

EXPRESSÃO DA NEUROTOXINA TX4(6-1) EM SISTEMA HETERÓLOGO E BIOENSAIO COM A LAGARTA DO CARTUCHO (*SPODOPTERA FRUGIPERDA*)

JOSÉ E. F. FIGUEIREDO, THALES L. ROCHA, MARCELO A. FONTES, IVAN CRUZ, EVANGUEDES KALAPOTHAKIS, MARCUS V. GOMEZ e ANTÔNIO A. C. PURCINO

Embrapa Milho e Sorgo, Núcleo de Biologia Aplicada, Laboratório de Bioquímica de Plantas Embrapa Milho e Sorgo, Rodovia MG 424, Km 65, CP 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG – jeff@cnpms.embrapa.br

REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente, a produção nacional de milho é insuficiente para atender a demanda dos mercados nacionais e mundiais. Esta produção seria seguramente maior se as perdas verificadas no processo produtivo fossem minimizadas. Neste contexto, os danos causados pela lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) é significativo, com prejuízos de até 34% da produção. A base do controle de pragas ainda é o uso de inseticidas químicos, com conseqüências de toxicidade negativas ao homem e ao meio-ambiente. O controle biológico aparece como alternativa para minimizar os danos, proporcionando redução dos custos de produção e preservação da saúde pública e ambiental. Toxinas com ação inseticida produzidas por várias espécies de aranhas (dentre elas a armadeira sul-americana *Phoneutria nigriventer*) surgem como importante e ainda inexplorada alternativa para controle biológico. Os conhecimentos atuais no campo da biotecnologia, torna possível viabilizar o emprego mais amplo do controle de pragas pela utilização de plantas transgênicas de milho que sintetizem toxinas inseticidas endogenamente. Os níveis e localização da expressão destes transgenes podem ser regulados, permitindo a presença contínua da toxina em todo a planta ou em tecidos específicos. Esse processo, possibilita a incorporação de novos genes ao *pool* utilizado pelo melhoramento genético clássico, ampliando as perspectivas de obtenção de germoplasmas mais produtivos.

Atividade inseticida tem sido descritas em polipeptídeos isolados das glândulas de veneno de diferentes espécies de aranhas como; *Plectreurys tristis*, PLTX II (Branton *et al.*, 1987); *Agelenopsis aperta*, α e μ -agatoxina (Skinner *et al.*, 1989), ω -agatoxina IA (Adams *et al.*, 1989); *Hololena curta*, curtatoxina (Stapleton *et al.*, 1990); *Aptostichus schilingeri*, Aps I, III e IV (Skinner *et al.*, 1992); *Latrodectus mactans*, α - (Magazanik *et al.*, 1992) e δ - latroinsectotoxina (Dulubova *et al.*, 1996). Essas toxinas tem sido usadas principalmente para estudar canais iônicos e para desenhar futuros inseticidas (Hoover *et al.*, 1996). O veneno da aranha armadeira sul-americana *Phoneutria nigriventer* contém muitos polipeptídeos com ação neurotóxica (Diniz, 1963; Shenberg and Pereira Lima, 1971; Entwistle *et al.*, 1982). Estes são de baixo peso molecular e se ligam com alta afinidade e especificidade a canais iônicos, alterando seu comportamento (Fontana e Brazil, 1985; Araujo *et al.*, 1993; Prado *et al.*, 1996; Guatimosin *et al.*, 1997). Figueiredo *et al.* (1995) isolaram o cDNA que codifica o polipeptídeo Tx4(6-1), o qual é específico para insetos e sem efeito tóxico em aves e mamíferos. Esta toxina foi altamente ativa contra a mosca caseira e baratas, com doses entre 0,02 e 2,5 ng/mg. Os insetos apresentaram sintomas de intoxicação logo após a aplicação e foram incapazes de reverter o quadro de tremor, movimentos desordenados e morte (Figueiredo *et al.*, 1995). Biotestes de

