

Universidade de Brasília- UnB  
Instituto de Ciências Biológicas-ICB  
Departamento de Biologia Celular

Variantes de Inibidores de  $\alpha$ -amilases selecionados  
por *Phage Display* com atividade para  $\alpha$ -amilases  
do Bicudo do Algodoeiro (*Anthonomus grandis*,  
Coleptera: Curculionidae)

Rafael Perseghini Del Sarto

Brasília  
2007

Universidade de Brasília-UnB  
Departamento de Ciências Biológicas  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas

O uso de *Phage Display* para seleção de inibidores de  $\alpha$ -amilases ativos para  $\alpha$ -amilases do Bicudo do Algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Coleoptera: Curculionidae)

Rafael Perseghini Del Sarto  
Orientadora: Maria Fátima Grossi de Sá  
Co-orientadoras: Maria Cristina Mattar da Silva

Dissertação a ser apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas/Biologia Molecular.

Brasília  
2007

**Trabalho realizado junto ao Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, da Universidade de Brasília-UnB, sob orientação da Dra. Maria Fátima Grossi de Sá.**

**Aprovado por:**

---

**Prof. Dra. Maria Fátima Grossi de Sá**  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**  
**Orientadora e Presidente da Banca**

---

**Dra. Maria Cristina Mattar da Silva**  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**  
**Co-orientadora**

---

**Dra. Andréa Queiroz Maranhão**  
**Universidade de Brasília-UnB**  
**Membro Titular da Banca Examinadora**

---

**Dra. Marília Santos Silva**  
**Embrapa Cerrados**  
**Membro Titular da Banca Examinadora**

---

**Dr. Fernando Araripe Gonçalves**  
**Universidade de Brasília**  
**Membro Suplente da Banca Examinadora**

**Dedico este trabalho aos meus Pais, Irmão, Avós e a Larissa.**

## **Agradecimentos**

### **Agradeço**

Aos meus pais, por toda educação que me proporcionaram, que durante essa jornada serviu para minha formação, nos relacionamentos que tive neste período importante da minha vida, as condições que me fizeram ser saudável para empregar esforços as minhas aspirações;

A minha namorada, amiga, companheira, Larissa, por te me ensinado que a vida é simples, maravilhosa e que basta sabermos conduzir nossos passos para alcançar a felicidade plena. Pelos momentos de apoio incondicional durante as maiores dificuldades que passei e pelas nossas superações. Pelo sentimento que nos une que é a força diretriz da minha vida;

A minha eterna amiga Márcia pela contribuição imensurável que teve na concretização deste momento e a Lúcia, que sempre esteve abençoando os meus passos e que também despejou muito carinho a mim;

A Dra. Fátima, por todas as oportunidades que me foram concedidas no seu grupo de trabalho, pela confiança, carinho e pela atenção e pela orientação intelectual sempre oportuna;

Ao meu amigo Cleiton que muito contribui com a realização deste trabalho e que esteve presente nos momentos de dificuldade profissional e pessoal;

A Fabíola, pela ajuda despendida em todos os momentos que precisei e pelo contribuição neste trabalho;

A Cristina, pela dedicação na orientação durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas de laboratório que acompanharam essa jornada e aqueles que não permitiram que eu deixasse de fazer a seleção de mestrado;

Aos que contribuíram com meu aprendizado;

E aos amigos que fiz nesse período de construção de conhecimentos por que passei;

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, instituição que me agrega para o meu desenvolvimento intelectual, a Universidade de Brasília que me acolheu nesta empreitada, a Facual, Fialgo e CAPES;

E finalmente. ao Pai Celestial que iluminou cada um dos passos durante a minha caminhada.

**“Muda, que quando a gente muda o mundo muda  
com a gente  
A gente muda o mundo na mudança da mente  
E quando a mente muda a gente anda pra frente”**

**Gabriel o Pensador**

## Sumário

Lista de Figuras e Tabelas.....	ix
Abreviaturas.....	x
Resumo.....	xi
<i>Abstract</i> .....	xii
1.Introdução.....	1
1.1.Cotonicultura Nacional.....	1
1.2. Bicudo do Algodoeiro: ciclo de vida e alternativas de controle.....	2
1.3. Proteínas de Defesa de Plantas.....	5
1.4. Enzimas hidrolíticas.....	7
1.5. Inibidores de Proteases e $\alpha$ -Amilases.....	8
1.5.1. Inibidores de proteases.....	8
1.5.2. Inibidores de $\alpha$ -amilases.....	8
1.6. Plantas transgênicas e o controle de pragas e patógenos.....	10
1.7. Evolução Molecular de Proteínas e sua Aplicação na Agricultura.....	13
2.Objetivo Geral.....	16
2.1. Objetivos Específicos.....	17
3.Materiais e Métodos.....	18
3.1. Purificação de $\alpha$ -amilases intestinais do bicudo do algodoeiro (AGA).....	18
3.1.1. Extração de $\alpha$ -amilases de Larvas do Bicudo do Algodoeiro.....	18
3.1.2 Purificação de AGA em Cromatografia Hidrofóbica.....	18
3.1.3 Ensaio de Atividade Amilolítica.....	19
3.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) Desnaturante e Zimograma de Atividade Amilolítica.....	19
3.2 Expressão de <i>Amylag2</i> em <i>Pichia pastoris</i> .....	20
3.3. Seleção de genes variantes de inibidores de $\alpha$ -amilases com afinidade para AGA.....	22
3.3.1. Re-amplificação da Biblioteca Combinatorial de $\alpha$ -AIs.....	22
3.3.2. Procedimento de Seleção de genes variantes para inibidores de $\alpha$ -amilases utilizando de AGA ( <i>Biopanning</i> ).....	23
3.3.3. Análise de Expressão utilizando Imunodeteccção ( <i>Dot Blot</i> ) dos variantes de inibidores de $\alpha$ -amilases.....	25

3.3.4. Sequenciamento e Análises de Seqüências dos genes variantes para inibidores de $\alpha$ -amilases.....	26
3.4. Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i> com genes para Inibidores de $\alpha$ -amilases Selecionados para AGA utilizando o método de Imersão do Botão Floral.....	26
3.4.1. Sub-Clonagem dos genes variantes para Inibidores de $\alpha$ -amilases em Plasmídeo para Expressão em Planta .....	26
3.4.2. Transformação de <i>A. thaliana</i> utilizando o Método de Imersão do Botão Floral.....	27
3.4.3 Produção de Plantas de <i>A. thaliana</i> .....	28
3.4.4 Análise da expressão em planta de <i>A. thaliana</i> utilizando <i>Western Blot</i> e Ensaio de Elisa.....	29
3.5. Ensaio Inibitório de Atividade Amilásica <i>in vitro</i> contra $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro.....	30
4. Resultados e Discussão.....	31
4.1. Purificação de $\alpha$ -amilases intestinais do bicudo do algodoeiro (AGA).....	31
4.2. Expressão de <i>Amylag2</i> em <i>P. pastoris</i> .....	32
4.3. Procedimento de Seleção de genes variantes de inibidores de $\alpha$ -amilases a partir de AGA ( <i>Biopanning</i> ).....	36
4.4. Análise de Expressão utilizando Imunodeteccão ( <i>Dot Blot</i> ) dos variantes para inibidores de $\alpha$ -amilases .....	37
4.5 Sequenciamento e Análises de Seqüências dos genes variantes de $\alpha$ -Ais.....	38
4.6 Transformação de <i>A. thaliana</i> com Inibidores de $\alpha$ -amilases utilizando o método de Imersão do Botão Floral.....	40
4.6.1. Sub-Clonagem dos Inibidores de $\alpha$ -amilases em Plasmídeo para Expressão em Planta .....	41
4.6.2. Transformação de <i>A. thaliana</i> utilizando o Método de Imersão do Botão Floral.....	42
4.6.3. Análise da expressão em planta de <i>A. thaliana</i> utilizando <i>Western Blot</i> e Ensaio de Elisa.....	44
4.7. Ensaio Inibitório de Atividade Amilásica <i>in vitro</i> contra $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro.....	46
5. Conclusões e Perspectivas.....	50
6. Referências Bibliográficas.....	51



## Índice de Figuras e Tabelas

<b>Figura 1:</b> Microscopia eletrônica de estruturas reprodutivas do algodoeiro.....	5
<b>Figura 2:</b> Alinhamento múltiplo de seqüências dos inibidores de $\alpha$ -amilase 1 ( $\alpha$ -AI1) e 2 ( $\alpha$ -AI2) de feijão comum.....	10
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática do procedimento de <i>biopanning</i> para seleção de variantes de inibidores de $\alpha$ -amilases com afinidade para AGA.....	24
<b>Figura 4:</b> Cromatografia hidrofóbica de extrato de larva de <i>A. grandis</i> em <i>Phenyl Sepharose</i> CL 4B.....	32
<b>Figura 5:</b> Análise do enriquecimento de AGA em SDS-PAGE.....	33
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática da sub-clonagem do gene <i>Amylag2</i> (AF527877) do bicudo do algodoeiro.....	34
<b>Figura 7:</b> Ensaio de atividade amilásica dos clones positivos para AgAMY2.....	35
<b>Figura 8:</b> Expressão de AGAMYL2 em <i>P. pastoris</i> (GS115).....	35
<b>Figura 9:</b> Titulação de fagos.....	37
<b>Figura 10:</b> Análise da expressão de 86 clones variantes de inibidores de $\alpha$ -amilases com afinidade para AGA.....	38
<b>Figura 11:</b> Ilustração esquematizada dos diferentes clones selecionados contra AGA resultantes da recombinação dos genes $\alpha$ -AI1 e o $\alpha$ -AI2.....	40
<b>Figura 12:</b> Análise da PCR dos genes dos inibidores de $\alpha$ -amilase selecionados para AGA (C11, C3, G4, E11).....	41
<b>Figura 13:</b> Esquema da construção do plasmídeo para expressão dos variantes de inibidores de $\alpha$ -amilases selecionados por afinidade para AGA.....	42
<b>Figura 14:</b> Seleção das plantas transformadas de <i>A. thaliana</i> em meio seletivo contendo canamicina (100 $\mu$ g/mL).....	43
<b>Figura 15:</b> Análise por PCR da transformação de <i>A. thaliana</i> por imersão do botão floral.....	44
<b>Figura 16:</b> Análise da expressão dos inibidores de $\alpha$ -amilase em <i>A. thaliana</i> .....	45
<b>Figura 17:</b> Atividade inibitória dos variantes de inibidores de $\alpha$ -amilases expressos em <i>A. thaliana</i> , C3, C11, A11, E11, dos inibidores de $\alpha$ -amilase 1 (AI1) e 2 (AI2) de feijão comum contra AGA.....	46
<b>Figura 18:</b> Atividade inibitória dos variantes de inibidores de $\alpha$ -amilases selecionados por afinidade para $\alpha$ -amilases de <i>A. grandis</i> (AGA).....	47

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Taxa de transformação das plantas de <i>A. thaliana</i> transformadas com $\alpha$ -AIs/pC2300 modificado.....	44
---	----

## Abreviaturas

5' e 3' RACE: Amplificação rápida de extremidade de DNA complementar 5' ou 3'

AOX1: álcool oxidase 1

BMG: meio com glicerol tamponado

BMM: meio com metanol tamponado

BSA: albumina de soro bovino

cDNA: DNA complementar ao RNA mensageiro

DNS: ácido di-nitro-salicílico

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

HRP: horseradish peroxidase

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IPTG:  $\beta$ -D-tio-galactosideo

IUTCI: inibidor de tripsina/quimotripsina de *Inga umbratica*

MES: ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico

MM: meio mínimo

MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico

Mwco: *molecular weight cut off*

O.D.: densidade óptica

PBS: tampão fosfato-salino

PCR: reação em cadeia de polimerase

PEG: polietilenoglicol

pNPP: p-nitrofenil fosfato

Rpm: rotações por minuto

RT-PCR: PCR com transcrição reversa

RyeIII: inibidor de  $\alpha$ -amilase extraído de centeio

SB: super broth

SKTI: inibidor de tripsina do tipo Kunitz de soja

TBS: tampão tris-salino

USDA: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América

## Resumo

O bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) é uma das principais pragas da cultura do algodão, ocasionando perdas significativas devido ao hábito endofítico das larvas, cujos botões florais e as maçãs do algodoeiro são os órgãos preferencialmente atacados pelos insetos, tanto para alimentação, quanto para oviposição, dificultando seu controle pelo uso de inseticidas. Entre as proteínas vegetais relacionadas aos mecanismos de defesa das plantas, os inibidores de  $\alpha$ -amilases são conhecidos por suas distintas especificidades para insetos-praga. O bicudo utiliza  $\alpha$ -amilases intestinais para digerir o amido presente nas partes das plantas ingeridas. O presente trabalho teve por objetivo selecionar variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -AI) com afinidade para  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro, a partir de uma biblioteca combinatória de genes codificadores para mutantes de inibidores de  $\alpha$ -amilase, obtidos por meio da recombinação entre os inibidores  $\alpha$ -AI1 e  $\alpha$ -AI2, isolados de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Para isto,  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro (AGA) foram parcialmente purificadas e utilizadas em experimentos de *biopanning*. Além disso, uma  $\alpha$ -amilase do inseto, *Agamyl2* foi expressa em levedura *Pichia pastoris* e utilizada para análise da atividade dos variantes selecionados. Foi possível selecionar vinte e seis variantes com afinidade para AGA apresentando distintas mutações herdadas dos genes parentais. Cinco variantes selecionados para AGA foram utilizados para transformação de *Arabidopsis thaliana* que foi capaz de expressar os  $\alpha$ -AIs na forma ativa. Estes variantes foram capazes de inibir a atividade amilásica de AGA *in vitro*. As estratégias de DNA *shuffling* e *Phage Display* foram eficientes para a seleção de inibidores para  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro, disponibilizando novos genes com potencial para o controle do bicudo. Após a análise da toxicidade *in vivo* estes inibidores poderão ser utilizados em programas de melhoramento vegetal utilizando transgenia.

Palavras-chaves: Bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis*, Biblioteca combinatória, inibidores de  $\alpha$ -amilases, *Arabidopsis thaliana*, DNA *shuffling* e *Phage Display*.

## ABSTRACT

The cotton boll weevil *Anthonomus grandis* is an important insect-pest, that causes severe damage in cotton floral fruits and buds. The *A. grandis* larvae development control is a difficult job because it occurs inside the cotton floral structures. Starch granules from cotton structure are digested by  $\alpha$ -amylases secreted to the intestinal lumen. However,  $\alpha$ -amylase inhibitors ( $\alpha$ -AIs) may be used in transgenic plants to control insect-pest. In this work, a large combinatorial library ( $10^7$ ) of  $\alpha$ -amylase inhibitors variants obtained by DNA shuffling of  $\alpha$ -AI1 and  $\alpha$ -AI2 homologous genes was used to select  $\alpha$ -amylase inhibitor mutant genes against cotton boll weevil  $\alpha$ -amylases (AGA). Twenty six  $\alpha$ -AIs mutants were selected showing different mutation patterns. Five out of these mutants were expressed in *Arabidopsis thaliana* and their  $\alpha$ -amylase inhibitory activity assayed. The  $\alpha$ -AIs mutants were active against AGA in an in vitro assay inhibiting at nM range. These results demonstrate the potential of  $\alpha$ -AIs mutants in controlling of cotton boll weevil making them candidates to obtain pest resistant transgenic plants.

**Key-words:** Cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*, combinatorial library,  $\alpha$ -amylase inhibitors, transgenic plants.

## 1. Introdução

### 1.1 Cotonicultura Nacional

A cada ano a safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas aumenta significativamente. Segundo estimativas do IBGE (disponível no endereço eletrônico <http://www.ibge.gov.br/home/>), para o ano safra de 2007, a produção brasileira será de aproximadamente 127,9 milhões de toneladas, ou seja, 9,7% maior que a safra anterior, gerando uma receita de aproximadamente R\$ 58,1 bilhões. O algodão insere-se na agricultura nacional como uma importante *commoditie* cultivada. No cenário mundial, o Brasil é o quinto maior produtor de algodão. A produção brasileira compreende 5% da produção internacional. O caráter expressivo da cultura do algodão no Brasil é demonstrado pelo aumento significativo da área plantada e da produtividade. Refletindo na economia interna, afetando positivamente a balança comercial, contribuindo com a geração de empregos diretos e indiretos e gerando aproximadamente R\$ 2 bilhões por ano. No país, o cultivo ocorre nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. As áreas plantadas com algodão em 2007 aumentaram 20,5% em relação a safra anterior. A primeira estimativa da produção de algodão herbáceo para 2007 indica uma produção de 3,7 milhões de toneladas, com um aumento de 27,1% em relação a safra de 2006 (2,9 milhões de toneladas). Esse aumento é oriundo principalmente da recuperação das cotações da fibra, nos mercados interno e externo. O maior produtor nacional, o estado do Mato Grosso, com uma produção que corresponde 53,0% do algodão brasileiro, deve colher em torno de 1,9 milhões de toneladas, quantidade 36,7% maior que a colhida em 2006. O país exporta aproximadamente 25% da sua produção (USDA, 2007, disponível no endereço eletrônico <http://www.usda.gov/>). O algodoeiro é considerado uma das plantas cultivadas mais susceptíveis ao desenvolvimento e ataque de pragas, com mais de 20 (vinte) espécies relatadas e conhecidas (Gallo *et al.*, 1988).

