

## Introdução

Ureases (E.C. 3.5.1.5) são metaloenzimas dependentes de níquel, que estão envolvidas na biodisponibilidade de nitrogênio e em mecanismos de defesa contra predadores e patógenos em plantas. Nosso grupo descreveu a atividade inseticida da Canatoxina, uma isoforma da urease de *Canavalia ensiformis*. Essa toxicidade depende da liberação de um peptídeo interno de 10 kDa (pepcanatox) liberado pela hidrólise da proteína por enzimas digestivas do tipo-catepsinas encontradas no sistema digestivo de insetos suscetíveis. Baseado na sequência N-terminal do pepcanatox um fragmento de 270 pb correspondente ao pepcanatox (jaburetox-2Ec) foi clonado e expresso em *Escherichia coli* (fig. 1). O peptídeo recombinante Jaburetox-2Ec (carregando epitopo V5 e cauda His) foi testado contra o inseto manchador de algodão *Dysdercus peruvianus*, *Rhodnius prolixus*, barata *Blattella germanica* e *Spodoptera frugiperda* e 100% de mortalidade foi observado em todos os modelos testados após a ingestão de microgramas do peptídeo. Estudos de modelagem do peptídeo revelaram a presença de grampo  $\beta$  (fig. 2), que poderia estar envolvido nesta toxicidade. Visando identificar os motivos estruturais envolvidos nessa toxicidade, o ensaio de mutagênese dirigida foi escolhido para este estudo. Para isto, a sequência de DNA do jaburetox-2Ec foi reamplificado por PCR, clonado em plasmídeo pET23a, obtendo a expressão do jaburetox, contendo apenas cauda de histidina (Jaburetox-V5). A partir do Jaburetox-V5, diferentes versões do peptídeo foram geradas por mutagênese sítio-dirigida, através de substituições por Ala de diferentes combinações dos aminoácidos Lys, Glu, Asp no grampo  $\beta$ , e na região N-terminal. Os diferentes peptídeos foram expressos em *E. coli*, purificados e as atividades biológicas dos mutantes foram analisadas no ensaio de secreção de Túbulos de Malpighi, permeabilidade em lipossomas e letalidade contra insetos modelo.

## Objetivos

- Deletar todo o grampo $\beta$  (aminoácidos 61-75);
- Substituir por Ala um cluster de resíduos carregados (posição 24-26) na região N-terminal do jaburetox-V5;
- Expressar mutantes em *E. coli*;
- Avaliar atividades biológicas;
- Estudar qual região do peptídeo é responsável pela atividade entomotóxica.

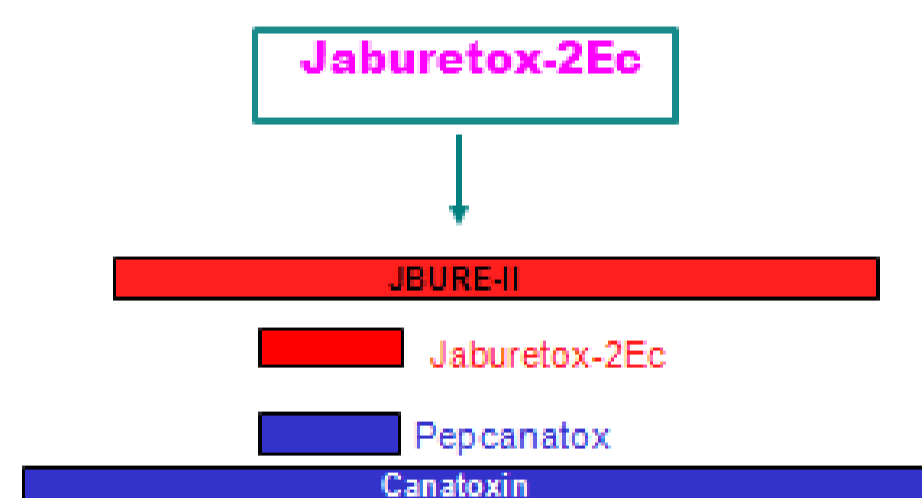


Fig. 1 Representação da estrutura primária da canatoxina, JBURE-II e seu peptídeo entomotóxico derivado.