toxicidade destas proteínas em insetos-praga da cultura do milho poderão fornecer importantes resultados em termos de alternativas para tecnologia de transgênicos visando resistência a insetos. Contudo, a baixa concentração de Tx4(6-1) nos extratos totais de veneno e as dificuldades de purificação da proteína em grande escala, constituem fatores limitantes para a realização de bioensaios. A clonagem e expressão de tx4(6-1) em sistemas heterólogos possibilitaria contornar essa limitação. O cDNA Tx4(6-1) codifica uma proteína precursora com 82 resíduos de aminoácidos. Destes, 16 no N-terminal correspondem ao peptídeo sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático. No lúmen da glândula de veneno o propeptídeo é clivado por proteases específicas originando o peptídeo ativo (48aa) que exibe atividade inseticida. Dois primers flanqueando as regiões 5' e 3' foram utilizados em reação de PCR para amplificar a região codificadora do peptídeo ativo (144 pb) de Tx4(6-1). O fragmento amplificado foi purificado do gel de agarose 08% usando Quiaquick spin collun (Quiagen) digerido com as enzimas de restrição *Sma* I e *Bam*H I e clonados no vetor pUC 18. Procedeu-se ao seqüenciamento do clone para determinar a integridade da ORF (Open Reading Frame). Em seguida o inserto codificador do peptídeo ativo Tx4(6-1) foi retirado do vetor pUC 18 usando as enzimas de restrição *Sma* I e *Bam*H I e clonado nos sítios *Xmn* I e *Bam*H I do vetor pMAL de expressão em bactérias em fusão com o gene da maltose binding protein (MBP) (Figura 1). A construção foi expressa na estirpe M15 de *Escherichia coli* crescida durante 8 horas em meio LB enriquecido com maltose (Figura 2). Após a indução com IPTG (isopropylthiogalactoside) na concentração final de 0.3 mM.. Após 4 horas de indução a cultura foi centrifugada a 3000 x g por 10 minutos. Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em tampão da coluna (Tris-HCl, pH 7.4, 11.7 g NaCl, 2.0 mL 0.5 M EDTA, 0.7 M azida sódica) e incubado à -20 °C durante 8 horas. Após esse período, o lisado foi sonificado 4 segundos em pulsos de 15 segundos e centrifugado à 9000g por 30 minutos. O sobrenadante foi diluído 5 vezes em tampão da coluna e cromatografado em coluna de amilose. Após lavagem da coluna com 12 volumes de tampão da coluna, a proteína de fusão foi eluída com tampão da coluna contendo maltose 10 mM. O grau de pureza da proteína de fusão foi evidenciada em gel SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue e western blot (Figura 3A). Em seguida a proteína de fusão foi clivada com fator Xa (Figura 3B) e usada em biotestes com a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*). Quantidades equivalentes a 15 microgramas de proteína de fusão mais proteínas co-purificadas foram administradas na cavidade abdominal de 20 larvas e de 20 insetos adultos. Alternativamente, pequenos pedaços de folhas de milho foram embebidas na mesma quantidade de proteína e fornecidas como dieta alimentar de larvas. Tanto as lagartas quanto os insetos adultos apresentaram diminuição de movimentos e tetania poucos instantes após a administração da proteína. Contudo, não foi observada mortalidade entre elas. Por outro lado, foi observado 100% de mortalidade das larvas alimentadas com as folhas embebidas na toxina. Portanto, pode ser verificado que o peptídeo Tx4(6-1) expresso em bactéria possui ação inseticida eficaz em larvas quando adicionada à dieta das mesmas. Paralelamente, anticorpos policlonais foram produzidos em coelho usando a proteína de fusão eletroeluída após SDS/PAGE.