## 1.2 Bicudo do Algodoeiro: ciclo de vida e alternativas de controle

Entre as plantas cultivadas, uma das mais susceptíveis ao desenvolvimento e ataque de pragas é o algodoeiro, com mais de 20 (vinte) espécies relatadas e conhecidas (Gallo *et al.*, 1988). Originário do México e América Central, onde sua alimentação consistia de algodão selvagem, o bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* – inseto praga pertencente a ordem Coleoptera, família Curculionidae (Boheman, 1843) é considerado um dos mais importantes insetos para a cultura do algodão, *Gossypium hirsutum* L.r. latifolium Hutch., no Brasil e no mundo. O controle por meio da utilização de inseticidas não é eficiente. Mesmo sendo tóxicos para o inseto, os inseticidas não agem em estágios que ocorrem endofiticamente, com isso as larvas e pupas são protegidas das estruturas dos botões florais. Assim, repetidas aplicações tornam-se necessárias para redução do número de insetos na cultura. O inseto adulto do bicudo do algodoeiro possui uma coloração cinza ou castanha, com cerca de 7 mm de comprimento, apresentando uma probóscide alongada com 2 mm. O ciclo de vida do bicudo ocorre com a metamorfose completa. As fêmeas colocam seus ovos individualmente nos botões florais. Diariamente, cerca de 7-11 ovos são colocados por fêmea, alcançando uma média de 200 ovos durante seu ciclo de vida. Os locais de oviposição são marcados com fezes, o que os deixa com uma característica de cor marron. Após três dias, as larvas eclodem e se alimentam dos tecidos dos botões florais por aproximadamente 7 a 14 dias, passando por três instares de desenvolvimento antes de desenvolverem-se em pupa. O estágio pupal dura aproximadamente 5 dias e após este estágio os insetos adultos emergem. O ciclo completo, de ovo a ovo, normalmente ocorre entre 18 e 21 dias, podendo variar em função das condições ambientais como temperatura e umidade.

Os maiores danos causados a cultura ocorrem devido à oviposição e a alimentação larval. Em uma infestação massiva, o desenvolvimento de maçãs pode ser praticamente suprimido. No período de 30-40 dias, os adultos podem ovipositar na porção intermediária do algodoeiro e se alimentar dos botões florais (consumindo grãos de pólen e ovários). Eventualmente as maçãs podem ser atacadas em função da pressão populacional.

No período da entressafra, os insetos adultos fogem para vegetações ao redor do campo cultivado, que são utilizados como refúgios, onde iniciam um processo de

depressão metabólica, chamado de estivação, a fim de resistir até a próxima safra. Os insetos em estivação, do período entressafra, são atraídos pelas plantas jovens de algodão. Os órgãos vegetativos, inicialmente atacados são as folhas, os pecíolos, e as gemas apicais, iniciado a partir das margens do campo cultivado. Os insetos permanecem nestas áreas até o surgimento de botões florais e então logo ocorre à dispersão acelerada por toda a área. Sendo que o ataque crítico do bicudo do algodoeiro ocorre 40 a 90 dias após o plantio.

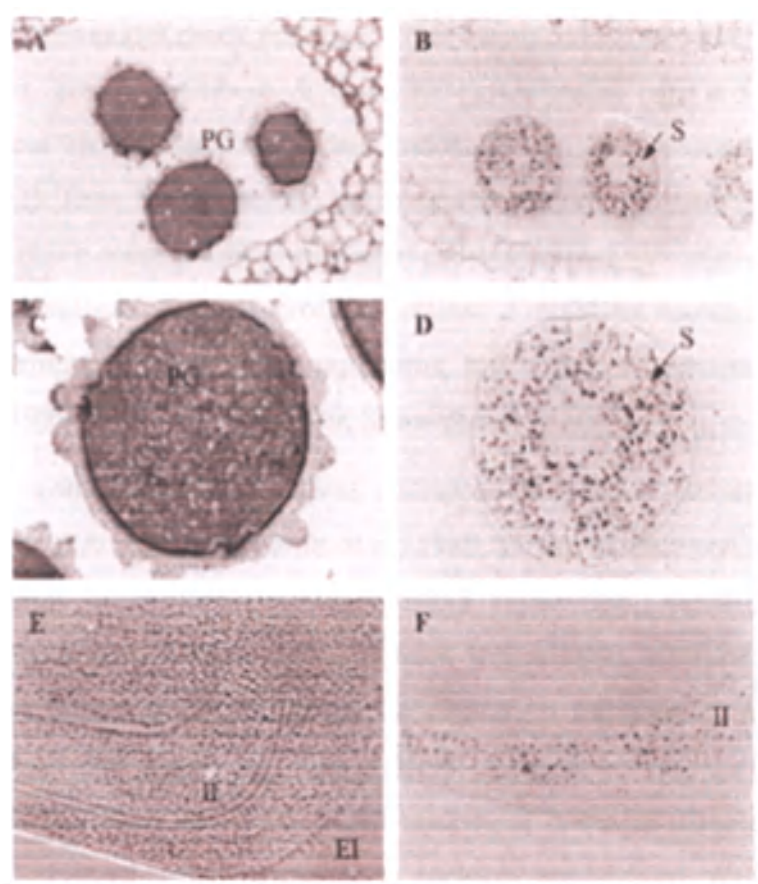
Do ponto de vista econômico, o bicudo do algodoeiro é considerado uma praga extremamente importante nas diversas regiões produtoras brasileiras. Isto ocorre principalmente pelos prejuízos ocasionados pelos danos gerados às estruturas reprodutivas, ocasionando a queda dos botões florais, flores e maçãs. As perdas totalizam uma marcante redução na produtividade da cultura (Bellettini *et al.*, 1998), podendo resultar em prejuízo total, caso as medidas de controle adequadas não sejam empregadas.

Diversas técnicas de controle são utilizadas com o objetivo de reduzir os danos causados pelo ataque do bicudo do algodoeiro à cultura do algodão. A utilização de inseticidas químicos é o método comumente utilizado pelos agricultores, sendo o Malation (organofosfato, inibidor de colinesterase) o inseticida mais utilizado. Apesar de eficaz o uso freqüente de inseticidas ocasiona a contaminação ambiental e é economicamente dispendioso. A utilização de armadilhas com ferormônios para o monitoramento da população de insetos, plantio de plantas com florescimento precoce ou plantio-isca, manejo integrado e controle biológico são métodos alternativos de controle do bicudo do algodoeiro (Gallo, *et al.* 2002). Além disso, programas de melhoramento vegetal por meio de transgenia consistem numa via alternativa aos métodos convencionais para o controle de insetos-praga (Morton *et al.*, 2000; Carlini & Grossi-de-Sa, 2002; Sarmah *et al.*, 2004).

No lúmen intestinal do bicudo do algodoeiro há a presença de enzimas hidrolíticas responsáveis pela digestão das macromoléculas presentes em sua dieta. A caracterização bioquímica e molecular destas enzimas digestivas revelou que o inseto utiliza um repertório de proteases e carboidrases para digestão de proteínas e amido presentes nas estruturas reprodutivas da planta. A atividade de proteinases cisteínicas e serínicas foi detectada no intestino de larvas e de insetos adultos (Oliveira-Neto *et al.*, 2004a,b). Transcritos dos genes destas proteases também foram detectados, indicando

seu possível envolvimento na digestão de proteínas da dieta do bicudo do algodoeiro. Níveis elevados de atividade amilolítica foram detectados no intestino de bicudo do algodoeiro, no estágio larval e no inseto adulto. Utilizando RT-PCR combinado com as técnicas de 5' e 3' RACE, dois transcritos de genes de  $\alpha$ -amilases foram clonados, *Amylag1* e *Amylag2*, a partir do cDNA de larvas do bicudo do algodoeiro. Os transcritos destes genes foram detectados apenas em larvas e insetos adultos que ingeriram alimentos, indicando que a ingestão do alimento estimula a expressão destes genes. Em acréscimo, a detecção de  $\alpha$ -amilases no intestino do bicudo do algodoeiro está relacionada com a presença de grande quantidade de amido, nos grãos de pólen e óvulos de botões florais jovens, principal estrutura utilizada pelo bicudo para alimentação e oviposição (figura 1) (Oliveira-Neto *et al.*, 2003). Estes dados indicaram que a utilização de inibidores de  $\alpha$ -amilases e/ou proteinases pode consistir numa estratégia efetiva para o controle do bicudo do algodoeiro. Ensaio *in vitro* e *in vivo* utilizando inibidores de proteinases mostraram que o inibidor de tripsina de sementes de *Cicer arietinum* (CaTI) quando incorporado à dieta artificial do bicudo na concentração de 1,5% (peso/peso), provocou uma redução no desenvolvimento e deformidades nos insetos, e o índice de mortalidade aproximou-se de 45% (Gomes *et al.*, 2005). Da mesma forma, o inibidor de quimotripsina/tripsina de sementes de *Vigna unguiculata* (BTCI) também ocasionou efeitos significativos no desenvolvimento do bicudo do algodoeiro, gerando redução de aproximadamente 54% do peso dos indivíduos avaliados e mortalidade de 65% numa concentração de 100 mM do inibidor utilizado (Franco *et al.*, 2003). Outros inibidores como SKTI (Franco *et al.*, 2004), IUTCI (Calderon *et al.*, 2005) foram testados *in vitro* e *in vivo* contra proteinases serínicas e  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro e se mostraram efetivos. O inibidor de  $\alpha$ -amilase de centeio (*Secale cereale*) RyeIII foi tóxico para o bicudo do algodoeiro após ser expresso em bactéria e renaturado, com índice de mortalidade de 83% e redução no peso larval (Dias *et al.*, 2005). A utilização de proteínas que compõem a defesa das plantas pode permitir o controle do bicudo do algodoeiro reduzindo os danos gerados a cultura do algodão.





**Figura 1:** Microscopia eletrônica de estruturas reprodutivas do algodoeiro. Secções (500 nm) de grãos de pólen (A, B, C, D) (PG- grãos de pólen e óvulos (E e F) (EI- integumento externo; II- integumento interno) corados com azul de toluidina (A e C) e solução de iodina (B, D, E e F) exibindo grãos de amido (S) nos botões florais jovens de plantas de algodoeiro. Figura de Oliveira-Neto *et al.*, 2003).

### 1.3 Proteínas de Defesa de Plantas

As plantas estão constantemente sendo atacadas por insetos e patógenos. Estes utilizam substâncias que contribuem e facilitam o rompimento de barreiras físicas e químicas constituídas pelas plantas. Assim, a presença de mecanismos de defesa para assegurar o desenvolvimento e a reprodução da espécie é essencial (Carlini & Grossi de Sa, 2002). Estes sofisticados mecanismos de defesa podem ser constitutivamente produzidos ao longo do desenvolvimento ou induzidos após um contato primário do patógeno ou inseto com a planta (Lamb *et al.*, 1989), podendo estar relacionados com a contenção física da infecção, por meio de respostas hipersensitivas que agem isolando o

patógeno com a morte programada (apoptose-like) das células que o circundam (Dangl, *et al.*, 1996; Hammond-Kosack & Jones, 1996; Lamb & Dixon, 1997; Pennell & Lamb, 1997; Alvarez, 2000; Greenberg & Yao, 2004), ou então, com o fortalecimento das barreiras físicas em resposta aos sinais endógenos ou do patógeno invasor (Heil & Bostock, 2002). Esse fortalecimento compreende alterações na composição da parede celular, incluindo a acumulação de proteínas estruturais como extensinas, proteínas ricas em glicina, proteínas ricas em prolina, lectinas e arabinogalactanos, assim como a síntese de enzimas que modificam polímeros, tais como, a suberina, lignina e calose (Lamb *et al.*, 1989; Varner & Lin, 1989; Showalter, 1993).

Como componentes da defesa química, as plantas sintetizam proteínas e peptídeos (Stintzi *et al.*, 1993; Lamb *et al.*, 1989; Dixon & Harrison, 1990), produzem espécies reativas de oxigênio, como radicais superóxido, hidroxil e peróxido de hidrogênio, que atuam como antimicrobianos e que agem na formação de ligações cruzadas entre os componentes da parede celular, possibilitando seu fortalecimento (Dixon *et al.*, 1994; Lamb & Dixon, 1997; Alvarez *et al.*, 1998); e acumulam metabólitos secundários de baixa massa molecular como as fitoalexinas (Castro & Fontes, 2005). Dentre estes componentes incluem antibióticos, alcalóides, terpenos, glicosídeos cianogênicos, quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases, lectinas, arcelinas, vicilinas, sisteminas, proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteins) (Selitrennikoff, 2001), tioninas (Florach & Stiekema, 1994; Broekaert *et al.*, 1997; Bloch *et al.*, 1998; Castro & Fontes, 2005; Pelegrini & Franco, 2005), defensinas (Castro & Fontes, 2005; revisado por Broekaert *et al.*, 1995 e por Lay & Anderson, 2005), lipid transfer proteins (LTPs: revisado por García-Olmedo *et al.*, 1995, Castro & Fontes, 2005), peptídeos tipo heveína (Broekaert *et al.*, 1992), tipo knotina (Cammue *et al.*, 1992; Segura *et al.*, 1993), de *Macadamia integrifolia* (MiAMP1) (Marcus *et al.*, 1997; McManus *et al.*, 1999), de *Impatiens balsamina* (Ib-AMP1) (Tailor *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 1998), ciclotídeos (Jennings *et al.*, 2001), esnaquina-2 de batata (Berrocal-Lobo *et al.* 2002) e inibidores de enzimas hidrolíticas (Ryan, 1990; Sales *et al.*, 2000; Carlini e Grossi de Sá, 2002, Selitrennikoff, 2001). Mesmo com a presença deste complexo mecanismo de defesa alguns insetos são capazes de causar danos às estruturas das plantas. Isto ocorre principalmente devido a adaptação do inseto-praga/patógeno em resposta ao novo fator de resistência vegetal, referida como co-evolução parasita-hospedeiro, de acordo com Erlich & Raven (1964). Esta pode incorrer na detoxicação ou excreção do fator de

resistência ou simplesmente em uma adaptação que torne o organismo imune à ação tóxica, habilitando-o a se alimentar ou se devolver na planta.

#### 1.4 Enzimas Hidrolíticas

Para se desenvolverem nas plantas, os insetos-praga e patógenos empregam enzimas hidrolíticas, seja para digerir o conteúdo ingerido, seja para penetrar nos tecidos vegetais (Castro & Fontes, 2005). As enzimas digestivas utilizadas podem ser classificadas como proteinases do tipo cisteínica, proteinase do tipo serínica, proteinases do tipo metalo, proteinases do tipo aspárticas e carboidrases ( $\alpha$ -amilases e glicosidasas). Plantas transgênicas expressando inibidores de enzimas hidrolíticas resultaram no controle ou na alteração do desenvolvimento de insetos-praga, demonstrando a sua importância (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002). Vários organismos - plantas, fungos, insetos, mamíferos- utilizam  $\alpha$ -amilases e glicosidasas para mobilização dos carboidratos. As  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -1-4glucano-4-glucanohidrolases, EC 3.2.11) recebem especial atenção, pois estão envolvidas diretamente na digestão de amido. Estas enzimas são responsáveis pela hidrólise de ligações  $\alpha$ -1-4 do amido, do glicogênio e outros carboidratos. São muito importantes para os insetos que utilizam os produtos da hidrólise do amido como única fonte de energia para seu desenvolvimento, o caso, por exemplo, dos insetos que atacam grãos armazenados. De acordo com a única estrutura tridimensional de  $\alpha$ -amilase de inseto resolvida, a  $\alpha$ -amilase do inseto *Tenebrio molitor* (TMA), estas moléculas são monoméricas (Strobl *et al.*, 1998). Possuem três domínios distintos, A, B e C. O domínio A é formado por dois segmentos compreendendo os resíduos 1-97 e 160-379, formando uma estrutura em forma de barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, contendo oito fitas- $\beta$  envolvidas por oito segmentos helicoidais (sete  $\alpha$ -hélices e uma 310-hélice). O sítio catalítico e os resíduos de ligação ao substrato localizam-se neste domínio. O domínio B, formado por segmentos lineares e  $\alpha$ -hélices curtas, insere-se no domínio A, possui forma globular e compreende os resíduos 98-159. O domínio B forma uma cavidade entre o barril  $\beta$  do domínio A, onde há o sítio de ligação para o íon  $\text{Ca}^{++}$ , interação importante para a integridade estrutural da enzima. O domínio C compreende os resíduos C-terminais 380-471 e está localizado na orientação oposta ao domínio B. Ele é formado por dez folhas  $\beta$ , oito destas organizadas em  $\beta$ -sanduíche com topologia

chave grega. A interface entre o domínio C e o domínio A sugere que é importante para a atividade, estabilidade e para o dobramento da enzima. A tríade catalítica é formada pelos resíduos ácidos Asp185, Glu 222 e Asp287, conservados entre as  $\alpha$ -amilases de diferentes organismos. A enzima acomoda seis resíduos de açúcar na cavidade de ligação a polissacarídeo. A clivagem ocorre na extremidade não redutora entre o terceiro e o quarto resíduo liberando moléculas de maltose ou oligossacarídeos maiores (Oudjeriouat *et al.*, 2003). Provavelmente a reação deve ocorrer por meio de duplo deslocamento (Franco *et al.*, 2002).

## **1.5 Inibidores de proteases e $\alpha$ -amilases**

### **1.5.1 Inibidores de proteases**

Os inibidores de proteinases ocorrem em plantas, animais e invertebrados. Estas moléculas são cruciais, pois a proteólise é um evento que deve ser estritamente controlado para que prejuízos não sejam gerados, por isto a sua ocorrência em vários organismos não é surpreendente. Os inibidores de enzimas hidrolíticas podem ser inibidores de proteinases do tipo cisteínica, tipo serínica, tipo aspártico e tipo metalo. Em plantas, inibidores destas quatro classes já foram caracterizados e são moléculas alternativas para o controle de insetos-praga e patógenos (Abe *et al.*, 1987; Richardson, 1991; Abe, *et al.*, 1992; Botella *et al.*, 1996; Christeller, *et al.*, 1998; Cater *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2003; Zhang, *et al.*, 2006).