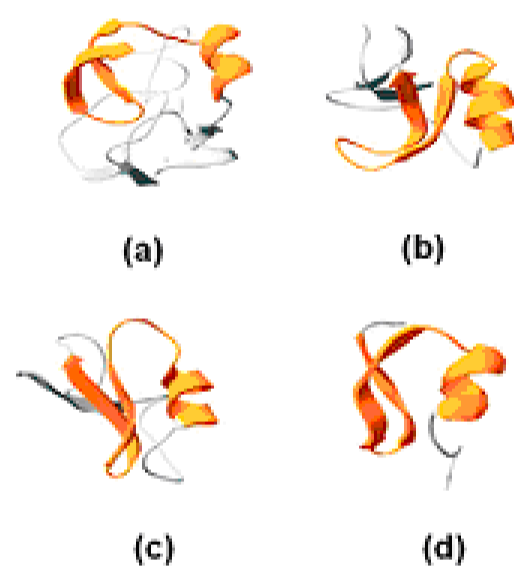
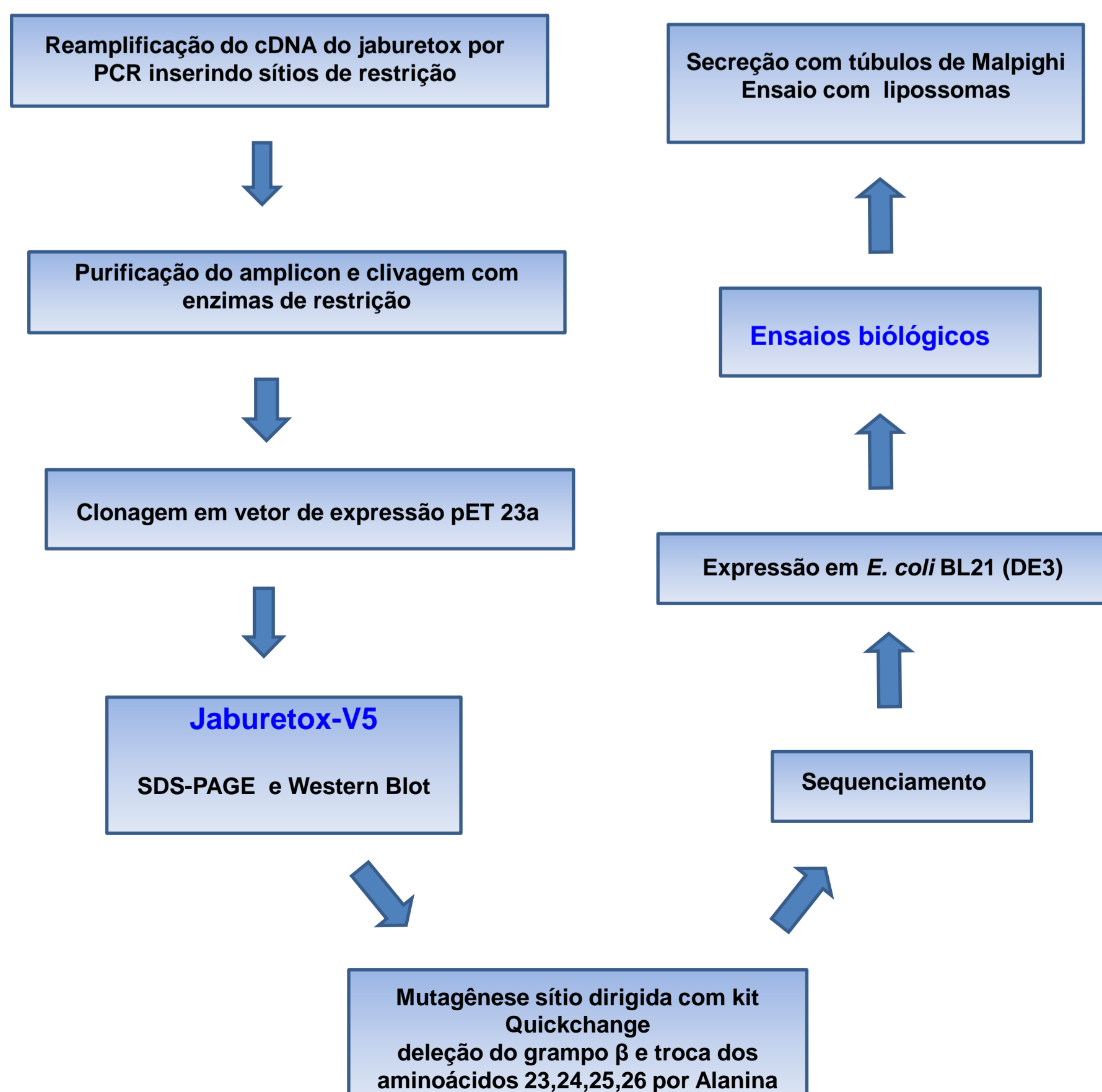