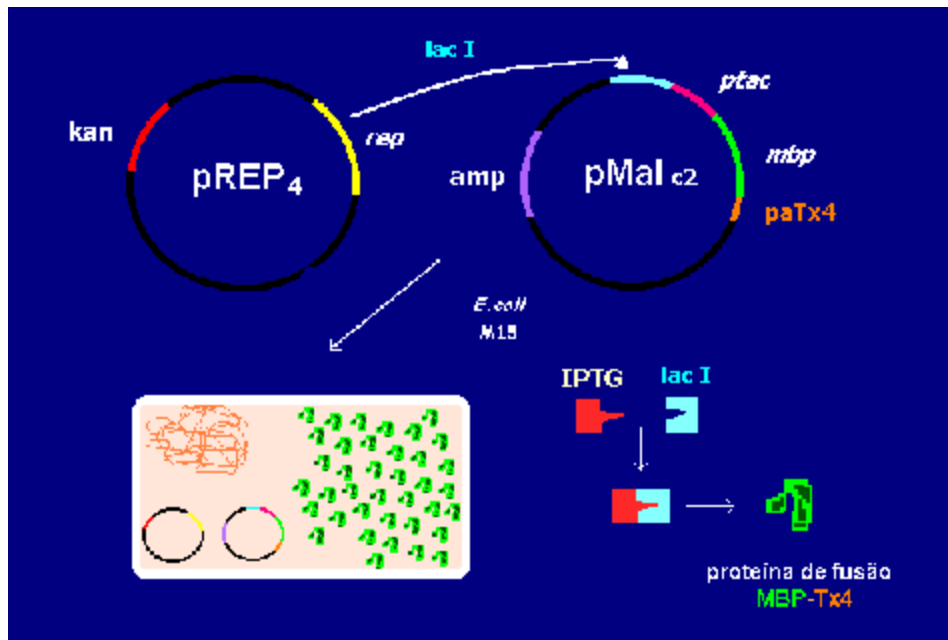


Figura 1. Esquema da clonagem e expressão da proteína de fusão MBP-Tx4 clonado em pMAL

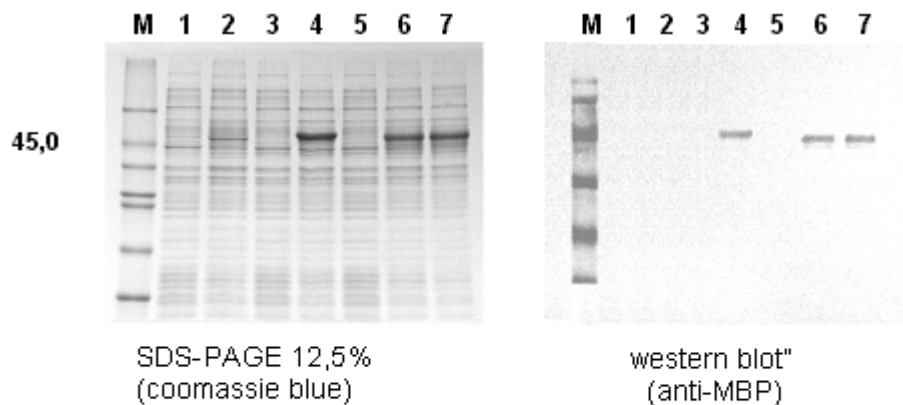


Figura 2. Eletroforese e western blot de extrato protéico total de *E. coli* induzida com 10mM IPTG. M= marcador de peso molecular; 2 e 3 = M15 pREP sem induzir e induzida respectivamente; 4 e 5 = M15 pMAL sem induzir e induzida; 6 e 7 = respectivamente, M15 pMAL/proteína de fusão sem induzir e induzida por 2 horas; 8 = 7 induzida por 8 horas.

