizar bloqueadores específicos para canais de cloreto.

Trabalhar com tampões ajustados em diferentes valores de pH para observar se há alteração na cinética dos canais formados pela JBU e Jaburetox-2Ec, assim como nos níveis de condutância, o que indicaria possivelmente a agregação das estruturas protéicas.

Trabalhar com lipossomas para estudar a interação da JBU com estas membranas e realizar testes com fluoróforos contidos dentro das vesículas para verificar a integridade da membrana lipídica.

Testar a atividade ureásica dos lipossomos ligados a urease para verificar se a forma com que a urease interage com a membrana pode afetar sua atividade.

Realizar estudos de Registro Intracelular primeiramente em células de Sertoli de rato imaturo (protocolo já estabelecido) e após, adaptando o protocolo, com Túbulos de Malphigi de inseto para verificar se há alteração no potencial de membrana das células na presença de JBU e Jaburetox-2Ec; após, comparar os resultados com ureases de outros organismos (*Helicobacter pylori* e *Cryptococcus gattii*).

In vivo, testar o efeito de JBU, peptídeo recombinante e outras ureases em cultura de células de inseto, como Sf21 proveniente de *Spodoptera frugiperda* e UFLAG, de *Anticarsia gemmatalis*.

4. BIBLIOGRAFIA

Barja-Fidalgo C, Guimarães JA, Carlini CR. (1991). Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon*; 29: 453-459.

Barja-Fidalgo C, Guimarães JA, Carlini CR. (1991). Canatoxin, a plant protein, induces insulin release from isolated pancreatic islets. *Endocrinology*; 128: 675-679.

[Barros PR](#), [Stassen H](#), [Freitas MS](#), [Carlini CR](#), [Nascimento MA](#), [Follmer C](#). (2009). Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: Implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases. [Biochim Biophys Acta](#). Sep 12. [Epub ahead of print].

Benjamin CF, Carlini CR, Barja-Fidalgo C. (1992). Pharmacological characterization of rat paw edema induced by canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. *Toxicon*; 30: 879-885.

Borsotto M., Barhanin J., Fosset M., Lazdunski M. (1985): The 1,4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependent Ca^{2+} channel. Purification and subunit composition. *J. Biol. Chem.* 260, 14255-14263

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248– 254.

Butko P. (2003). Cytolytic Toxin Cyt1A and Its Mechanism of Membrane Damage: Data and Hypotheses. *Applied and Environmental Microbiology*; 69, 2415–2422

Cabiaux V, Wolff Ch, Ruyschaert JM. (1997). Interaction with a lipid membrane: a key step in bacterial toxins virulence. *Int J Biol Macromol*;21:285–298.

Carlini CR, Guimarães JA. (1981). Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon*; 19: 667-675.

Carlini CR, Guimarães JA, Ribeiro JM. (1985). Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet poxygenase pathway. *Br J Pharmacol*; 84: 551-560.

Carlini CR, Guimarães JA. (1991). Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon* 1991; 29: 791-806.

Carlini CR, Oliveira AE, Azambuja P, Xavier-Filho J, Wells MA (1997) Biological effects of canatoxin, a plant toxic protein, in different insect models. Evidence for proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. [*Journal of Economical Entomology* 90: 340-348.](#)

Carlini, C.R., Ferreira-Da Silva, C.T., Gombarovits, M.E.C., (2000). Peptídeo Entomotóxico da Canatoxina: Processo de Produção. Patent No. 0003334-0, Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Rio de Janeiro, Brazil.

Carlini CR, Grossi-de-Sa MF. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*; 40: 1515-1539.

Carter, E.L., Flugga, N., Boer, J. L., Mulrooney S.B. and Hausinger, R.P. (2009). Interplay of metal ions and urease. *Metallomics*; 1, 207 - 221

Catterall WA. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 26:13–25

[Colebatch G](#), [East P](#), [Cooper P](#). (2001). Preliminary characterisation of digestive proteases of the green mirid, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae). [Insect Biochem Mol Biol](#). 15;31(4-5):415-23.

Dernick G, Toledo GA, and Lindau M. (2007). The Patch Amperometry Technique: Design of a Method to Study Exocytosis of Single Vesicles. *Electrochemical Methods for Neuroscience*.

Dixon NE, Gazzola TC, Blakeley RL, Zermer B. (1975). Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *J Am Chem Soc*; 97: 4131-4133.

Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, et al. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69-74

Dowhan W and Bogdanoy M. (2009). Lipid-Dependent Membrane Protein Topogenesis. *Annu. Rev. Biochem*; 78:515–40

Eddidin M. (2003). Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature Reviews Mol. Cell Biol*. 4, 414–418.