Fig. 2 Modelo estrutural do jaburetox-2Ec (a), e estruturas das neurotoxinas de escorpião, neurotoxina  $\alpha$ -like BMK M1, inibidor de canal de sódio (PDB ID: 1dj1) (b);  $\beta$ -neurotoxina (PDB ID: 1b3c) (c) e BMKK4 (PDB ID: 1s8k) (d), os últimos, inibidores de canal de potássio. Retirado de Barros et al, 2009.

## Materiais e métodos



## Resultados

### SDS-PAGE e Western blot do Jaburetox-V5

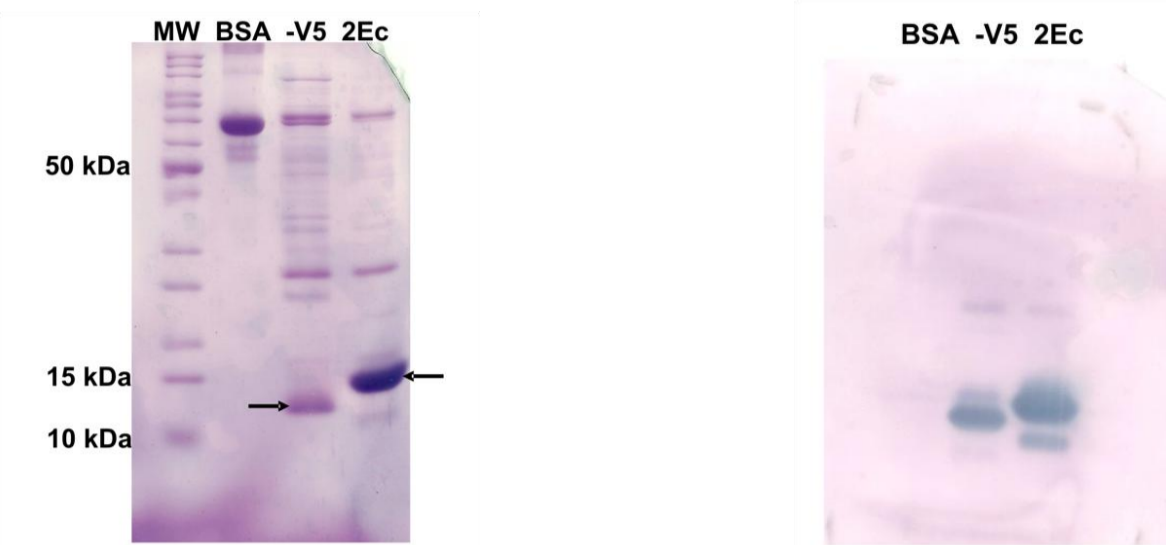


Fig. 3 Análise em SDS-PAGE a 15% do jaburetox-V5 e jaburetox 2Ec purificado por cromatografia de afinidade a Ni. MW: Marcador de peso molecular; BSA, albumina sérica bovina; -V5, Jaburetox-V5; 2Ec, Jaburetox-2Ec.

Fig. 4 Análise por Western blot do Jaburetox-V5 contra anticorpos anti-jaburetox-2Ec e anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina. BSA, albumina sérica bovina; -V5, Jaburetox-V5; 2Ec, Jaburetox-2Ec.