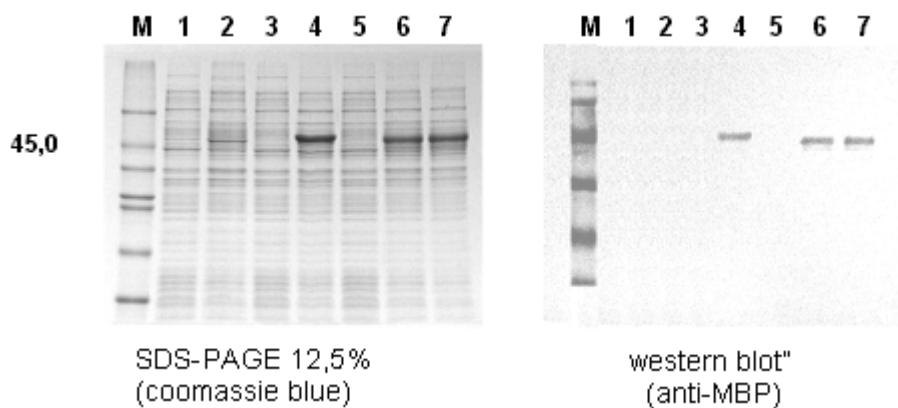


Figura 3. **A**- Gel SDS/PAGE das proteínas induzidas, MBP (1), proteína Tx4 em fusão com MBP (2) e Tx4 em fusão com MBP purificada por coluna de amilose (PR). M= marcador de peso molecular. **B** - Gel SDS/PAGE das proteínas induzidas, MBP (1), proteína Tx4 em fusão com MBP (2) e proteína de fusão clivada com fator Xa. M= marcador de peso molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M.E.; Herold, E.E. ; Venena, V.J Two classes of channel-specific toxins from funnel web spider venom. **Journal of Comparative Physiology A**, Berlin, v.164, p.333-342, 1989.
- Araújo, D.A.M. ; Cordeiro, M.N. ; Diniz, C.R ; Beirão, P.S.L. Effects of a toxin fraction, PhTX2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. **Arch Pharmac**, v.347, p.205-208, 1993.
- Branton, W.D.; Kolton,L.; Jan, N.Y. Neurotoxins from *Plectreurys* spider venom are potent presynaptic blockers in *Drosophila*. **Journal of Neuroscience**, New York, v.7 p.4195-4200, 1987.
- Diniz, C.R. Separation of proteins and characterization of active substances in the venom of the Brazilian spiders. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, Rio de Janeiro, v.35, p.283-291, 1963.
- Dulubova, I.E.; Krasnoperov, V.G.; Khvotchev, M.V.; Pluzhnikov, K.A.; Volkova, T.M.; Grishin,E.V.; Vais,H.; Bell, D.R.; Usherwood, P.N.R. Cloning and structure of δ -latroinsectotoxin, a novel insect-specific member of the latrotoxin family. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v.271, p.7535-7543, 1996.
- Entwhistle, I.D.; Johnstone, R.A.W.; Medzihradszky, D.; May, T.E Isolation of a pure toxic polypeptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and its neurophysiological activity on an insect femur preparation. **Toxicon**, Elmsford, v.20, p.1059-1067, 1982.

- Figueiredo SG, Lima-Perez Garcia, M.E.; Valentim, A.D.C.; Cordeiro, M.N.; Diniz, C.R.; Richardson, M. Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin TX4(6-1) from the venom of the "armed" spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). **Toxicon**, Elmsford, v.33 p.83-93, 1995.
- Fontana, M.D.; Brazil, V.O. Mode of action of *Phoneutria nigriventer* spider venom at the isolated phrenic nerve-diaphragm of the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirao Preto, v.18, p.557-565, 1985.
- Guatimosin, C.; Romano-Silva, M.A.; Cruz, J.S.; Beirão, P.S.L.; Kalapothakis, E.; Moraes-Santos, T.; Cordeiro, M.N.; Diniz, C.R.; Gomez, M.V.; Prado, M.A.M. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. **British Journal of Pharmacology**, London, v.122, p.591-597, 1997.
- Hoover, K.; Herrmann, R.; Moskowit, H.; Bonning, B.C.; Duffey, S.S.; McCutchen, B.F.; Hammock, B.D. The potential of recombinant baculoviruses as enhanced bioinsecticides. **Pesticide Outlook**, Cambridge, v.20, p.21-17, 1996.
- Magazanik, L.G.; Federova, I.M.; Kovalevskaya, G.I.; Pashkov, V.N.; Bulgakov, O.V.; Grishin, E.V. Selective presynaptic insectotoxin (α -latroinsectotoxin) isolated from black widow spider venom. **Neuroscience**, Elmsford, v.46, p.181-188, 1992.
- Prado, M.A.A.; Guatimosin, C.; Gomez, M.V.; Diniz, C.R.; Cordeiro, M.N.; Romano-Silva, M.A. A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin TX3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. **Biochemical Journal**, London, v.314, p.145-150, 1996.
- Shenberg, S. ; Pereira Lima, F.A. *Phoneutria nigriventer* venom In: BURCHEL, W.; BUCKLEY, E. L. eds. **Venoms animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1971. v.3, cap.52.
- Skinner, W.S.; Adams, M.E.; Quistad, G.B. ; Kataoka, H.; Cesarin, B.J, Enderlin, F.E. ; Schooly, D.A Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v.264, p.2150-2155, 1989.
- Skinner, W.S.; Dennis, P.A. ; Li, J.P. ; Quistad, G.B. Identificataion of insecticidal peptides from venom of the trap-door spider, *Aptostichus schlingeri* (ctenizidae). **Toxicon**, Elmsford, v.30, p.1043-1050, 1992.
- Stapleton, A.; Blankenship, D.T.; Ackermann, B.L.; Chen, T.M.; Gorder, G.W.; Manle, G.D.; Palfreyman, M.G. ; Coutant, J.E. ; Cardin, A.D. Curtatoxins: neurotoxic insecticidal polypeptides isolated from funnel-web spider *Hololena curta*. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v.265, p.2054-2059, 1990
- ALDEMITA RR and HODGES TK Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. **Planta**, Berlin, v.199, p.612-617, 1996.