### **1.5.2 Inibidores de $\alpha$ -amilases**

Os inibidores de  $\alpha$ -amilases podem ser protéicos ou não protéicos. Dentre os inibidores não proteicos incluem diversos componentes orgânicos, tais como acarbose, isoacarbose, acarviosina-glicose, ácido hibisco e ciclodextrinas. Por exemplo,  $\alpha$ -amilase pancreática de porco (PPA) e humana (PHA) são inibidas pelas duas formas de ácido hibisco extraído de *Hibiscus sabdariffa*, pela acarviosina-glicose, por isoacarbose, e pelas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas. Por terem estrutura cíclica, similar ao substrato das  $\alpha$ -amilases, estes se ligam ao sítio ativo das enzimas, inibindo a sua atividade. A inibição

de PPA com ciclodextrinas é dependente de pH, temperatura e substrato. Quando amilose é usada como substrato, a inibição é competitiva, quando maltopentaose é usada, a inibição é do tipo não competitiva (Koukiekoulo *et al.*, 2001). A inibição desta enzima com acarbose é do tipo não competitiva, independentemente do substrato (Koukiekoulo *et al.*, 1999). Estas moléculas podem ser potencialmente utilizadas para o tratamento ou diagnósticos de doenças (Bischoff *et al.*, 1994; O'Donnell *et al.*, 1997).

Os inibidores de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AI) proteicos já foram encontrados em cereais, como o trigo *Triticum aestivum* (Garcia-Maroto *et al.*, 1991; Feng *et al.*, 1996; Franco *et al.*, 2000), a cevada *Hordeum sativum* (Abe *et al.*, 1993), o centeio *Secale cereale* (Garcia-Casado *et al.*, 1994; Iulek *et al.*, 2000), o sorgo, *Sorghum bicolor* (Bloch Jr, C. & Richardson, M., 1991), o arroz, *Oryza sativa* (Yamagata *et al.*, 1998) e leguminosas como o feijão comum (Marshall & Lauda, 1975; Ishimoto *et al.*, 1996; Grossi de Sá *et al.*, 1997a) e o feijão de corda (Melo *et al.*, 1999), além de outras famílias vegetais (Marshall & Lauda, 1975). Estes são divididos em Lectin-like, Knottin-type, Cereal-type, Kunitz-like, Thaumatin-like e  $\gamma$ -Purothionins-like e inibidores bifuncionais (Franco *et al.*, 2000).

A classe mais estudada de inibidores de  $\alpha$ -amilases é a Lectin-like. Podem ser obtidos a partir de diferentes variedades e acessos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) como: feijão branco, preto e vermelho. Duas isoformas já foram bem caracterizadas, molecular e bioquimicamente. O  $\alpha$ -AI1 e o  $\alpha$ -AI2, apesar de 78 % de identidade em aminoácidos (Figura 2), possuem características diferentes quanto a sua atividade inibitória, onde o primeiro inibe  $\alpha$ -amilase pancreática de porco (PPA),  $\alpha$ -amilase salivar humana (HSA) e as  $\alpha$ -amilases dos bruquídeos *Calosobruchus maculatus* e *C. chinenses* (CMA, CSA) (Ishimoto & Kitamura, 1989). O segundo inibidor,  $\alpha$ -AI2, inibe as  $\alpha$ -amilases do inseto-praga *Zabrotes subfasciatus*, mas não possui atividade contra as  $\alpha$ -amilases de mamíferos (Ishimoto & Chrispeels, 1996; Suzuki *et al.*, 1993; Grossi de Sá *et al.*, 1997a,b). A especificidade da atividade inibitória do  $\alpha$ -AI1 foi detalhadamente estudada demonstrando a inibição de  $\alpha$ -amilases de coleópteros, dípteros, himenópteros e lepidópteros. As  $\alpha$ -amilases de alguns insetos pertencentes a estas ordens não foram inibidas, como as dos insetos *Sithophilus granasius*, *Manduca sexta*, do caruncho do feijão *Acanthoscelides obtectus*, (Kluh, *et al.*, 2005), *Zabrotes subfasciatus* (Grossi de Sa, *et al.*, 1997a) e *Anthonomus grandis* (Oliveira-Neto *et al.*, 2003). Estes inibidores

são processados para a forma ativa por meio de modificações pós-traducionais, como clivagem proteolítica e glicosilações (Young *et al.*, 1995, 1999), originando duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , com 7,8 e 14 kDa, respectivamente, (Yamaguchi, 1993) que formam uma estrutura heterotetramérica com 2 cadeias  $\alpha$  e 2 cadeias  $\beta$  (Kasahara & Yamaguchi, 1996; Nakaguchi & Yamaguchi, 1997). Análises estruturais do complexo do  $\alpha$ -AII com a  $\alpha$ -amilase do inseto *Tenebrio molitor* (TMA) demonstraram que dois *loops* se inserem no sítio ativo (resíduos 29-46 e 171-189) impedindo a ligação do substrato, lá são estabelecidas várias pontes de hidrogênio com os resíduos do sítio de ligação ao substrato. Os resíduos Tyr186 e Tyr37 se ligam fortemente aos resíduos da fenda catalítica. A comparação do complexo  $\alpha$ -AI/TMA com o complexo  $\alpha$ -AI/PPA, demonstrou que as interações com os resíduos da fenda catalítica são conservadas e poucas modificações ocorrem nas interações proteína-proteína (Bompard-Gilles *et al.*, 1996; Nahoum *et al.*, 1998, Silva *et al.*, 2000, 2004).

```

A11 1  -ATETSFIIDAFNKTNLILQGDATVSSNGNLQLSYNSYDSMSRAFYSAPIQIRDSTTGNV  59
A12 1  -ASDTSFNFYSFNETNLILQGDATVSSKGYLQL--HTVDSMCSAFYSAPIQIRDSTTGNV  57

A11 60  ASFDTNFTMNIRTHRQANSVGLDFVLPVQPKSGDVTVEFDTFLSRISIDVNN-DIK  118
A12 58  ASFDTNFTMNIITTOREANSVIGLDFALVPVQPKSGHTVTVQFDTFRSRISIDVNNNDIK  117

A11 119 SVPWDVHDYDQNAEVRITYNSSTKVFVSLSNPSTGKSNNVSTTVELEKEVYDWSVGF  178
A12 118 SVPWDEQDYDQNAKVRITYNSSTKVLAVSLSNPSTGKSNEVSARMEVEKELDDWVRVGF  177

A11 179 SATSGAYQWSYETHDVLWSFSSKFINLRDQKRSERSNIVLNKIL  222
A12 178 SAISGVHEYSFETRDVLSWSFSSKFS--QHTTSERSNILLNNIL  219

```

**Figura 2:** Alinhamento múltiplo de seqüências dos inibidores de  $\alpha$ -amilase 1 ( $\alpha$ -A11) e 2 ( $\alpha$ -A12) de feijão comum. Os aminoácidos deferentes estão destacados em azul e em vermelho. Os resíduos sublinhados compõem os *loops* N-terminal e C-terminal, respectivamente. Alinhamento realizado com o programa CLUSTAL-W (1.82) multiple sequence alignment.

## 1.6 Plantas transgênicas e o controle de pragas e patógenos

As perdas agronômicas causadas por insetos-praga e patógenos são significativamente importantes (Gatehouse *et al.*, 1992). Os insetos são considerados um dos maiores responsáveis por estes prejuízos (Oerke *et al.*, 1994). Estes se alimentam das plantas e podem ser vetores de diversos patógenos. As perdas são reduzidas com a aplicação de grandes quantidades de pesticidas e fungicidas. Se medidas de controle adequadas não forem empregadas, os prejuízos podem alcançar

quase a totalidade da produção em algumas culturas (Oerke *et al.*, 1994). A utilização de agroquímicos movimenta cerca de 10 bilhões de dólares anuais. Apesar de eficiente, este método é bastante contestado por ser oneroso e por utilizar recursos não renováveis, além de contaminar o meio ambiente. Alternativamente ao uso de pesticidas e fungicidas, em programas de manejo integrado de pragas, pode-se explorar a utilização de biopesticidas. Por exemplo, no Brasil, há o maior programa de controle biológico do mundo onde nucleopoliedrovírus é usado no controle efetivo da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (AgVPN) (Moscardi *et al.*, 1998). A bactéria gram-positiva *Bacillus thuringiensis*, que produz proteínas em inclusões cristalinas com atividade entomopatogênica, também é um biopesticida muito utilizado (Feitelson *et al.*, 1992). O método de melhoramento convencional também é uma alternativa ao uso de insumos químicos. O cruzamento de plantas selvagens com alguma característica de interesse (resistência a estresse biótico, abiótico ou maior produtividade) com plantas cultivadas pode gerar novas variedades com as características desejadas. A principal restrição deste método é o tempo necessário para que as plantas completem seu ciclo de vida gerando progênies com as características desejadas e também a quantidade de fontes de resistência com capacidade de intercruzamento (Hilder e Boulter, 1999). Além destes métodos, a manipulação gênica utilizando técnicas de biologia molecular tem possibilitado a transferência de genes entre espécies independentemente da capacidade de intercruzamento. Esta pode introduzir um conjunto de genes relacionados ou diferentes, reduzindo o tempo necessário para introduzi-los no genoma desejado.

O primeiro registro sobre plantas transgênicas data de 1984 (Hilder e Boulter, 1999), onde plantas de fumo foram transformadas com gene *npt* que as tornaram resistentes a canamicina. Atualmente, várias plantas estão sendo manipuladas geneticamente por meio de técnicas de engenharia genética visando a transgenia. Esta estratégia tem atraído muitos investidores devido ao potencial econômico para o controle de insetos-praga e patógenos.

Várias espécies de plantas já foram transformadas com genes exógenos que conferiram alguma característica ou resistência para algum organismo-alvo. A bactéria do solo *B. thuringiensis* produz, durante a fase de esporulação, corpos protéicos em forma de cristais que possuem atividade contra insetos, que são denominadas  $\delta$ -endotoxinas. Estas são classificadas em 24 grupos e possuem distinta especificidade para diversas ordens de insetos. Inicialmente, plantas de tomate e tabaco transformadas

com genes de  $\delta$ -endotoxinas de Bt modificadas foram resistentes a insetos. Estudos preliminares para avaliação do efeito das plantas expressando toxinas Bt em campo demonstraram que tabaco, batata, algodão, milho, arroz e tomate foram resistentes a insetos quando produziam estas toxinas (Hilder & Boudier, 1999). Atualmente, são encontradas para comercialização diversas outras plantas expressando toxinas específicas para determinados grupos de insetos. Por exemplo, milho transformado com o gene da toxina *cry1Ab* (Syngenta Bt176, Bt11; Monsanto Mon80100, Mon802, Mon809, Mon810), *cry1Ac* (Dekalb DBT418 (Bt Xtra™), *cry3Bb1* (Monsanto Mon863-5), *cry9C* (Avenis ACS-ZM4-3, StarLink™); batata transformada com o gene da toxina *cry3A* (Monsanto: 10 variedades com resistência para inseto e 6 variedades com resistência a inseto e vírus PVY e PLRV); algodão transformado com o gene da toxina *cry1Ac* (Monsanto, Mon531-Bollgard®, Mon15985-7 associado com gene *cry2B* (BollgardII®, Dow 3006, Calgene 31807), *cry1F* (Dow 281-23-236), estão disponíveis.

As proteínas envolvidas com os mecanismos de defesa vegetal também são empregadas para transformação de plantas para o controle de insetos-praga e patógenos. Genes de inibidores de proteinases e  $\alpha$ -amilases, defensinas, osmotinas, lectinas, quitinases, e outras proteínas, já foram utilizados em transformação de plantas para controlar um patógeno ou inseto-praga alvo. A expressão constitutiva das defensinas Rs-AFP 2, Spi1, DRR230-a e c, BSD1 em tabaco conferiu resistência contra os fungos *Alternaria longipes* (Terras *et al.*, 1995); *A. solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Verticilium dahliae* (Koike *et al.*, 2002); *Erwinia carotovora*, *Heterobasidion annosum* (Elfstrand *et al.*, 2001); *F. oxysporum*, *Asochyta pidodes*, *Trichoderma reesei*, *Aschochyta lentis*, *F. solani*, *Leptosphaeria maculans*, *A. pisi*, *A. alternata* (Lai *et al.*, 2002); *P. parasitica* (Kanzaki *et al.*, 2002). Em batata AlfAFP conferiu resistência ao fungo *Verticilium dahliae*, tanto em casa de vegetação como a campo (Gao *et al.*, 2000). Quando uma osmotina de tabaco foi expressa, os sintomas causados pelo fungo *Phytophthora infestans* foram reduzidos nas plantas de batata (Liu *et al.*, 1994). *Brassica napus* expressando o inibidor de proteinase do tipo cisteínica de arroz, orizacistatina I (OCI) inibiu o crescimento dos afídeos de ervilha (*Acyrtosiphon pisum*), de algodão (*Aphis Gossypii*) e de batata (*Myzus persicae*) (Rahbé *et al.*, 2003). Plantas de tabaco expressando o inibidor de tripsina de feijão de corda (CpTI), inibidor I e II de tomate e SKTI foram resistentes aos insetos *Heliothis virescens* e *H. zea*, *Manduca sexta* e *H. virescens*, respectivamente. Batata expressando



este mesmo inibidor foi resistente aos nematóides *Globodera pallida* e *Meloydogine incognita* (Jouanin *et al.*, 1998; Hilder e Boulter, 1999). Plantas de ervilha transformadas com o gene do inibidor de  $\alpha$ -amilase 1 de feijão comum ( $\alpha$ -AI1) foram resistentes aos bruquídeos *Callosobruchus maculatus* e *C. chinenses* (Shade *et al.*, 1994) e ao *Bruchus pisorum* que ataca as plantas de ervilha em campo (Shroeder *et al.*, 1995). Feijão azuki expressando este inibidor também foi resistente ao *C. chinenses*, principal praga desta cultura (Ishimoto *et al.*, 1996) e *chickpea* (*Cicer arietinum*) resistente ao *C. maculatus* (Ignacimuthu & Prakash, 2006). Contudo, o  $\alpha$ -AI2 não conferiu resistência à plantas de ervilha contra a sua respectiva praga, apenas retardando o desenvolvimento do inseto em aproximadamente um mês. Entretanto, sementes de ervilha expressando  $\alpha$ -AI 2 utilizadas em bioensaios geraram resistência ao bruquídeo *Zabrotes subfasciatus* (Grossi-de-Sa *et al.*, 1997b). Aditivamente, plantas de feijão azuki expressando o  $\alpha$ -AI2 em sementes impediram completamente a eclosão de adultos do inseto *C. chinenses*, ainda, também foram efetivas no controle do *Z. subfasciatus* (Nishizawa *et al.*, 2006). A modificação genética de plantas visando expressar proteínas para o controle de patógenos e insetos-praga é uma abordagem potencialmente viável, uma alternativa ao uso excessivo de inseticidas e pesticidas.

### **1.7 Evolução Molecular de Proteínas e sua Aplicação na Agricultura**

A prospecção de genes de proteínas de resistência contra pragas e patógenos com especificidade elevada tem sido de suma importância para a disponibilização de moléculas que contribuem com a redução dos danos gerados as plantas cultivadas. Novas proteínas estão constantemente sendo caracterizadas contra os diversos organismos alvo para a determinação do grau de toxicidade e especificidade. Além da busca de moléculas com estas características na natureza, o emprego de técnicas de evolução molecular *in vitro* constitui uma via alternativa para a obtenção destas proteínas.

Nas questões relacionadas a interação planta/insetos-praga o conhecimento atual sobre a estrutura de proteínas inseticidas ainda não é suficiente para o desenho racional de moléculas com maior ou nova atividade/especificidade para o inseto alvo. Uma alternativa para produção de novas moléculas *in vitro* é a utilização de técnicas de

evolução direcionada. Entre as técnicas mais utilizadas para geração de variabilidade podemos destacar DNA *shuffling*, mutagenese sítio-dirigida, PCR tendente a erro, utilização de oligonucleotídeos degenerados em regiões específicas, e outros (Yuan *et al.* & Keenan, 2005). No entanto, após a recombinação e geração de variabilidade o sucesso da utilização desta estratégia está diretamente relacionada a escolha de um eficiente sistema para a seleção dos novos genes: por exemplo *Phage Display*, exposição em superfície bacteriana ou de levedura, ou seja, a combinação a um método de seleção apropriado e análise dos variantes selecionados é crucial para a obtenção das novas proteínas com atividade potencializada ou inovada (Lewin & Weiss, 2005). A combinação de DNA *shuffling* e *Phage Display* possibilita a criação de bibliotecas com milhares de moléculas variantes e permite a seleção de proteínas com atividades específicas. Dentre as técnicas mutacionais, DNA *shuffling* é uma das que possibilita a geração de variantes por meio de mutações em blocos ou pontuais na seqüência de DNA. A técnica originalmente proposta consiste na digestão de um gene ou de uma família de genes homólogos com *Dnase I* (ou enzimas de restrição), os fragmentos liberados são submetidos a ciclos de PCR sem a adição de iniciadores, após, o produto deste PCR é usado como molde numa segunda reação com a adição de iniciadores e fragmentos com o tamanho do gene original são recuperados (Stemmer, 1994). Assim, é possível obter bibliotecas combinatórias de seqüências gênicas altamente variáveis. Como demonstrado com o DNA *shuffling* do gene de uma galactosidade bacteriana combinado com a seleção por substrato permitindo a seleção de uma enzima com atividade fucosidásica com atividade 20 vezes maior que a enzima parental (Zhang *et al.*, 1997). A toxina Cry1Ac apresentada na superfície de fagos foi ativa, similarmente a toxina selvagem, contra *M. sexta* (Vilchez, *et al.*, 2004), inibidores de tripsina ativos contra afídeos foram selecionados a partir de biblioteca combinatória do tipo *Phage Display* (Ceci *et al.*, 2003) e cistatinas específicas com o *loop 1* mutado (de QVVAG para NTSSA e DVVSA) foram selecionadas para proteinases do tipo cisteínica do bruquídeo do feijão comum *A. obtectus* (Melo *et al.*, 2003).