Fatt P., Katz B. (1953): The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J. Physiol*. 120, 171-204

Ferreira-DaSilva, C.T., Gombarovits, M.E.C., Masuda, H., Oliveira, C.M., Carlini, C.R., (2000). Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 44, 62–71.

Flockerzi V., Oeken H. J., Hofmann F. (1986). Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. *Eur. J. Biochem*. 161, 217-224

Follmer C, Barcellos GB, Zingali RB, Machado OL, Alves EW, Barja- Fidalgo C, et al. (2001). Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem J* ; 360: 217-224.

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

Follmer C. (2007). Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry* 69, 18–28

Frank H Yu and William A Catterall. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* 4 (3): 207.

Ghazi, A. (2003). Electrophysiological methods for the study of ion channels. Atelier 147, 15-17 octobre 2003 / October 15-17, La Grande Motte.

Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, et al. (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 28:365–368.

Grassi-Kassisse DM, Ribeiro-DaSilva G. (1992). Canatoxin triggers histamine secretion from rat peritoneal mast cells. *Agents Actions*; 37: 204-209.

Grochulski P, Masson L, Borisova S, Pusztai-Carey M, Schwartz JL, Brousseau R, Cygler M. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. [J Mol Biol.](#); 254(3):447-64.

Hagiwara S. (1975). Ca-dependent action potential. *Membranes*;3:359-81.

[Hagiwara S](#), [Ozawa S](#), [Sand O](#). (1975). Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. [J Gen Physiol.](#);65(5):617-44.

Hughes P, Dennis E, Whitecross M, Llewellyn Di, and Gage P. (1999). The Cytotoxic Plant Protein, β -Purothionin, Forms Ion Channels in Lipid Membranes; *The Journal of Biological Chemistry*; 275 (2): 823–827

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

Jentsch TJ. (2002). Cell biology: Chloride channels are different. *Nature*; 415, 276-277.

Jentsch TJ. (2008). CLC Chloride Channels and Transporters: From Genes to Protein Structure, Pathology and Physiology. [Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology](#), 43(1), 3-36

João H. Morais-Cabral, Yufeng Zhou & Roderick MacKinnon. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature*, 414, 37-42

Jones, S.W. (1998). Overview of voltage-dependent calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 30, 299-312.

Leung AT., Imagawa T, Block B, Franzini-Armstrong C, Campbell KP. (1988). Biochemical and ultrastructural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor from rabbit skeletal muscle. Evidence for a 52,000 Da subunit. *J. Biol. Chem.* 263, 994-1001.

Li J, Carrol J, Ellar DJ. (1991). Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature.*;353:815–821.

Li J, Derbyshire DJ, Promdonkoy B and Ellar DJ. (2001). Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* *d*-endotoxins from water-soluble to membrane inserted forms. *Biochemical Society Transactions*. Volume 29, part 4

Miller, C. (1986). "Ion Channel Reconstitution".

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

Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev*; 59: 451-480

Mukherjee S and Maxfield FR. (2004). Membrane Domains. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*; 20:839–66

Mulinari F.; Staniscuaski F.; Bertholdo-Vargas LR; Postal M; Oliveira-Neto OB; Riden DJ; Grossi-de-Sa MF; Carlini CR. (2007). Jaburetox-2Ec An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides*. 28:2042-50.

Müller, P., Rudin, D.O., Tein, H.T., Wescott, W.C. (1963). Methods for formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* 67:534-535.

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

Opekarová M, Tanner W. Specific lipid requirements of membrane proteins - a putative bottleneck in heterologous expression.

Parker MW, Feil SC. (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progr Biophys & Mol Biol*; 88:91–142.

Peyronnet, O, Nieman, B, Génèreux, F, Vachon, V, Laprade, R and Schwartz, J-L (2002). Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin in planar lipid bilayers. [Biochimica et Biophysica Acta \(BBA\) - Biomembranes](#), 1567:113-122.

Pietzsch J. (2004). Mind the Membrane.

Ribeiro-DaSilva G, Pires-Barbosa R, Prado JF, Carlini CR. (1989). Convulsions induced by canatoxin in rats are probably a consequence of hypoxia. *Braz J Med Biol Res*; 22: 877-880.

Rausell C, Sánchez J, Muñoz-Garay C, Morera C, Soberón M, Bravo A. (2004). Unfolding events in the watersoluble monomeric Cry1Ab toxin during transition to oligomeric pre-pore and membrane inserted pore channel. *J Biol Chem*; 279:55168–55175.

Riquelme, G. (2009). Placental Chloride Channels: A Review. [Placenta](#). 30(8), 659-669.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62:775-806.