## Ensaio de secreção com Túbulos de malpighi

O peptídeo Jaburetox-V5 e o Jaburetox-V5 sem o grampo  $\beta$ , foi expresso e purificado em coluna de afinidade a Ni (Fig 5). Em seguida foi feito ensaio biológico de secreção com túbulos de malpighi (Fig 6)

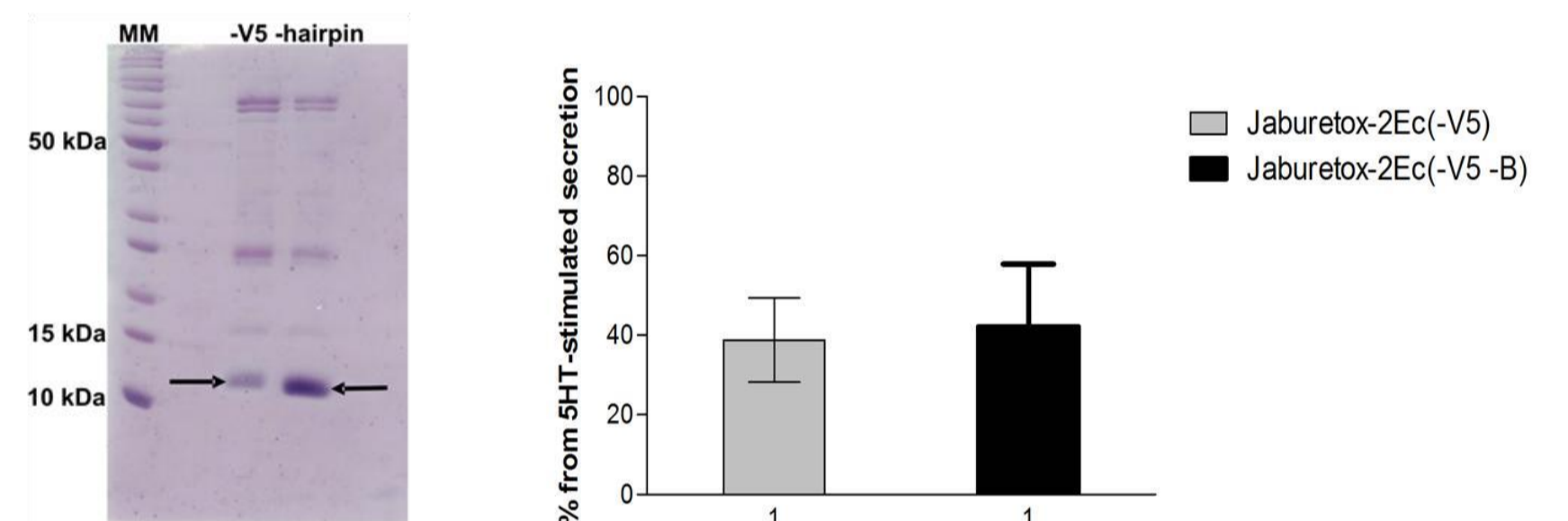


Fig. 5 Análise em SDS-PAGE a 15% do jaburetox-2Ec-V5 purificado com cromatografia de afinidade a Ni. M: Marcador de peso molecular; -V5: jaburetox-V5; -hairpin, jaburetox-V5 sem o grampo beta.

Fig. 6 Ensaio de secreção com Túbulos de malpighi na concentração de  $10^{-15}$  M. 1. Jaburetox-V5 2. Jaburetox-V5 sem o grampo  $\beta$ .

## Ensaio com lipossomas

Para esse ensaio, foram utilizados lipossomas de ácido fosfatídico, preparados pelo método de extrusão. Os gráficos a seguir (Fig. 7) mostram a formação de poros na membrana, detectados por fluorescência com emissão em  $\lambda$  518 nm.