Neste trabalho, uma biblioteca combinatória do tipo *Phage Display* foi utilizada para seleção de inibidores de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AI) contra  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro, *A. grandis*. Esta foi construída após a mistura e digestão dos genes dos inibidores  $\alpha$ -AI1 e  $\alpha$ -AI2 de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) com *Dnase I*, seguido da PCRs conforme descrito por Stemmer (1994). Após a segunda PCR os fragmentos

recuperados foram clonados no fagomídeo pCOMB3x (Barbas III *et al.*, 2001). Este possibilitou que os variantes de  $\alpha$ -AIs fossem expressos em fusão com a proteína pIII do capsídeo viral e apresentados na superfície dos fagos. A biblioteca com variantes de  $\alpha$ -AIs encontra-se disponível para seleção de genes variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases com afinidade para  $\alpha$ -amilases de interesse. Desta forma, espera-se novas que moléculas ativas contra proteínas alvo possam ser geradas para programas de melhoramento de plantas via transgenia, aplicações na indústria ou em estudos clínicos.

## **2. Objetivo Geral**

O presente trabalho teve como objetivo selecionar mutantes para inibidores de  $\alpha$ -amilases com atividade para as  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro.

## 2.1 Objetivos específicos

1. Preparação de uma fração de  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro (AGA) enriquecida;
2. Expressar uma  $\alpha$ -amilase do bicudo do algodoeiro, *Amylag2*, em *Pichia pastoris*;
3. Selecionar variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AIs) com afinidade para  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro, utilizando uma biblioteca combinatória de  $\alpha$ -AIs do tipo Phage Display;
4. Caracterizar os  $\alpha$ -AIs selecionados;
5. Transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* com os genes variantes dos  $\alpha$ -AIs com afinidade para AGA;
6. Avaliar a atividade *in vitro* de variantes de  $\alpha$ -AIs selecionados contra AGA.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Purificação de $\alpha$ -amilases intestinais do bicudo do algodoeiro (AGA)**

O objetivo da purificação de  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro foi obter  $\alpha$ -amilases para serem utilizadas na seleção de inibidores de  $\alpha$ -amilases variantes, partindo de uma biblioteca combinatória de  $\alpha$ -AIs. Os variantes selecionados por apresentarem afinidade para as  $\alpha$ -amilases do inseto foram caracterizadas pelos ensaios de atividade inibitória utilizando uma  $\alpha$ -amilase do inseto produzida na levedura *Pichia pastoris*.

##### **3.1.1 Extração de $\alpha$ -amilases de Larvas do Bicudo do Algodoeiro**

Cinquenta larvas do terceiro instar cultivadas em dieta artificial (Monnerat *et al.*, 2000), foram maceradas em 500  $\mu$ L de solução de extração (10  $\mu$ M de E-64 e 5  $\mu$ g/mL pepstatina A), centrifugadas a 10,000 g, 4 °C, 30 min. O sobrenadante foi coletado e a separação do tecido remanescente do material solubilizado foi realizada utilizando-se filtro de 0.45  $\mu$ m. O extrato total foi quantificado de acordo com o método descrito por Bradford (1976).

##### **3.1.2 Purificação de AGA em Cromatografia Hidrofóbica**

Para purificar as  $\alpha$ -amilases intestinais do bicudo do algodoeiro (AGA), o extrato total de larva foi submetido a cromatografia hidrofóbica utilizando Phenyl Sepharose CL 4B<sup>®</sup> Amersham. Em uma coluna (10x1,5 cm, empacotada com 4 mL de resina) pré-equilibrada com tampão E (10 mM de imidazole pH 6.0, 1 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) foi aplicado 14,3 mg de extrato protéico. A coluna foi lavada com 30 mL de tampão E para retirada das proteínas que não se ligaram a resina. As proteínas adsorvidas à resina

foram eluídas com 60 mL de um gradiente linear de 1M de sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) a 0 M. Finalmente, 30 mL de tampão EI (10 mM de imidazole pH 6.0) foi aplicado a coluna. Frações de 1 mL foram coletadas em um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. As frações coletadas foram monitoradas pela absorbância a 280 nm ( $\text{ABS}_{280 \text{ nm}}$ ).

### **3.1.3 Ensaio de Atividade Amilolítica**

Para detecção das frações com atividade amilolítica, 2 µL de cada amostra (frações) foi incubado por 30 min a temperatura ambiente (25 °C) com 68 µL de tampão de ensaio (50 mM de fosfato de sódio pH 5.8, 200 mM de NaCl, 0.1 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) e 30 µL de solução de amido 0.125 % (p/v) solubilizado no mesmo tampão. A reação foi finalizada pela adição de 140 µL de solução de iodo (0.01 % de tintura de iodo comercial, 125 mM de HCl) e a absorbância foi determinada em leitor de microplaca a 630 nm (Fuwa, 1953).

As frações apresentando atividade amilolítica foram reunidas e dialisadas contra água, em membrana de 6,3 mwco, por 24 horas e posteriormente liofilizadas em alíquotas de 50 µg.

### **3.1.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) Desnaturante e Zimograma para Detecção de Atividade Amilolítica**

A pureza da AGA foi analisada utilizando SDS-PAGE 12% a temperatura ambiente de acordo com Laemmli (1970) aplicando 20 µg do pico ativo dissolvido em tampão de amostra (50 mM de Tris-HCl pH 6.8, SDS 8.2% (p/v), sacarose 2% (p/v), azul de bromofenol 0.001% (p/v)). A visualização das bandas protéicas foi obtida por coloração em solução de Coomassie Brilliant Blue 0.1% (p/v) em 25% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético. Para o zimograma foram utilizados 15 µg do mesmo pico, aplicados em SDS-PAGE 12% contendo amido 0.5% segundo Campos (1989) com algumas modificações: a eletroforese foi realizada a 4 °C, 100 V durante a corrida do gel concentrador e 200 V durante a corrida do gel separador. Após a migração da amostra, o gel foi incubado por 1 hora em solução de Triton-X 100 2.5% (v/v) à

temperatura ambiente para renaturação das  $\alpha$ -amilases. Então, foi incubado por 4 horas a 37 °C no tampão de ensaio (descrito no item 3.1.3) e posteriormente corado em solução de iodo para detecção das bandas com atividade amilolítica.

### 3.2 Expressão de *Amylag2* em *P. pastoris*

Visando avaliar a atividade inibitória das moléculas recombinantes selecionadas a partir da biblioteca combinatória de  $\alpha$ -AIs, um dos genes de  $\alpha$ -amilase, *Amylag2* (código de acesso NCBI: AF527877), clonado a partir de RNA total de larva de bicudo do algodoeiro (Oliveira-Neto *et al.*, 2003), foi sub-clonado no plasmídeo (pPIC9) para expressão em levedura, *P. pastoris*. Inicialmente, o gene foi amplificado por PCR usando iniciadores para inserção dos sítios para *Sna*BI (Agamil2 Mad= 5' CGT ACG TAC AAA AAA ATC3') e *Not*I (Agamil2 end= 5' TTG CGG CCG CCT AAG ATA ATT TTG 3'), na posição 5' e 3', respectivamente. Na reação foram utilizados 300 nM dos iniciadores, 240  $\mu$ M deoxinucleotídeos (dNTPs), tampão da polimerase @ (Invitrogen) na concentração final de 1x e 2,5 unidades de taq DNA polimerase @ (Invitrogen). O volume final da reação foi de 50  $\mu$ L. As condições utilizadas para amplificação foram 94° C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 45 segundos à 94 °C, 45 segundos à 58 °C , 45 segundos à 72 °C, com a extensão final à 72 °C por 5 minutos. O produto da amplificação foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e os fragmento com aproximadamente 1500 pb foi purificado da matriz de agarose utilizando o kit GENE CLEAN II @ (Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante. Na reação para ligação do gene *Amylag2* no plasmídeo pGEM-T *easy* foram utilizados 30 ng do inserto, 45 ng do plasmídeo, 1 U de T4 DNA ligase, foi incubada em banho de água gelada (14 a 16 °C) por aproximadamente 16 hs, dialisada contra água e usada na transformação de células competente de *Escherichia coli* (XL-1 *Blue*), via eletroporação. Os transformantes selecionados em meio LB sólido contendo ampicilina 100  $\mu$ g/mL resultantes da transformação foram crescidos meio LB líquido com ampicilina 100  $\mu$ g/mL por 16 hs à 37 °C. O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) e a presença do gene foi confirmada após a digestão utilizando a enzima *Eco*RI. A digestão foi analisada em eletroforese em gel de agarose 0,8%.



Um clone positivo, que liberou o fragmento de aproximadamente 1,5 kb, foi digerido com *Sna*BI e após com *Not*I, assim como o plasmídeo pPIC9, seguindo as instruções do fornecedor das enzimas. Este também foi seqüenciado utilizando o iniciador SP6 confirmando a presença do gene *Amylag2* no plasmídeo pGEM-T easy. Para cada ug de DNA foi adicionada 1 unidade de enzima de restrição e incubada à 37 °C no seu respectivo tampão. O DNA digerido foi analisado em gel de agarose 0,8%, os fragmentos de 1,5 kb (*Amylag2*) e 8 kb (pPIC9) foram purificados da matriz de agarose. A relação molar utilizada na reação de ligação foi 3:1 (28 ng da *Amylag2* e 50 ng do pPIC9). Células eletrocompetentes de *E. coli* (XL1-Blue) foram transformadas e as colônias resistentes a ampicilina (100 µg/mL) foram analisadas. O DNA dos clones foi digerido com *Sna*BI e *Not*I e analisados em gel de agarose 0,8%. Clones positivos liberaram o fragmento de aproximadamente 1,5 kb correspondente ao gene de *Amylag2*.

Para a transformação de *P. pastoris* com a construção *Amylag2*/pPIC9, 60 µg de DNA de um clone positivo foi digerido com *Bgl*II, precipitado e usado na transformação de células competentes de *P. Pastoris*, linhagem GS115. Esta foi semeada em placas contendo meio MM (1.34% de YNB, 4x10<sup>-5</sup>% de biotina e 1% de metanol) e incubadas à 30 °C até o surgimento das colônias. O DNA das colônias crescidas em meio MM foi extraído e analisado por PCR. Os iniciadores utilizados anelam da região do promotor e do terminador AOX1 do plasmídeo pPIC9. Colônias positivas (que amplificaram fragmentos de aproximadamente 2 kb) foram semeadas em meio BMM ( meio MM tamponado com fosfato de potássio 100 mM, pH6.0) sólido contendo 1% de amido, crescidas à 30 °C e suplementadas com metanol durante 4 dias. Após, a placa foi incubada com tampão para atividade amilásica (item 3.1.3) por 1 hora à 25°C e coradas com solução de iodina (item 3.1.3). Clones que exibiram halos ao seu redor foram selecionados para expressão em meio líquido.

Para a obtenção de biomassa celular de *P. pastoris* para expressão de *Amylag2*, 100 µL do pré-inoculo, crescido em meio YPD ( 1% de Extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose) por 16 horas à 30 °C, 200 rpm, foi adicionado a 100 mL de meio BMG (1.34% de YNB, 4x10<sup>-5</sup>% de biotina e 1% de glicerol e fosfato de potássio 100 mM, pH 6.0). Os inóculos foram crescidos até atingirem OD<sub>600nm</sub> entre 2-6, o que ocorreu após aproximadamente 30 horas. Foram centrifugados a 1500 g, 10 minutos, os sedimentos foram lavados com água estéril e ressuspendidos em 10 mL de meio BMM (meio BMG sem glicerol) com 1% de metanol, e foram incubados à 30°C, 200 rpm por

seis dias, sendo que a cada 24 horas alíquotas foram retiradas para monitoramento da OD<sub>600nm</sub>, atividade amilásica e concentração de proteína. O clone que expressou a AMYLAG2 em maior quantidade foi usado no experimento de expressão em larga escala (dez vezes maior que a expressão inicial).

### **3.3 Seleção de genes variantes para inibidores de $\alpha$ -amilases com afinidade para AGA**

#### **3.3.1 Re-amplificação da Biblioteca Combinatória de inibidores de $\alpha$ -amilases**

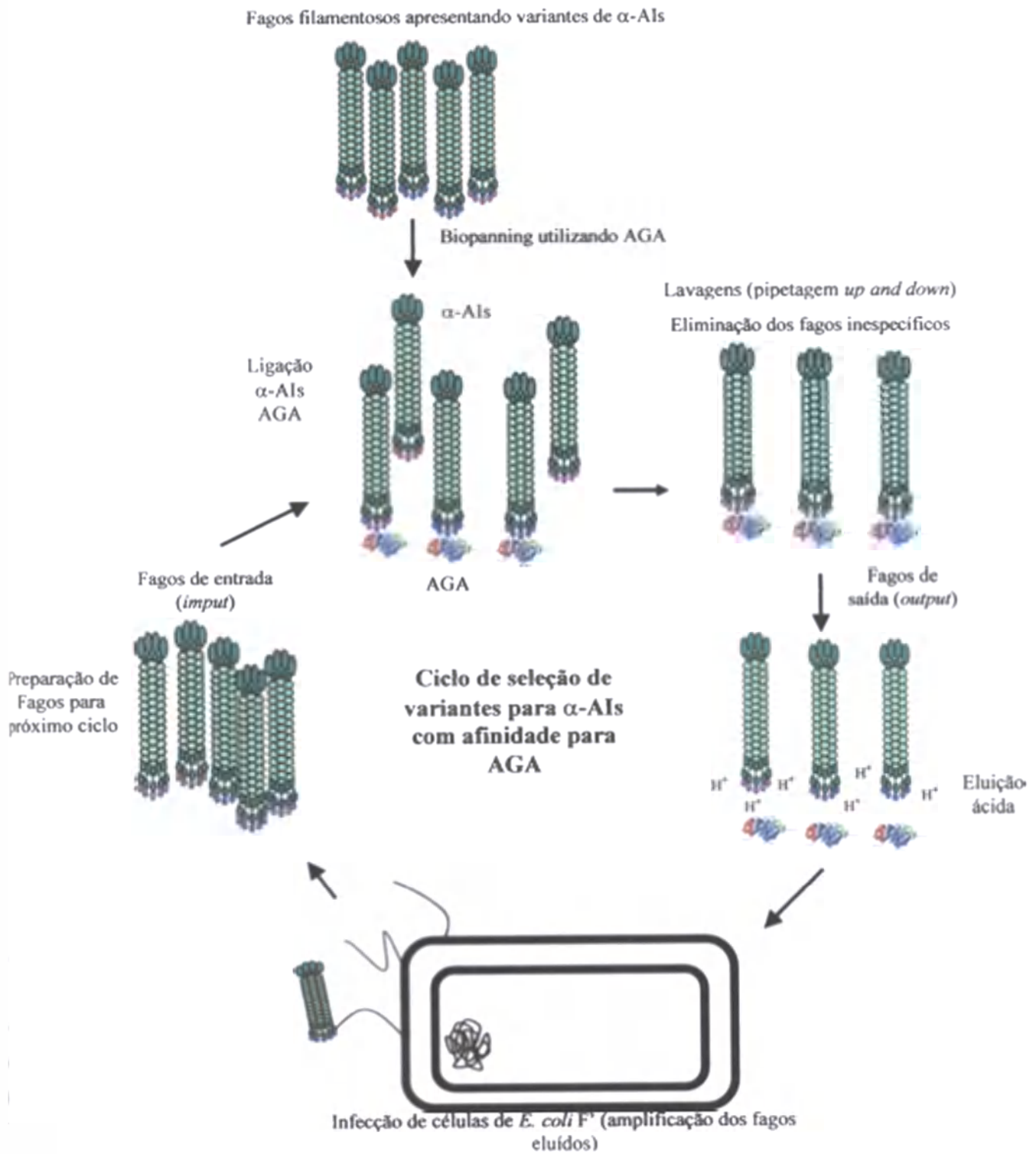
A biblioteca combinatória de mutantes de inibidores de  $\alpha$ -amilase construída pela equipe do laboratório de Interação Molecular Planta-Praga da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foi re-amplificada para utilização na seleção de novos inibidores de  $\alpha$ -amilase com afinidade para a AGA. Este procedimento possibilitou que a quantidade de fagos apresentando os mutantes na sua superfície fosse aumentada para se iniciar os procedimentos de seleção.

A preparação de DNA da biblioteca combinatória de inibidores de  $\alpha$ -amilase, construída pela aplicação da técnica de DNA *shuffling* aos genes dos  $\alpha$ -AI1 e  $\alpha$ -AI2 de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), foi utilizada para transformar, via eletroporação, células de *E. coli* linhagem XL-1 *Blue* com competência de  $10^7$ . Ao cultivo de bactérias adicionou-se o fago auxiliar VCSM13 ( $10^{14}$ - $10^{13}$  ufc/mL) resultando numa biblioteca com  $2,6 \times 10^8$  variantes para inibidores de  $\alpha$ -amilase expressos no capsídeo viral fusionados a proteína pIII (*Phage Display*). Os fagos foram então precipitados com PEG/NaCl (PEG 8000 20 %, NaCl 2.5 M), solubilizados em BSA 1% (p/v). Esta preparação de fagos foi utilizada no procedimento de seleção (Barbas III *et al.*, 2001).

### 3.3.2 Procedimento de Seleção de genes variantes para inibidores de $\alpha$ -amilases utilizando AGA (*Biopanning*)

O procedimento de *biopanning*, conforme discutido por Barbas III *et al.* (2001) consiste de vários ciclos de ligação dos fagos, apresentando os inibidores de  $\alpha$ -amilases em suas superfícies, à enzima alvo imobilizada (em placa de ELISA), seguido de um número crescente de lavagens possibilitando a eliminação dos fagos ligados inespecificamente, eluição ácida dos fagos com maior afinidade e finalmente a re-amplificação destes.