Schwartz J-L, Garneaut L, Savaria D, Massont L, Brousseau R, and Rousseau E. (1993). Lepidopteran-Specific Crystal Toxins from *Bacillus thuringiensis* Form Cation- and Anion-Selective Channels in Planar Lipid Bilayers. *J. Membrane Biol.* 132, 53-62.

[Sheridan](#) L, [Wilmot](#) CM, [Cromie](#) KD, [P. van der Logt](#) and [Phillips](#) SEV. (2002). Crystallization and preliminary X-ray structure determination of jack bean urease with a bound antibody fragment. *Acta Cryst.* D58, 374-376

Sieber M., Nastainczyk W., Zubor V., Wernet W., Hofmann F. (1987): The 165-kDa peptide of the purified skeletal muscle dihydropyridine receptor contains the known regulatory sites of the calcium channel. *Eur. J. Biochem.* 167, 117-122

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

Stanisçuaski F, Ferreira-Dasilva CT, Mulinari F, Pires-Alves M, Carlini CR. (2005). Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon*; 45: 753-760.

Stanisçuaski F, Brugge VT, Carlini CR, Orchard, I. (2009). In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. *Journal of Insect Physiology* 55, 255–263

Takahashi M., Seagar M. J., Jones J. F., Reber B. F., Catterall W. A. (1987): Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5478-5482

Tombola F, Cristina Carlesso C, Szabò I, Bernard M, Jean Reyrat JM. (1999). *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin Forms Anion-Selective Channels in Planar Lipid Bilayers: Possible Implications for the Mechanism of Cellular Vacuolation. *Biophysical Journal*, 76:1401–1409

Vaghy P. L., Striessnig J., Miwa K., Knaus H. G., Itagaki K., McKenna E., Glossmann H., Schwartz A. (1987): Identification of a novel 1,4-dihydropyridine- and phenylalkylamine-binding polypeptide in calcium channel preparations. *J. Biol. Chem.* 262, 14337-14342

Zlotkin, E. (1999). The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu Rev Entomol.*, 44:429–455.

Wassermann GE, Olivera-Severo D, Uberti AF, Carlini CR. (2009). Helicobacter pylori urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. *J Cell Mol Med.* Sep 14. [Epub ahead of print]

Wright, M.K., Brandt, S.L., Coudron, T.A., Wagner, R.M., Habibi, J., Backus, E.A., Huesing, J.E. (2006). Characterization of digestive proteolytic activity in *Lygus hesperus* knight (Hemiptera: Miridae). *J. Insect Physiol.* 52, 717–728.

CURRICULUM VITÆ resumido

PIOVESAN, AR.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Angela Regina Piovesan

Local e data de nascimento: Santa Cruz do Sul, RS, Brasil, 09/09/1984

Endereço profissional: Avenida Bento Gonçalves, 9500 prédio 43422 sala 204

Telefone profissional: 3308-7600 **E-mail:** angela.piovesan@ufrgs.br

2. FORMAÇÃO:

Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2003-2007), título: Processamento de urease de *Canavalia ensiformis* por ninfas e adultos de *Dysdercus peruvianus*.

Mestrado *stricto sensu* pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS (2008-2009), título: Urease de *Canavalia ensiformis*: processamento diferencial por ninfas e adultos de *Dysdercus peruvianus* e formação de canal *in vitro*.

Intercâmbio de Mestrado pelo programa Graduate Student Exchange Program (GSEP) durante o período de 6 meses na Université de Montréal, Canadá (2008-2009).

Curso de curta duração em Técnicas Moleculares Aplicadas à Análise Proteômica – Embrapa, Brasília (2007).

Curso de Técnicas Histológicas – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS (2007).

1º Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular - USP. 2006.

3. ESTÁGIOS:

Estágio curricular: Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS sob supervisão da Dra. Sandra Leistner Segal.

Bolsa de iniciação científica financiada pelo CNPq no Laboratório de Proteínas Tóxicas (2004-2007) sob orientação da Prof. Dra. Célia R. Carlini.

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

Piovesan, A. R. ; Stanisçuaski, F. ; Marco-Salvadori, J. ; Real-Guerra, R. ; Defferrari, M. S. ; CARLINI, C. R. (2008). Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: Role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 1023-1032. [DOI](#)

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

PIOVESAN, AR ; Stanisçuaski, F ; CARLINI, C. R. . Differences in the proteolytic processing of plant urease in adults and nymphs of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera; Pyrrhocoridae).. In: XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006, Águas de Lindóia. Livro de resumos da XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006.

PIOVESAN, AR ; Stanisçuaski, F ; CARLINI, C. R. . Differences in the proteolytic processing of plant urease in adults and nymphs of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera; Pyrrhocoridae).. In: XXXIV Reunião Anual da SBBq, 2005, Águas de Lindóia. Livro de Resumos da XXXIV Reunião Anual da SBBq, 2005.