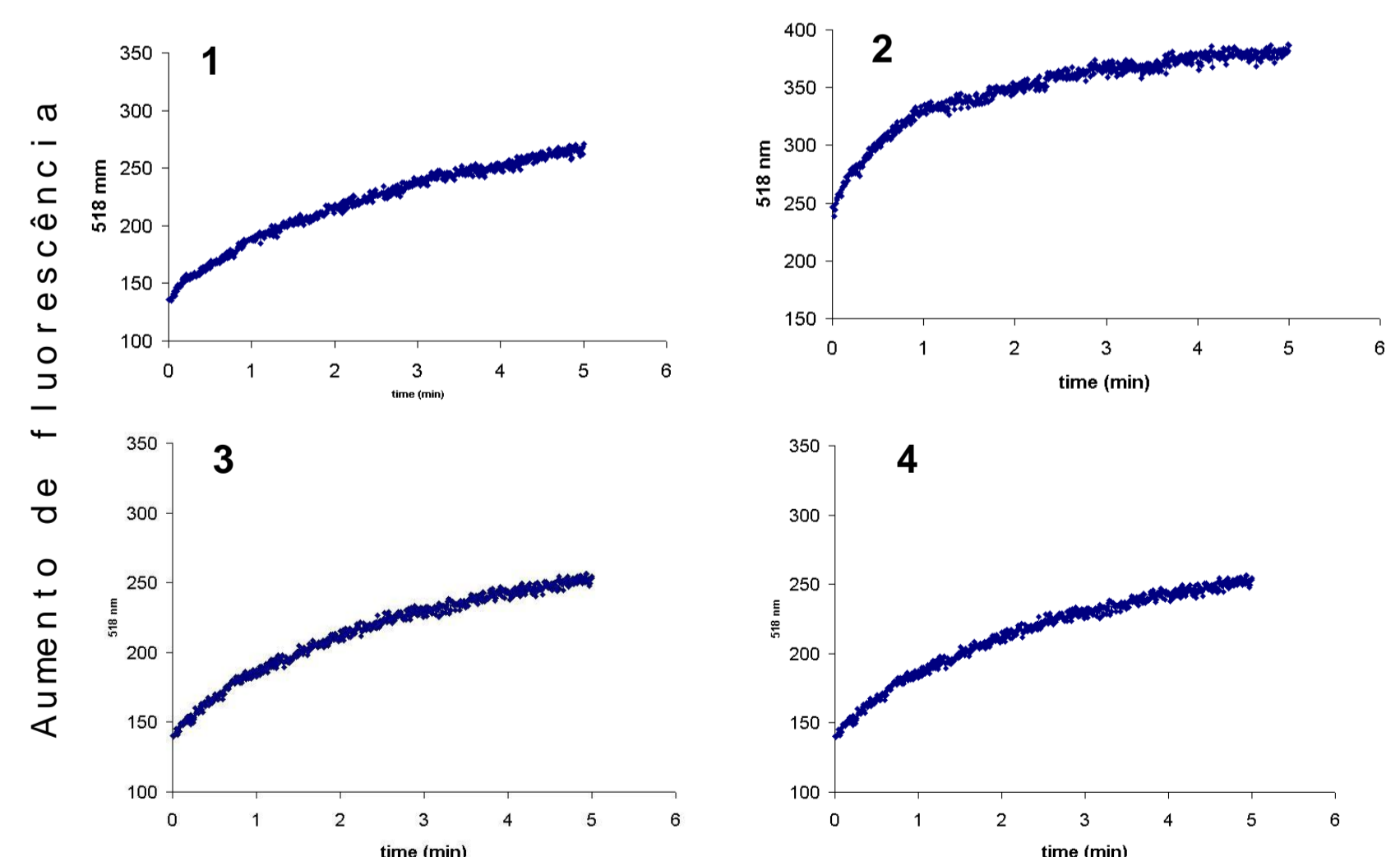


Fig. 7. Ensaio com lipossomas 1. Jaburetox-V5 0,25 mg/mL 100mM NaCl; 2. Jaburetox-V5 0,25 mg/mL; 3. Jaburetox-V5 sem o grampo  $\beta$  0,25 mg/mL; 100 mM de NaCl; 4. Jaburetox-V5 sem o grampo  $\beta$  0,25mg/mL.

## Conclusões

- Utilizando o kit Quick-change site-directed-mutagenesis, que insere as mutações desejadas pelo método de PCR, e tendo como molde o jaburetox -v5, o mutante com deleção do  $\beta$ -hairpin foi obtido.
- Após expressão e purificação do mutante sem  $\beta$ -hairpin, foram realizados ensaios biológicos como o ensaio de secreção de túbulos de Malpighi e ensaio de permeabilização em lipossomas, utilizando como controle o Jaburetox -v5. Os resultados desses experimentos mostraram não haver diferença nas atividades biológicas do mutante em relação peptídeo-controle, indicando que esta região do  $\beta$ -hairpin não está envolvida nestas atividades.

## Perspectivas

- Produzir um mutante em que toda a região N-terminal do Jaburetox-v5 (resíduo 1-44) será deletada;
- Deletar toda a região C-terminal do Jaburetox-V5 (resíduo 45-92);
- Deletar região do peptídeo que forma uma alfa-hélice (resíduo 48-54);
- Modificação química dos aminoácidos do Jaburetox-V5;
- Ensaios Biológicos com o mutante 23,24,25,26.