Na seleção realizada neste estudo foram utilizados dois poços da placa de ELISA contendo 50  $\mu$ g de uma fração enriquecida AGA (Barbas III *et al.*, 2001). Em cada poço foi adicionado 150  $\mu$ L de BSA 3% em TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) para bloquear as ligações inespecíficas na superfície dos poços. Após uma hora de incubação à 37 °C, os poços foram lavados três vezes com 150  $\mu$ L de PBS-T (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, pH 7.4, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM contendo 0,1% de Tween 20). Adicionou-se 100  $\mu$ L da preparação de fago, proveniente da re-amplificação da biblioteca ou da amplificação do ciclo anterior de seleção, em solução de BSA 1% (p/v). Então, incubou-se a placa por uma hora à 37 °C. Após a incubação, os poços foram lavados vigorosamente (5 vezes no primeiro ciclo, e em cada ciclo o n° de lavagens foi aumentado em duas vezes) com PBS-T para eliminação dos fagos não ligados. Os fagos que permaneceram ligados foram eluídos após a adição de 100  $\mu$ L de solução ácida (Glicina-HCl 0,1 M pH 2,2), e incubação por 10 min. Após vigorosa lavagem (utilizando pipetagem *up and down*) os fagos foram coletados e neutralizados com 24  $\mu$ L de solução de Tris base 2M. Uma alíquota desta preparação de fagos (106  $\mu$ L) foi utilizada para infectar 2 mL de cultivo de *E. coli* (XL-1 *Blue*) em fase *log* de crescimento para re-amplificação da população de fagos eluídos. O número de fagos eluídos e introduzidos em cada ciclo de seleção foi monitorado pela contagem de colônias bacterianas infectadas (unidade formadora de colônias – u.f.c.), usando plaqueamento em meio LB Agar (triptona 1% (p/v), extrato de levedura 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7.0, com adição de agar 1%, e esterilizado por autoclavagem) contendo 100  $\mu$ g/mL de carbenicilina, incubadas por 16 horas à 37 °C (Figura 3)



**Figura 3:** Representação esquemática do procedimento de *biopanning* para seleção de variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases com afinidade para AGA.

### 3.3.3 Análise da Expressão utilizando Imunodeteção (Dot Blot) dos variantes para inibidores de $\alpha$ -amilases

O DNA do precipitado de bactéria do ciclo de seleção que apresentou maior enriquecimento de fagos específicos foi extraído e usado para transformar *E. coli* Top 10 F', via choque térmico. O produto da transformação foi plaqueado em meio LB agar contendo ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e incubado por 16 horas à 37 °C. A integridade do gene foi inicialmente determinada pela análise do produto de PCR. Para expressar os inibidores de  $\alpha$ -amilases dos genes variantes selecionados, primeiramente 86 clones contendo o gene do tamanho original (660 pb) foram inoculados em 1 mL de meio 2 xYT (extrato de levedura 1%, peptona 1.6 %, NaCl 1%, pH 7.0, esterelizado por autoclavagem) contendo glicose 0,5 % e ampicilina 100 mg/mL em placa *deep well*, incubados por 16 horas à 37 °C sob agitação de 220 rpm. Posteriormente, 10  $\mu\text{L}$  deste pré-inoculo foi adicionado a 1 mL de meio SB (MOPS 1% (p/v), triptona 3% (p/v), extrato de levedura 2% (p/v), pH 7.0 e esterilizado por autoclavagem) contendo ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  incubado à 37 °C, sob agitação de 220 rpm até a O.D.<sub>600nm</sub> atingir o valor entre 0.6-0.8, quando então, foi adicionado IPTG para concentração final de 1 mM. Esse cultivo foi incubado por 12 horas à 30 °C sob agitação de 220 rpm e o sobrenadante foi coletado após centrifugação à 2,054 g, 4 °C por 5 min.

Para analisar o produto da expressão das proteínas heterólogas, 5  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adsorvido a uma membrana de nitrocelulose (Hybond C<sup>®</sup> Amersham), a qual foi bloqueada com solução de BSA 3% em PBS, por 12 horas à 4 °C sob agitação constante. A membrana foi então incubada com o anticorpo primário anti-HA IgG produzido em coelho (diluído 1:1500 em PBS), por 2 horas à 37 °C, seguido pela incubação com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado com fosfatase alcalina (diluído 1:2000), por 1 hora à temperatura ambiente. A membrana foi lavada com PBS contendo Tween 20<sup>®</sup> 0.05% entre cada etapa de incubação com os anticorpos. Finalmente, a membrana foi lavada com a solução R (Tris 100 mM pH 9,5; Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM) e foi adicionado o substrato para revelação que consistia em uma pastilha de NBT-Nitro Blue Tetrazole, BCIP-5-Bromo-4-Cloroindolil-fosfato<sup>®</sup>- Roche, dissolvida em 10 ml de água milli-Q.

### **3.3.4 Seqüenciamento e Análises de Seqüências dos Genes Variantes para Inibidores de $\alpha$ -amilases**

Para evitar erros de seqüenciamento e obter seqüências com alta qualidade dos fagomídeos isolados, o DNA dos 31 clones que apresentaram forte sinal, comparável ao controle positivo (proteína com epítipo de HA, HD7), no imunodot foram usados para transformar *E. coli* XL 1-Blue, via choque térmico. Os 26 clones resultantes dessa transformação tiveram seu DNA extraído e a seqüência determinada utilizando seqüenciamento automático. O alinhamento das seqüências nucleotídicas dos genes variantes para inibidores de  $\alpha$ -amilases e dos genes parentais foram realizados no programa Clustal W disponível no servidor Expasy (<http://www.expasy.org>). Para tradução das seqüências nucleotídicas foi utilizado o programa Translate (<http://bo.expasy.org/tools/dna.html>). O estudo comparativo das seqüências recombinadas obtidas com as seqüências dos inibidores  $\alpha$ -AI1 e  $\alpha$ -AI2 parentais, possibilitou a identificação das regiões mutadas.

## **3.4. Transformação de *A. thaliana* com Genes Variantes para Inibidores de $\alpha$ -amilases utilizando o método de Imersão do Botão Floral**

### **3.4.1 Sub-Clonagem dos Genes Variantes para Inibidores de $\alpha$ -amilases em Plasmídeo para Expressão em Planta (pC2300)**

O plasmídeo pCAMBIA2300 (série pCAMBIA, Camberra, Austrália) foi modificado para sub-clonagem de cinco genes variantes para inibidores de  $\alpha$ -amilases (C3, C11, G4, E11 e A11) por meio da inserção do cassete do pUC19 utilizando os sítios de restrição *Hind*III e *Eco*RI. Os genes foram sub-clonados sob o controle do promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor duplicado (CaMV35Sd) com o *enhancer* do vírus do mosaico da alfafa (AMV e o terminador NOS).

Os genes foram amplificados por PCR utilizando os iniciadores XMAI senso (5' CCC CCC GGG ATG GCT TCC TCC AAC TTA CTC TCC CTA GCC CTC TTCCTT GTG CTT CTC AAC CAC GCA AAC TCA GCC ACC GAA ACC TCC 3') e SACI

antisense (5' CCC GAG CTC TTA GAG GAT CTT GTT GAG GAC 3') que inseriram os sítios para as enzimas de restrição *Xma*I e *Sac*I, na posição 5' e 3', respectivamente. Nestas construções também foi inserido, a montante dos inibidores, o peptídeo sinal do  $\alpha$ -AI1. Na PCR, 200 ng dos genes (clonados no fagomídeo pCOMB3x) foram utilizados como molde, com acréscimo de 300 nM dos iniciadores, 240  $\mu$ M deoxinucleotídeos (dNTPs), tampão da polimerase® (Invitrogen) na concentração final de 1x e 2,5 unidades de taq DNA polimerase® (Invitrogen). O volume final da reação foi de 50  $\mu$ l. As condições utilizadas para amplificação foram 94° C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 45 segundos à 94 °C, 45 segundos à 50 °C , 45 segundos à 72 °C, com a extensão final à 72 °C por 5 minutos. A amplificação dos genes foi analisada em gel de agarose 1%. Os fragmentos de 741 pb, massa molecular aproximada dos genes parentais, foram purificados da matriz de agarose (descrito no item 3.1.5). A concentração de DNA foi determinada espectrofotometricamente com leitura da Absorbância à 260 nm. Posteriormente, o DNA dos genes variantes foi digerido com *Xma*I e *Sac*I, assim como o plasmídeo pCAMBIA2300. Para cada  $\mu$ g de DNA uma unidade enzimática foi usada na digestão à 37 °C. O produto da digestão foi purificado do gel de agarose (descrito no item 3.15) e 30 ng deste inserto utilizado na reação de ligação contendo 100 ng do plasmídeo e 1 unidade de T4 DNA ligase no tampão da enzima™ (Invitrogen). A reação foi mantida em banho de água gelada (14 a 16 °C) por um período de aproximadamente 16 hs. Após diálise contra água foi utilizada na transformação de células competentes de *E. coli* (XL-1 *Blue*), via eletroporação. As colônias resultantes foram analisadas por PCR e aquelas que amplificaram o fragmento do tamanho esperado tiveram o DNA plasmidial extraído pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) e digerido com *Xma*I e *Sac*I para confirmação da presença do inserto.

#### **3.4.2 Transformação de *A. thaliana* utilizando o Método de Imersão do Botão Floral**

Para a transformação de *A. thaliana* a linhagem GV3103(pMP90) (Koncz & Schell, 1986) de *Agrobacterium tumefaciens* foi transformada com o 1  $\mu$ g do DNA das construções contendo os variantes dos inibidores de  $\alpha$ -amilases. Colônias crescidas em

meio LB ágar com rifampicina (50 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL), foram analisadas por PCR e os transformantes positivos foram inoculados para preparação de solução utilizada na transformação de *A. thaliana* por meio do método de imersão do botão floral (Clough e Bent, 1998).

### 3.4.3 Produção de Plantas de *A. thaliana*

Sementes de *A. thaliana* ecótipo Columbia foram colocadas em tubos de 1.5 mL de polipropileno, embebidas em água destilada e mantidas à temperatura ambiente por 24hs. A quebra da dormência ocorreu após a incubação das mesmas à 4 °C por 48 horas. Sementes de *A. thaliana* foram germinadas em placas contendo meio MS 25% (Murashige & Skhoog - Sigma) com 0,6% de ágar. Este procedimento foi vantajoso para padronização do tamanho e idade das plantas utilizadas na transformação. As plântulas foram transplantadas para o substrato (bioplant) e mantidas em casa de vegetação. Após 3 a 4 semanas plantas saudáveis com 6-10 cm de altura com inflorescência totalmente fechada foram utilizadas para transformação.

Um clone positivo de *A. tumefaciens*, analisado por PCR, de cada construção foi inoculado em 3 mL de meio LB suplementado contendo 50 µg/mL dos antibióticos: Rifampicina, Gentamicina e Canamicina. A cultura foi incubada à 28 °C sob agitação de 200 rpm, por 12-16 horas. Este pré-inóculo foi diluído 1000 vezes em meio LB contendo 50 ug/mL de Canamicina e 50 ug/mL de Gentamicina e incubados sob agitação de 200 rpm à 28 °C até atingirem a O.D.<sub>600nm</sub> entre 0.8 a 1.5. Após centrifugação a 1500 g, por 20 minutos, os sedimentos foram ressuspensos em 150 mL de meio de infiltração para imersão dos botões florais (0,22% de sais MS, MES 0,5 M, 5 % de sacarose (p/v) e 0,2% de Silwet L-77, pH 5.7).

Os botões florais fechados de plantas de *A. thaliana* jovens (3-4 semanas) e vigorosas foram imersos durante 3 minutos na suspensão de *A. tumefaciens*. Três a cinco plantas foram utilizadas para a transformação de cada construção gênica. Em seguida, as plantas foram mantidas na posição horizontal em câmaras úmidas por 24 horas. Após o surgimento e desenvolvimento das vagens (sílicas), as plantas foram mantidas na ausência total de água para secagem e coleta das sementes maduras. As sementes coletadas foram desinfestadas após a incubação por 5 minutos em etanol 70% e 0,1% de



Triton X-100, secas e semeadas em meio MS 25%, 0,8% de ágar suplementado com canamicina 100 ug/mL. Após a quebra da dormência as placas foram transferidas para câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas/dia. Após 5-7 dias as plântulas resistentes a canamicina foram cuidadosamente transplantadas para solo e mantidas em casa de vegetação. Após o desenvolvimento das plantas, as folhas foram excisadas e o DNA extraído. Para extração do DNA uma folha foi macerada em 300 µL de tampão EB (Tris 200mM, EDTA 25mM, NaCl 250mM, SDS 0,5%), 100 µL de Clorofórmio foi adicionado e agitado fortemente por um minuto. Após centrifugação, a 11,000 g por 5 minutos, a fase aquosa (superior) foi transferida para novos tubos. O DNA foi precipitado com 200 µL de Isopropanol. O precipitado, foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspendido em 100 µL de água. Esta preparação de DNA foi utilizada na análise das plantas transformadas utilizando PCR (como descrito no item 4.1), utilizou-se 3 µl de DNA como molde e volume final de 15 µL.

#### **3.4.4 Análise da expressão em planta de *A. thaliana* utilizando *Western Blot* e Ensaio de Elisa**

Para obtenção do extrato protéico, 3 a 4 folhas de plantas crescidas a partir da germinação de sementes T2 foram maceradas em nitrogênio líquido e o pó foi solubilizado em 100 µL de tampão de extração (125mM de Tris HCl p.H. 8.8; 0.1% de SDS; 10% de glicerol e 50mM de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Após centrifugação (13.000 rpm por 10 minutos) o sobrenadante foi coletado.

Para realização do *Western blot*, 35µg de extrato de proteína (determinados pelo método de Bradford, 1976) foram separados em SDS-PAGE 15% (Laemmli, 1970) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C<sup>™</sup> Amersham). Esta membrana foi bloqueada em solução de gelatina 3% em TBS por 16 horas sob agitação a temperatura ambiente e incubada com o anticorpo primário anti-αAI-1 produzido em coelho (diluído 1:700 em TBS) durante 2 horas, a temperatura ambiente, sob agitação constante. Adicionou-se o anticorpo secundário IgG HRP (Bio Rad) produzido em coelho (diluído 1:1000 em gelatina 1% em TBS) e incubou-se por 2 horas, sob leve agitação em temperatura ambiente. A cada incubação a membrana foi lavada com TBS-Tween 0.02% (15 minutos a temperatura ambiente). As proteínas foram detectadas após

a adição da solução de revelação (mistura da Solução A: 3 mL de metanol gelado e 9 mg de HRP; com a Solução B: 15 mL de TBS e 12 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

No ensaio de ELISA, os poços de uma placa de microtitulação foram incubados com 150µg de cada extrato protéico durante 2 horas à 37°C. O extrato protéico foi descartado e os poços foram lavados quatro vezes utilizando uma solução contendo 0,3% de leite em pó; 0,05% de Tween-20 e 10% de PBS 10X. Foram adicionados 150 µL de solução bloqueadora (3% de leite em pó; 0,4% de EDTA 0.5M; 0,05µL de Tween-20 e 100% de PBS 1X, corrigido para pH 8.0) e incubados à 4°C por 16 horas com acréscimo de uma hora à 37°C. Os poços foram lavados, adicionou-se 100 µL do anticorpo primário anti-αAI-1 produzido em coelho (diluído 1:750 em PBS 1X) e a placa foi incubada à 37°C por 2 horas. Os poços foram novamente lavados e incubados com 100 µL do anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina produzido em coelho (diluído 1:5000 em PBS 1X) por duas horas à 37°C por 2 horas. Então, 150 µL de solução de revelação foi adicionado (1mg/mL de pNPP dissolvido em solução 1 M de dietanolamina, 0.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 9.8) após a lavagem dos poços. Após 45 minutos de reação a absorbância foi medida em 405nm. A quantificação por ELISA foi realizada com os extratos contendo os inibidores obtidos a partir da extração de proteínas de folhas de três plantas da geração T2. A concentração dos inibidores foi determinada pela comparação das absorbâncias obtidas com uma curva padrão do α-AI1 purificado.

### **3.5. Ensaio Inibitório de Atividade Amilásica *in vitro* contra α-amilases do bicudo do algodoeiro**

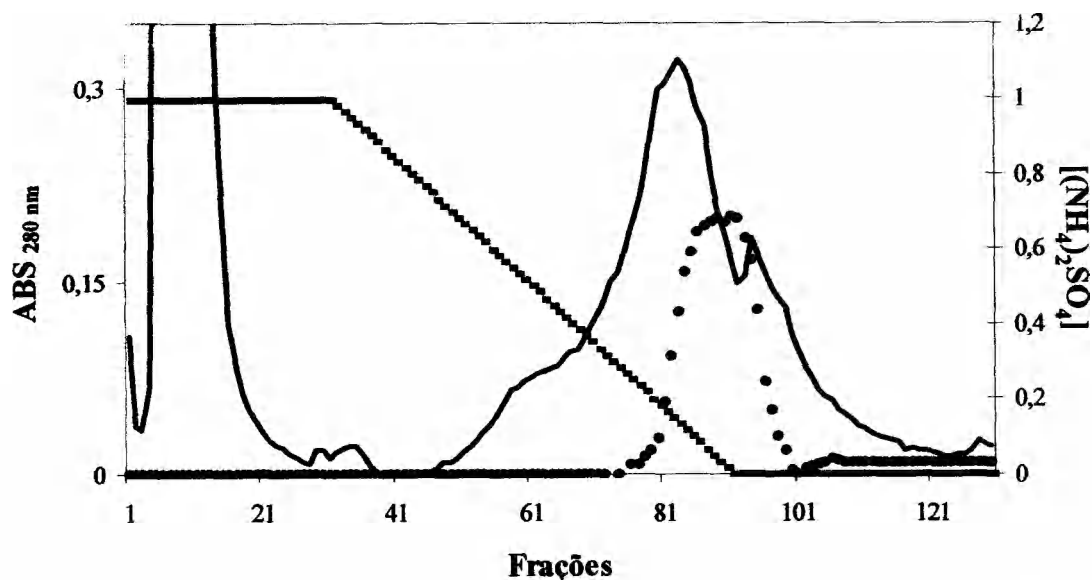
Para obtenção do extrato protéico, folhas de plantas das gerações T2 foram maceradas em tampão de extração (125mM de Tris HCl p.H. 8.8, 0,01% de SDS, 10% de Glicerol e 50mM de Metabisulfito de Sódio) na proporção de 1:1. Este extrato foi centrifugado a 13.000 rpm a 4°C durante 30 minutos e o sobrenadante foi coletado. Alternativamente, sementes da geração T2 foram maceradas, aproximadamente 25 µg, e submetidas a extração de proteínas com 500 µL de tampão de extração.

A detecção da atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase foi monitorada em de ensaios de atividade *in vitro* utilizando o método de DNS (Bernfeld, P. 1955). Foi utilizado 100  $\mu$ g de extrato protéico (determinados pelo método de Bradford, 1976) misturado com a enzima testada totalizando 50  $\mu$ L de reação. A quantidade de enzima utilizada foi a necessária para liberar 30  $\mu$ g de maltose, definida como uma unidade de atividade amilásica (UA) que corresponde ao aumento de 0,1 na OD<sub>550nm</sub>. A reação de inibição foi realizada à 37°C por 20 minutos. Em seguida foi adicionado 50  $\mu$ L de amido 1% e incubadas à 37°C durante 30 minutos. Foi adicionado 100  $\mu$ L de DNS e foram fervidas por 5 minutos. Um mL de água foi adicionado e a absorbância foi determinada à 550 nm. Para o ensaio com os extratos das sementes T2, foi utilizado 20  $\mu$ l do extrato total e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4. Resultados e Discussão**

##### **4.1 Purificação de $\alpha$ -amilases intestinais do bicudo do algodoeiro (AGA)**

O perfil da cromatografia hidrofóbica do extrato intestinal de larva de *A. grandis* mostrou dois picos principais (Figura 4). O primeiro pico correspondente às proteínas eluídas na concentração de 1 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e o segundo, com atividade amilolítica detectada nas frações 78 a 99, eluídas na faixa de 0,21667 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 0 M. Esta purificação foi realizada de acordo com a purificação de  $\alpha$ -amilases de *Z. subfasciatus* (Silva *et al.*, 1999). Na purificação de ZSA, umas das frações purificadas foi eluída na concentração de 0,3 M de sulfato de amônio, o que indica que as  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro possuem similar hidrofobicidade. Nesta, a maioria das  $\alpha$ -amilases foram separadas das  $\alpha$ -glucosidases durante as etapas de cromatografia (Silva *et al.*, 1999). Contudo, a atividade de  $\alpha$ -glucosidases não foi avaliada no caso da AGA. As frações apresentando atividade amilásica foram reunidas e extensivamente dialisadas contra água destilada e posteriormente concentradas a vácuo. O SDS-PAGE e o ensaio de atividade em gel do pico ativo é mostrado nas figuras 5a e 5b. A purificação das  $\alpha$ -amilases de bicudo foi obtida apenas parcialmente por meio da cromatografia hidrofóbica como mostrado na figura 3a.

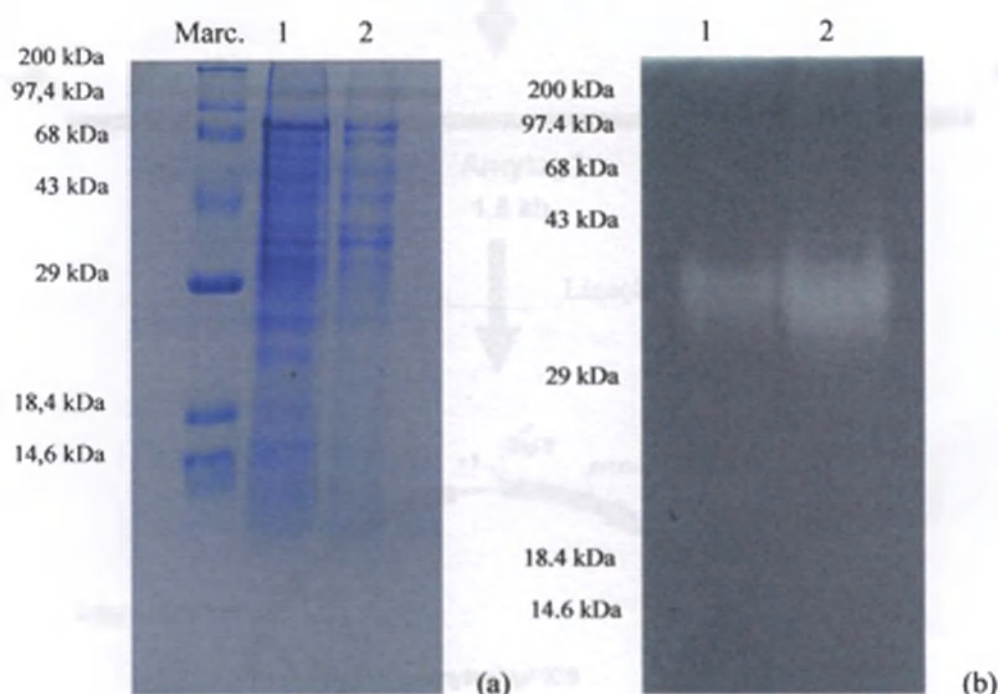


**Figura 4:** Cromatografia hidrofóbica de extrato de larva de *A. grandis* em *Phenyl Sepharose CL 4B*. Gradiente linear decrescente de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (-----). Absorvância à 280 nm (—). Frações ativas (\*\*\*\*\*).

#### 4.2 Expressão de *Amylag2* em *P. pastoris*

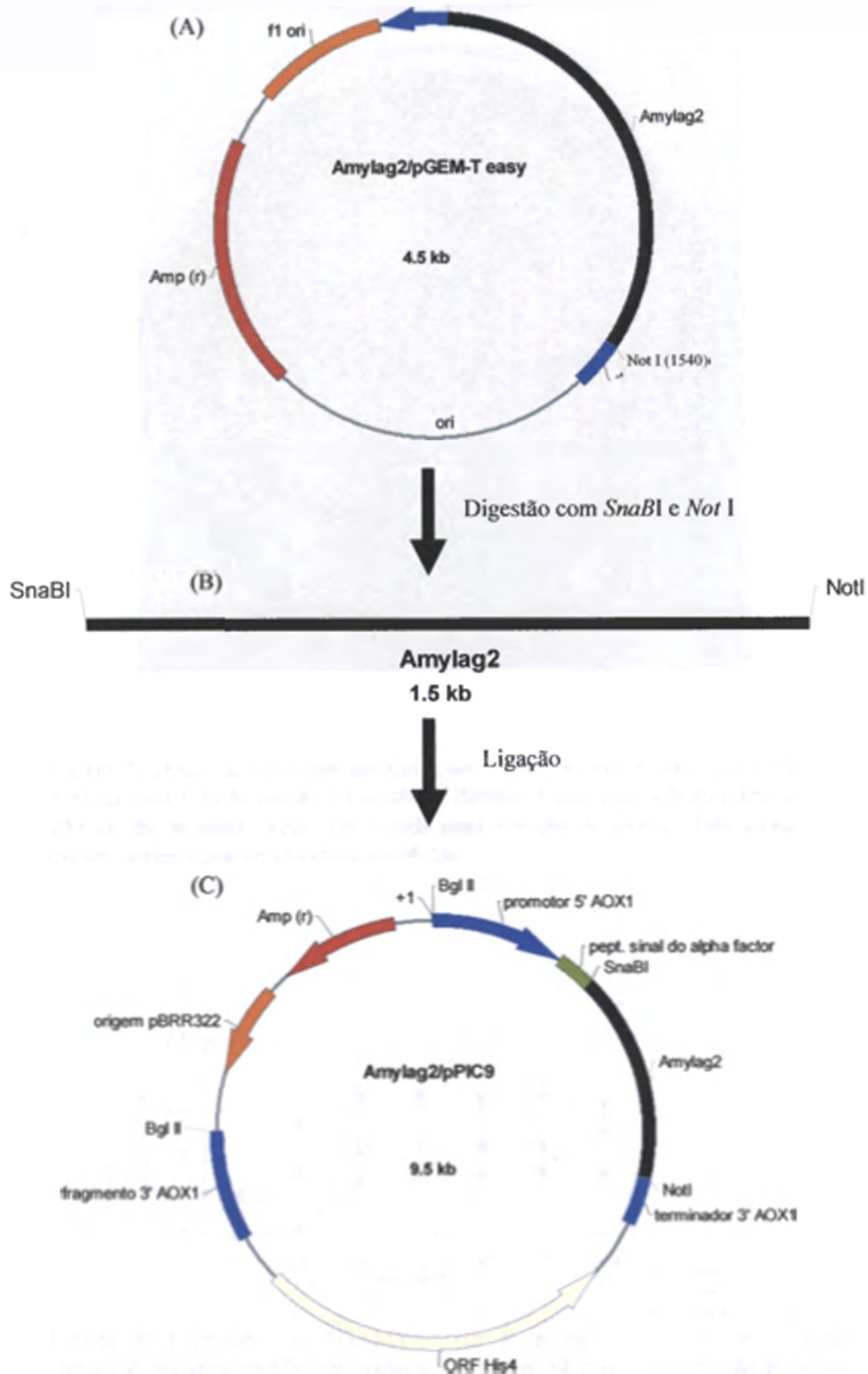
Várias proteínas já foram expressas com atividade em *P. pastoris*. Este sistema possibilita a realização de modificações pós-traducionais de eucariotos superiores, como O e N-glicosilações, processamento de peptídeo sinal, formação de pontes dissulfeto e dobramento adequado (Cereghino & Cregg, 2000). Para avaliar a atividade dos inibidores de  $\alpha$ -amilases selecionados, o gene *Amylag2* foi sub-clonado no plasmídeo pPIC9 para expressão na levedura *P. pastoris*. O gene foi amplificado por PCR e sub-clonado no plasmídeo pGEM-T *easy*. Esta construção foi digerida com *SnaBI* e *NotI* e o fragmento de aproximadamente 1,5 Kb foi ligado no plasmídeo pPIC9 linearizado com as mesmas enzimas (Figura 6). Este plasmídeo possui o peptídeo sinal do fator  $\alpha$  acasalamento de levedura a jusante do inserto possibilitando a secreção das proteínas recombinantes para o meio de cultura. Após a confirmação da presença do gene no plasmídeo, este foi linearizado e utilizado para transformação de *P. pastoris*. Dos clones analisados por PCR, 20 foram plaqueados em meio contendo amido 1%. Após a indução da *Amylag2* com metanol e ensaio de atividade amilásica em placa, três clones geraram fortes halos, indicando expressão de amilase ativa (figura 7). Estes três clones

foram usados em experimentos piloto de expressão (Figura 8). O nível máximo de atividade de AMYLAG2 foi detectado após 24 horas e 72 horas da indução. Após, a atividade manteve-se estável ou diminuiu em relação a quantidade de proteína secretada. No caso do clone 12, a atividade amilásica após 148 horas de expressão aumentou, contudo a atividade no tempo anterior (124 horas) é estatisticamente equivalente. A partir daí, o clone 5 foi escolhido para experimento de expressão em larga escala para produção de AMYLAG2 para ser testada com os inibidores de  $\alpha$ -amilases selecionados para AGA semi-purificada. Entretanto, a produção de AMYLAG2 em quantidade suficiente para o teste da atividade inibitória dos  $\alpha$ -AIs

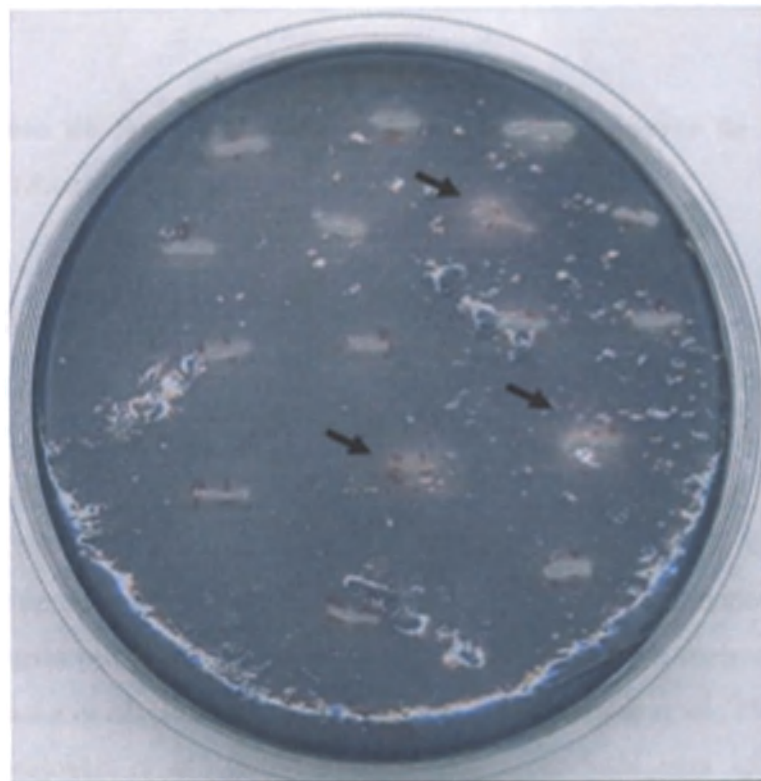


**Figura 5:** Análise do enriquecimento de AGA em SDS-PAGE. (a) Análise da AGA enriquecida em *Phenyl Sepharose* CL 4B. Marc- Marcador de massa molecular de proteína, 1 - extrato total, 2 - pico ativo. (b) ensaio em gel de atividade amilolítica. 1-extrato total, 2- pico ativo. (massa molecular aproximada do marcador de proteína). O pico ativo foi utilizado nos experimentos de seleção. A mobilidade eletroforética de AGA foi de aproximadamente 39,6 kDa.

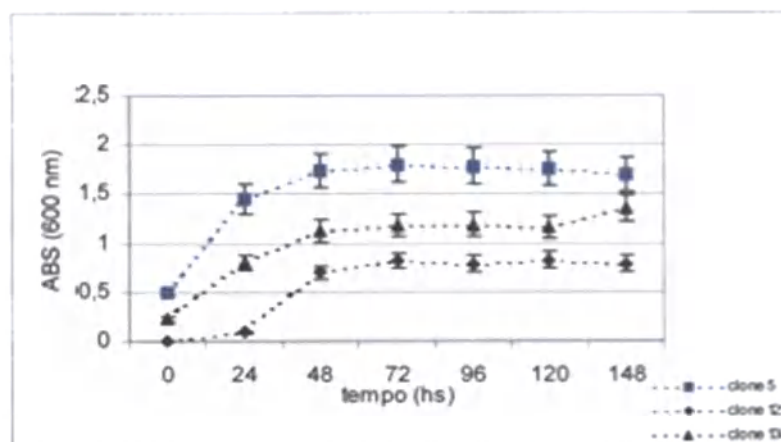
selecionados está sendo realizada com a otimização da expressão com a utilização de diferentes meios e em diferentes condições de pH, temperatura e concentração de metanol. Por meio da predição da massa molécula a partir do cDNA, AMYLAG2, tem aproximadamente 52,7 kDa.



**Figura 6:** Representação esquemática da sub-clonagem do gene *Amylag2* (AF527877) do bicudo do algodocairo. (A) O produto da PCR foi ligado no plasmídeo pGEM-T easy (de replicação) através da estratégia de clonagem por complementaridade T-A. (B) O plasmídeo *Amylag2/pGEM-T* foi digerido com as enzimas *SnaBI* e *Not I* e ligado no plasmídeo pPIC9 (plasmídeo para expressão em *P. pastoris*) com extremidades complementares (C). Este foi linealizado com *Bgl II* e usado para transformação de célula competente de *P. pastoris* (GS115).



**Figura 7:** Ensaio de atividade amilásica dos clones positivos para AgAMY2. A placa com 1 % de amido foi incubada durante 4 dias com adição diária de 200  $\mu$ L de metanol. Após, foi corada com solução de iodina. Três clones exibem fortes halos de atividade amilásica.



**Figura 8:** Expressão de AGAMYL2 em *P. pastoris* (GS115). A atividade amilásica foi monitorada nos tempos indicados. O nível máximo de atividade detectada foi após o 2º e 3º dia de indução com metanol (1% concentração final suplementado diariamente).

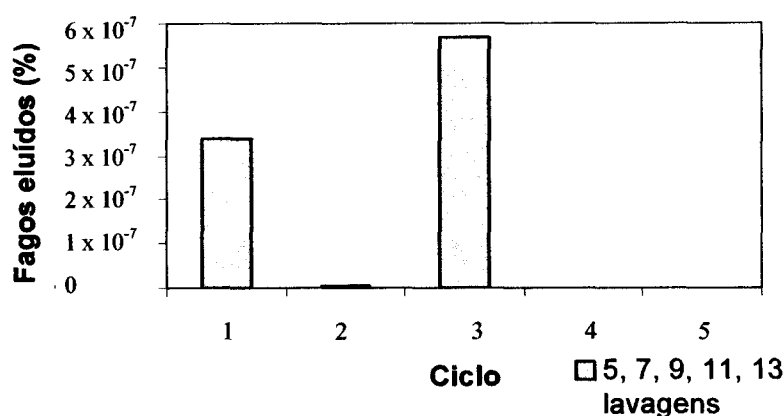
### **4.3 Procedimento de Seleção de genes variantes de inibidores de $\alpha$ -amilases a partir de AGA (*Biopanning*)**

A tecnologia de *Phage Display* aliada às técnicas mutacionais (ex. DNA shuffling, mutagênese sitio dirigida, e outras) tem sido amplamente utilizada para a seleção de moléculas submetidas a evolução direcionada *in vitro*. Com a expressão do gene de interesse em fusão com uma das proteínas do capsídeo viral pode-se obter bibliotecas com milhões ou até bilhões de moléculas variantes expostas na superfície do fago. E, a partir de interações específicas, ligantes podem ser selecionados. A aplicação destas metodologias possibilitou a seleção de vários inibidores de enzimas (Soumillion *et al.*, 1994, Tanaka *et al.*, 1995, Krook *et al.*, 1997, Beekwilder *et al.*, 1999, El Zoieby *et al.*, 2003, Desjobert *et al.*, 2004) e anticorpos específicos para vários antígenos (McCafferty *et al.*, 1990; Barbas *et al.*, 1991; Clackson *et al.*, 1991), ligantes com alta afinidade para seus receptores também foram selecionados (Lowman *et al.*, 1991, Choo & Klug, 1994), enzimas ativas cataliticamente (Heinis, *et al.*, 2001), com nova atividade e/ou termoestáveis (Atwell & Wells, 1999, Wang, *et al.*, 2002; Loo, *et al.*, 2004; Veen, *et al.*, 2004). A expressão de inibidores de proteinases na superfície de fagos possibilitou a seleção de moléculas com maior especificidade para a enzima alvo (Mconnell & Hoess, 1995; Kiczak *et al.*, 2001; Valpicella, *et al.* 2001). A partir de uma biblioteca de inibidor de triptase com  $5.2 \times 10^7$  variantes para as posições P1-P4' do sítio reativo foi possível selecionar potentes inibidores específicos para elastase de neutrófilo (Ki 0,5 nM) e para plasmina (Ki 1,5 nM) (Campos *et al.*, 2004). Afídeos foram controlados por inibidores de tripsina de mostarda (MTI) selecionados contra  $\alpha$ -quimotripsina a partir de uma biblioteca combinatória de MTI com cinco códons mutados na região do sítio ativo demonstrando que esta tecnologia pode disponibilizar novas moléculas efetivas no controle de pragas e patógenos para utilização em programas de melhoramento de culturas com importância agro-econômica, por meio de técnicas de engenharia genética vegetal (Ceci *et al.* 2003).

De acordo com Barbas III *et al.* (2001) de 3 a 6 ciclos de seleção são suficientes para enriquecimento de fagos específicos. Para seleção de genes variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases com afinidade para AGA parcialmente purificada cinco ciclos (ciclo 1 a 5) de seleção foram realizados. O número de lavagens realizadas nos ciclo 1, 2, 3, 4 e 5 foram 5, 7, 9, 11 e 13, respectivamente. A lavagem possibilita um aumento na



estringência da seleção permitindo eliminar os fagos que não se ligaram e os que se ligaram fracamente, fazendo com que a cada ciclo haja um aumento na população de fagos específicos, até que seja atingida uma saturação. Observou-se que no ciclo 2 a população de fagos enriqueceu 112 vezes quando comparada com o ciclo 1 (anterior) (Figura 9). Uma vez que, nos ciclos 3 e 4 houve uma estabilização na quantidade de fagos de entrada (i.e., fagos colocados em contato com a enzima AGA a cada ciclo) e os títulos de fagos de saída (i.e., fagos selecionados a cada ciclo, representando os fagos eluídos com a enzima adsorvida a microplaca) mantiveram-se constantes durante a seleção, o ciclo 3 foi escolhido para as análises de expressão e seqüenciamento.

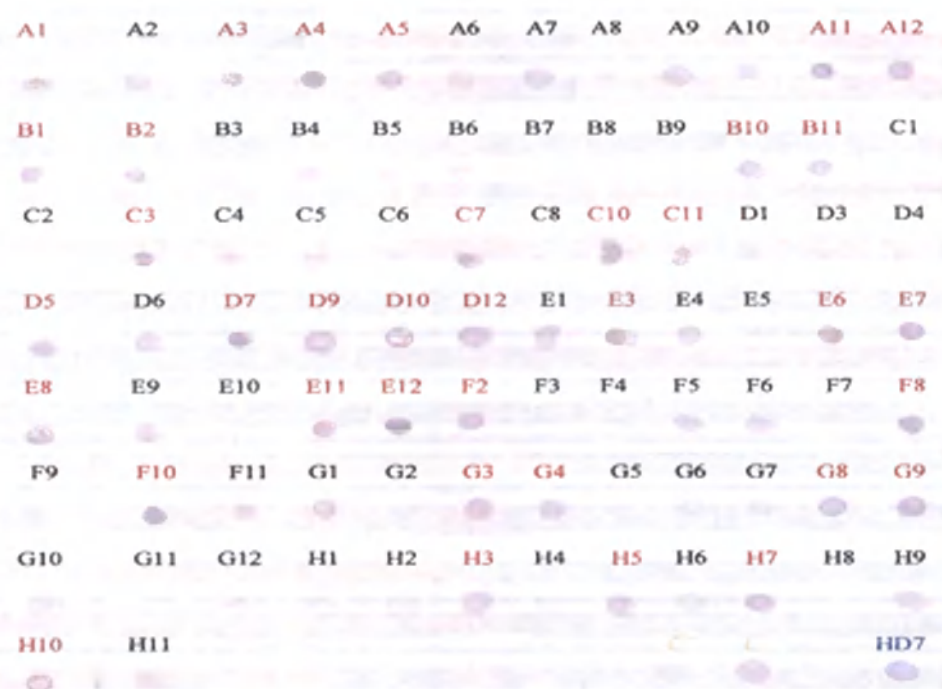


**Figura 9:** Titulação de fagos. Porcentagem de fagos eluídos no experimento de *biopanning* de variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases com afinidade para AGA (fagos de saída/fagos de entrada). No ciclo 3 houve um enriquecimento de 112 vezes na população de fagos eluídos.

#### 4.4 Análise de Expressão utilizando Imunodeteção (Dot Blot) dos variantes para inibidores de $\alpha$ -amilases

A análise de expressão de 86 clones individuais selecionados do ciclo 2 de *biopanning* foi realizada por meio de imunodeteção para selecionar clones expressando os variantes de  $\alpha$ -AIs. A técnica escolhida consiste em um ensaio, onde se aplica a amostra (produto da expressão) diretamente na membrana, sem necessidade de fracionamento anterior. Esta permite a análise simultânea de múltiplas amostras e foi viável em função da quantidade de clones analisados. O sinal detectado dos clones

expressos foi comparado com o obtido no controle positivo (HD7) e o com o do controle negativo (fago *helper*). Dos clones analisados, 31 foram identificados como positivos (Figura 10). O DNA de cada clone foi utilizado em PCR para análise da integridade dos genes. Destes, 26 clones íntegros positivos foram escolhidos aleatoriamente e seqüenciados.

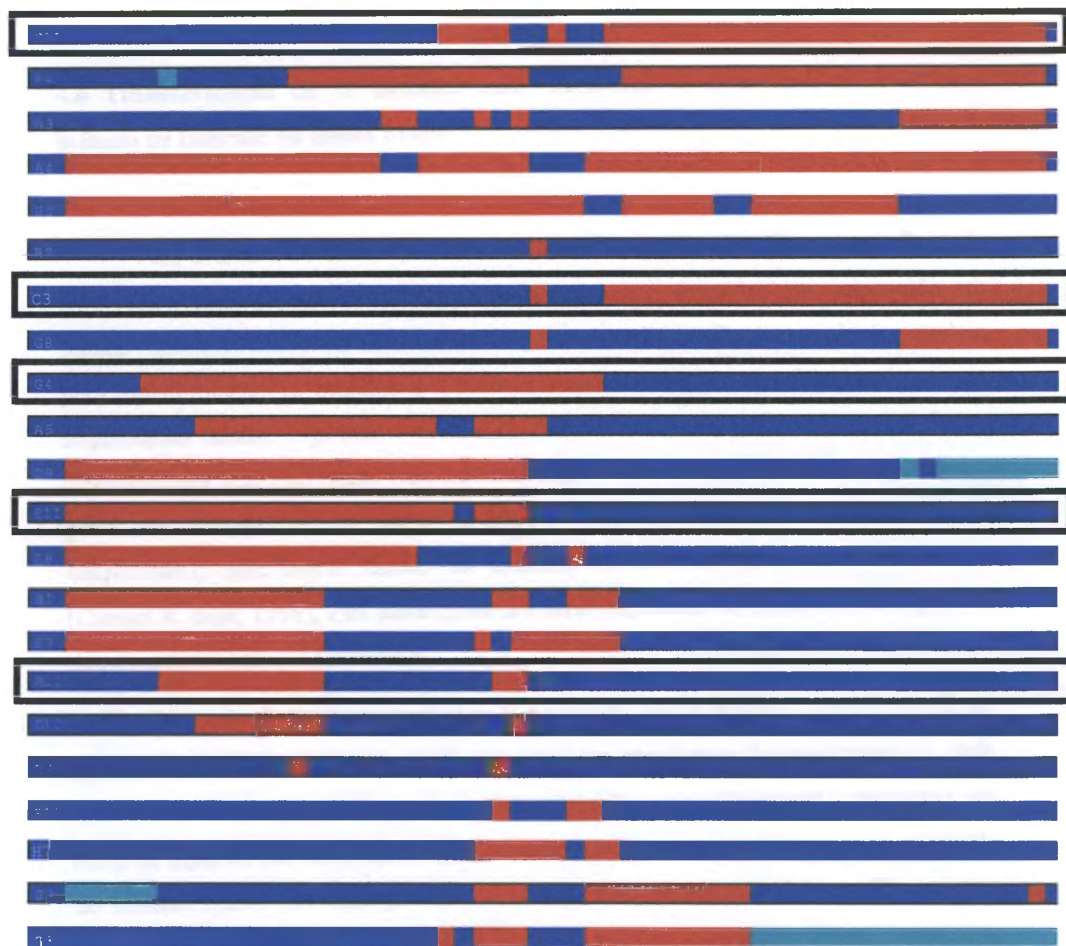


**Figura 10:** Análise da expressão de 86 clones variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases com afinidade para AGA (2º ciclo de *biopanning*). Os clones apresentando sinal positivo (vermelho) em comparação com o controle (HD7, em azul, proteína com epítipo para hemaglutinina) foram submetidos ao seqüenciamento.

#### 4.5 Seqüenciamento e Análises de Seqüências dos genes variantes de $\alpha$ -AIs

Os padrões de mutações observados nos genes selecionados foram bastante diversificados, dificultando inferências a partir das análises de seqüências primárias. A figura 11 apresenta um esquema ilustrativo das regiões mutadas dos inibidores de  $\alpha$ -amilases que apresentaram afinidade para AGA. Os  $\alpha$ -A11 e  $\alpha$ -A12 possuem 56 posições distintas (aminoácidos não conservados) que poderiam ser encontradas nos inibidores selecionados, o que possibilitou a classificação destes em três grupos, de acordo com o número de posições idênticas às moléculas parentais. Assim, a seqüência de aminoácidos dos mutantes A3, B2, H10, A1, G8, A5, E8, B1, E7, A11, D10, D7,

E12, D12, H7, G9, G3 e F8, A4, H5 foram, em sua maioria, idênticas as do  $\alpha$ -A11 e  $\alpha$ -A12, respectivamente, ambos em mais de 65% das posições. As seqüências dos mutantes C11, B10, C3, G4, D9, E11 tiveram 40-60 % de identidade nas posições relativas ao  $\alpha$ -A11 e  $\alpha$ -A12. Foram identificadas seqüências que ocorreram mais de uma vez em clones distintos, como no caso dos clones B10, C3; B2, H10, A1; E12, D12. A



**Figura 11:** Ilustração esquematizada dos diferentes clones selecionados contra AGA resultantes da recombinação dos genes  $\alpha$ -A11 e o  $\alpha$ -A12. Em azul as posições do  $\alpha$ -A11 e em vermelho do  $\alpha$ -A12. Em turquesa as regiões diferentes dos genes parentais. Os inibidores em destaque foram utilizados para transformação de planta.

ocorrência destas seqüências repetidas indica possivelmente que podem ter maior afinidade pelas  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro. Assim, as análises da atividade inibitória de cada um dos mutantes selecionados aliada aos estudos das estruturas tri-dimensionais em complexo com AGA permitirão a identificação dos resíduos envolvidos na interação enzima/inibidor.

#### **4.6 Transformação de *A. thaliana* com Inibidores de $\alpha$ -amilases Utilizando o método de Imersão do Botão Floral**

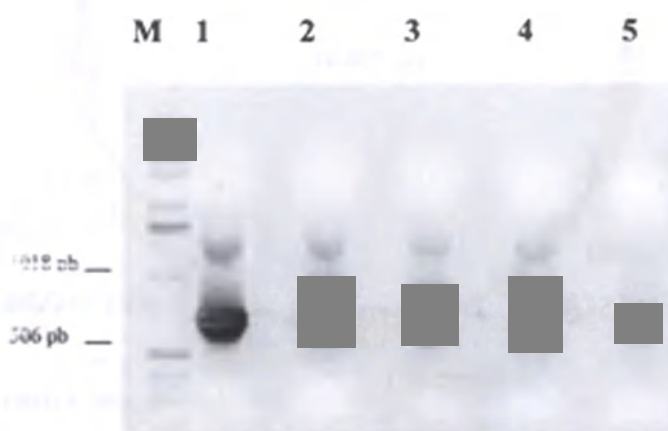
Para avaliar a atividade dos variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases com afinidade para AGA, estes foram previamente sub-clonados no plasmídeo para expressão em planta, pCAMBIA2300. *A. thaliana* foi a planta escolhida. Dentre as plantas modelo para transformação, *A. thaliana* é a mais estudada. O seu genoma foi completamente seqüenciado sendo o primeiro dentre as espécies vegetais. Muitos estudos foram desenvolvidos com esta planta para a identificação e determinação das funções de vários genes (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Utilizando um método de transformação simplificado, onde botões florais são imersos em uma solução de *A. tumefaciens* (Clough & Bent, 1998), esta planta pode ser uma importante ferramenta para expressão de genes para análise de atividade.

Os  $\alpha$ -AIs de feijão comum (1 e 2) se tornam ativos somente contra  $\alpha$ -amilases após serem modificados pós-traducionalmente para uma forma heterotetramérica, onde duas subunidades glicosiladas,  $\alpha$  e  $\beta$  (7.4 e 14 kDa, respectivamente), interagem por meio de ligações não covalentes. Esta modificação envolve uma clivagem na carboxila do resíduo Asn77 por uma protease Asn-específica e remoção da Asn 79 por uma carboxipeptidase. Ainda, 19 resíduos C-terminais da subunidade  $\beta$  são removidos (Young *et al.*, 1999). O sistema *Phage Display* utiliza células bacterianas para replicação e amplificação das populações dos fagos durante o procedimento de seleção. O fagomídeo utilizado possibilita que o gene clonado seja expresso em bactéria que suprime ou não suprime o códon de parada âmbar (separando a proteína de interesse da proteína do fago), possibilitando a expressão da proteína de interesse fusionada ou não a proteína viral. Contudo, a utilização da bactéria não supressora é favorável, uma vez que a proteína produzida é secretada para o meio de cultura livre da proteína de fusão viral.

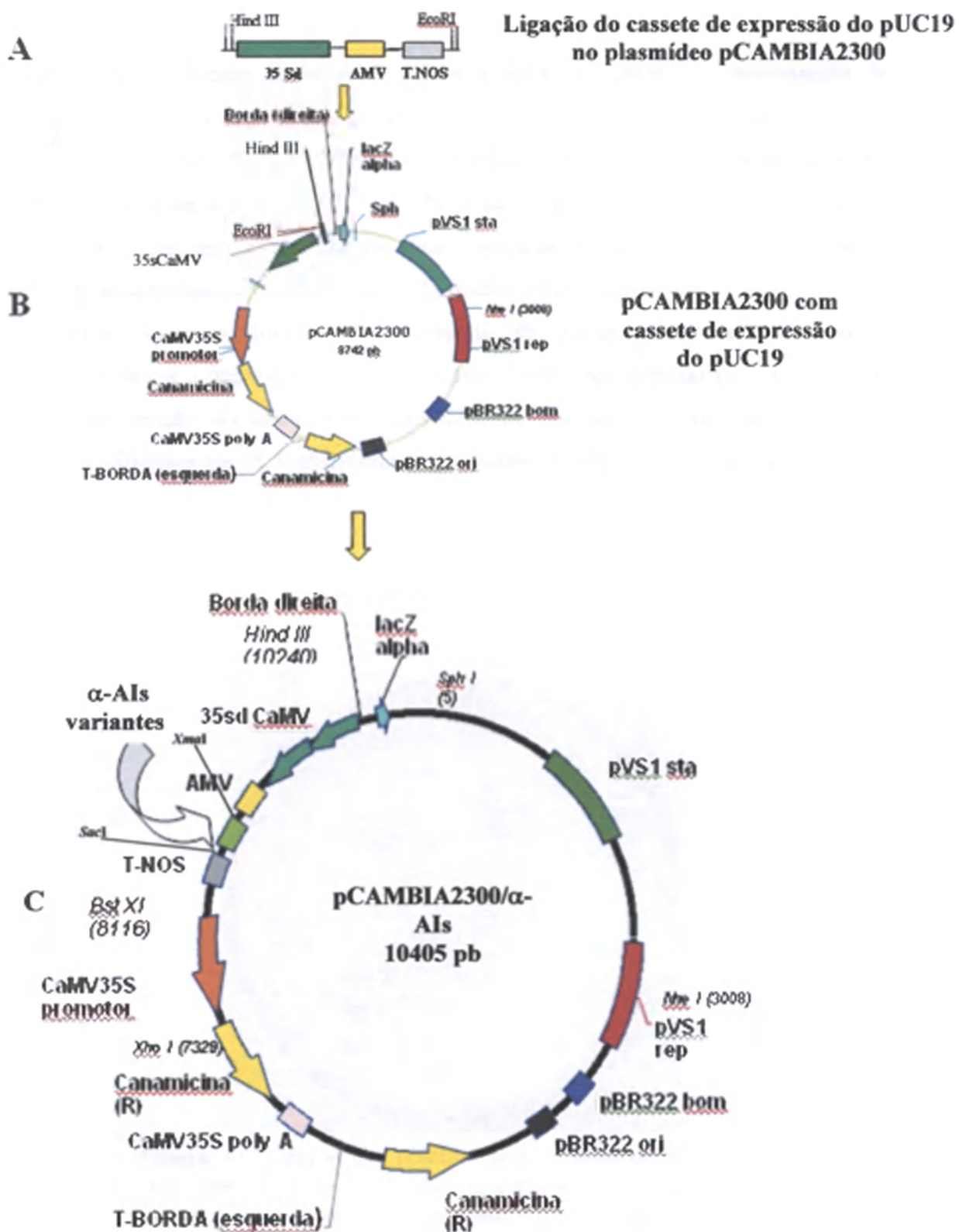
O sistema bacteriano não é capaz de fazer as modificações pós-traducionais necessárias para a geração de moléculas de inibidores de  $\alpha$ -amilase ativos.

#### 4.6.1 Sub-Clonagem dos Inibidores de $\alpha$ -amilases em Plasmídeo para Expressão em Planta

Dentre os genes dos inibidores de  $\alpha$ -amilases selecionados por afinidade para AGA que tiveram 40-60 % de identidade nas posições relativas ao  $\alpha$ -AI1 e  $\alpha$ -AI2 (C11, C3, G4, E11, Figura 11) e um com mais de 65% de identidade com o  $\alpha$ -AI1 (A11, Figura 11) foram amplificados a partir do fagomídeo (figura 12). Os fragmentos com aproximadamente 741 pb foram ligados ao plasmídeo pCAMBIA2300 conforme esquema apresentado na Figura 13. O plasmídeo contendo os genes para os variantes foi denominado pCAMBIA2300/ $\alpha$ -AIs. Alguns clones resultantes das transformações de *E. coli* (XL1-Blue) foram analisados por PCR e digeridos com *Xma*I e *Sac*I. Na maioria dos clones analisados foi confirmada a presença dos genes para os variantes (Figura 14).

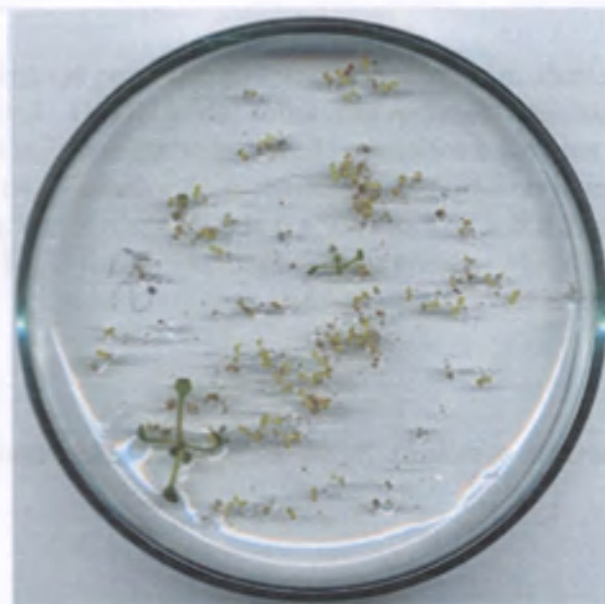


**Figura 12:** Análise da PCR dos genes dos inibidores de  $\alpha$ -amilase selecionados para AGA (C11, C3, G4, E11). Amplificação realizada a partir do DNA dos fagomídeos do 2º ciclo de seleção. M: marcado de massa molecular 1 Kb DNA ladder; 1: C11; 2: C3; 3: G4; 4: E11 e 5: controle positivo (pCAMBIA2300/ $\alpha$ -AI1). Os iniciadores utilizados foram 5'XMAI e 3'SACI. O fragmento de 741 bp amplificado refere-se aos inibidores de  $\alpha$ -amilases.



**Figura 13:** Esquema da construção do plasmídeo para expressão dos variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases selecionados por afinidade para AGA. (A) cassete de expressão do plasmídeo pUC19 ligado no plasmídeo pCAMBIA2300. (B) Plasmídeo pCAMBIA2300 com cassete de expressão contendo o promotor 35sCaMV dobrado e terminador NOS. (C) Plasmídeo utilizado na transformação de *A. thaliana* contendo os variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases selecionados por afinidade para AGA C3, C11, G4, E11 e A11.

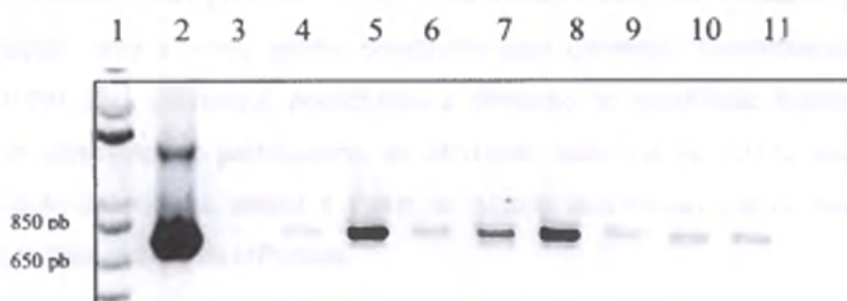
transformação depende de variáveis como a idade da planta, a concentração de surfactante e de açúcar utilizado no meio de imersão. Neste estudo, a concentração de Silwet L-77 utilizada para transformação de plantas de *A. thaliana* com os genes dos inibidores de  $\alpha$ -amilases foi de 0,2% e 5% de sacarose conforme o protocolo. Como as plantas utilizadas nestes experimentos foram mantidas em casa de vegetação, as baixas taxas de transformação obtidas (Tabela 1) podem estar relacionadas com as variações ambientais ocorridas durante o crescimento da planta, afetando o vigor e principalmente a o desenvolvimento dos botões florais. As plântulas positivas (obtidas após a germinação das sementes e desenvolvimento em meio seletivo com canamicina) foram confirmadas por PCR utilizando os iniciadores 5'XMAI e 3'SACI (Figura 15).



**Figura 14:** Seleção das plantas transformadas de *A. thaliana* em meio seletivo contendo canamicina (100  $\mu\text{g/mL}$ ). As sementes que desenvolveram plantas com folhas verdadeiras quando comparadas com as sementes negativas, foram utilizadas para análise da presença dos genes para os variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases.

**Tabela 1** – Taxa de transformação das plantas de *A. thaliana* transformadas com  $\alpha$ -AIs/pC2300 modificado.

Construção gênica	Nº de sementes plaqueadas	Nº de plantas positivas	Taxa de transformação em (%)
A11	2.280	2	0.09
C3	2.597	5	0.19
C11	7.559	5	0.07
E11	6.610	3	0.05
G4	2.519	5	0.20



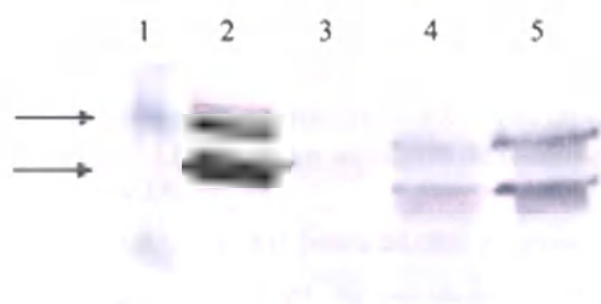
**Figura 15:** Análise por PCR da transformação de *A. thaliana* por imersão do botão floral. O DNA de folha das plantas crescidas em casa de vegetação foi utilizado como molde. 1: marcador 1 Kb plus DNA ladder; 2: controle positivo (inibidor de  $\alpha$ -amilase 1 de feijão comum); 3: planta não transformada; 4 e 5: plantas C11; 6 e 7: plantas C3; 8 e 9: plantas G4; 10 e 11: plantas E11. O fragmento amplificados contém 741 pb.

#### 4.6.3 Análise da expressão em planta de *A. thaliana* utilizando *Western Blot* e Ensaio de Elisa

As plantas transformadas com os genes variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases: A11 e C3 (escolhidos dentre as plantas transformadas que produziram mais folhas) foram utilizadas para análise da expressão e do processamento das proteínas recombinantes. O *Western blot* do extrato total destas plantas apresentou dois fragmentos, um de aproximadamente 11 kDa e outro de 14kDa, correspondentes as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente. Estes fragmentos também foram detectados no extrato de feijão comum, *Phaseolus vulgaris*, que possui o  $\alpha$ -A11. Isto demonstra que as moléculas recombinantes foram adequadamente processadas para a forma ativa



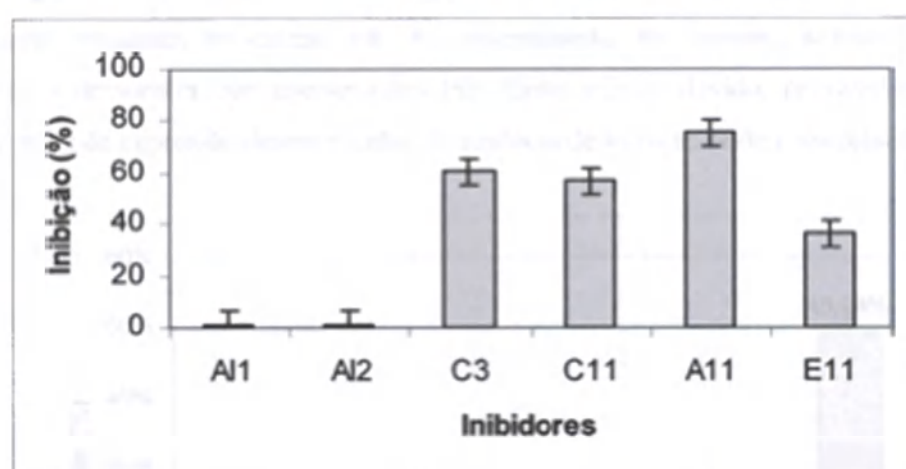
possibilitando avaliá-las quanto a atividade inibitória para a AGA (Figura 16). Estes inibidores já foram expressos ativamente em plantas como ervilha (Morton *et al.*, 2000), *Cicer arietinum* (chickpea) (Sarmah *et al.*, 2004), feijão azuki (Nishizawa, *et al.*, 2006) e tabaco (Silva *et al.*, 2000). Quando expressos em *A. thaliana* estes foram processados de acordo com o inibidor parental, confirmando que o sistema homólogo é necessário para a modificação pós-traducional correta. O ensaio inibitório de atividade amilásica foi realizado com os extratos de plantas contendo os variantes de inibidores C3, C11, A11 e A11 e anteriormente quantificados por meio de ensaio de ELISA. A concentração dos inibidores C3, C11, A11 e E11 foi de aproximadamente 0.01, 0.03, 0.01 e 0.01%, respectivamente, das proteínas totais. Esta determinação foi realizada por meio da comparação com a curva padrão construída para diferentes concentrações do  $\alpha$ -A11 ( $R^2 = 0,99$ ). Esta alternativa possibilitou a obtenção de quantidade mínima necessária para os experimentos preliminares de atividade inibitória de AGA, uma vez que a quantidade de inibidor obtida a partir de plantas individuais estava sendo um fator limitante para análise da atividade.



**Figura 16:** Análise da expressão dos inibidores de  $\alpha$ -amilase em *A. thaliana*. *Western Blot* de proteínas totais de extratos de plantas transformadas com os inibidores de  $\alpha$ -amilases. 1: marcador Beck Mark protein ladder; 2: controle positivo (inibidor de  $\alpha$ -amilase I de feijão comum); 3: planta não transformada; 4: planta transformada com o inibidor C3; 5: planta transformada com o inibidor A11. As setas indicam as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  que formam a molécula ativa do inibidor.

#### 4.7 Ensaio Inibitório de Atividade Amilásica *in vitro* contra $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro

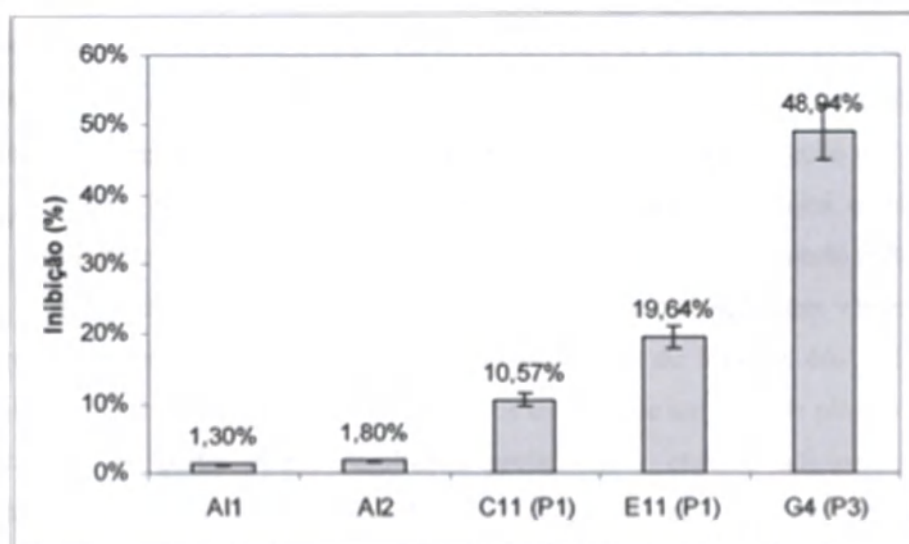
A atividade inibitória dos inibidores C3, C11, E11 e A11 está demonstrada na figura 17. Nos ensaios, a concentração do extrato total de proteínas utilizada para cada um dos variantes foi de 100  $\mu$ g. Após os ensaios inibitórios, as concentrações de cada variante no extrato foi determinada por ELISA. O inibidor C3 inibiu 60.4% da atividade de AGA na concentração de 3.9 nM, o C11 inibiu 56.7% com 11.7 nM, o A11 inibiu 75.5%, com 4.9 nM e o E11 36,1% com 4.7 nM. Os inibidores parentais não foram



**Figura 17:** Atividade inibitória dos variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases expressos em *A. thaliana*, C3, C11, A11, E11, dos inibidores de  $\alpha$ -amilase 1 (A11) e 2 (A12) de feijão comum contra AGA.

ativos contra a AGA, contudo o  $\alpha$ -A11 inibiu 86.08% da atividade amilásica de PPA e o  $\alpha$ -A12, similarmente mais de 70.96% da atividade de ZSA, na concentração de aproximadamente 10 nM. A inibição detectada para os variantes selecionados foi similar a inibição observada para os  $\alpha$ -amilases do *Cryptolestes ferrugineus* e *Tribolium castaneum* onde 50% de inibição foi obtida com 10.9 e 4.2 nM e 2.4 e 4.8 nM de  $\alpha$ -A11, em pH 4.5 e 6.0, respectivamente (Kluh *et al.*, 2005). A inibição de 50% da atividade das  $\alpha$ -amilases de *Hypothenemus hampei* utilizando o inibidor  $\alpha$ -AIPc1 expresso em tabaco foi obtida apenas com mais de 75 ng do inibidor (Pereira *et al.*, 2006). Entretanto, o inibidor  $\alpha$ -AIPc1 foi testado com o extrato intestinal de *H. hampei* que possui majoritariamente duas  $\alpha$ -amilases (Valencia, *et al.*, 2000). O inibidor de feijão comum, PvCAI inibiu a ZSA com a concentração de 5.5 e 9  $\mu$ M, restando apenas 10%

de atividade amilolítica residual (Dayler *et al.*, 2005). A inibição de 60% da atividade amilásica das  $\alpha$ -amilases do bruquídeo *A. obtectus*, AoA1 e AoA2 com inibidores de trigo 0.19 e 0.53, foi alcançada com a concentração de 3,75  $\mu$ M e 2.5  $\mu$ M, respectivamente (Franco *et al.*, 2005). Adicionalmente, a atividade inibitória do extrato proteico de sementes das plantas T2 foi avaliada. As plantas analisadas de cada inibidor foram: plantas 1 e 2, do A11; plantas 2 e 4, do C3; plantas 1, 4 e 5, do C11; plantas 1 e 3, do E11 e plantas 1, 2, 3, 4 e 5 do G4 (Figura 18). Apenas as plantas 1 do variante C11 e do E11 e a planta 4 do G4, foram ativas contra AGA, com 10.5, 19.64 e 48.94% de inibição. A concentração de proteína total destes extratos foi 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ L para C11 planta 1, 1.1  $\mu$ g/ $\mu$ L para E11 planta 1 e 0.97  $\mu$ g/ $\mu$ L para G4 planta 4, mas, a concentração dos inibidores presentes no extrato não foi determinada. No entanto, a análise destes resultados demonstra que apenas estes três foram ativos, devido, provavelmente ao maior nível de expressão destas plantas. A ausência de inibição pode estar relacionado



**Figura 18:** Atividade inibitória dos variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases selecionados por afinidade para  $\alpha$ -amilases de *A. grandis* (AGA). No ensaio inibitório foram usados extratos protéicos de sementes de plantas T2. A11 e 2: Inibidor de  $\alpha$ -amilase 1 e 2; Variante C11 planta 1; E11 planta 1 e G4 planta 3

com a pequena quantidade do inibidor utilizada no ensaio. Entretanto, estes dados serão confirmados com a quantificação da expressão dos inibidores utilizando por meio de ensaio ELISA. Estes resultados indicam que os variantes selecionados são inibidores muito ativos para AGA. Contudo, Oliveira-Neto *et al.* (2003) relatou que o  $\alpha$ -A12 inibiu cerca de 20% da atividade das  $\alpha$ -amilases intestinais do bicudo. Os estudos de

modelagem molecular utilizando a estrutura tridimensional predita das  $\alpha$ -amilases do inseto em complexo com os inibidores indicaram os resíduos envolvidos na interação e discutiu o tipo de inibição encontrada. Comparações de seqüências entre TMA e AMYLAG1 e AMYLAG2 definiu que estas têm dois resíduos a menos (138 e 294, numeração de TMA). Os modelos construídos demonstraram que a deleção do resíduo 294 faz com que o *loop* onde se localiza tenha um encurtamento que gera repulsões estéricas quando o  $\alpha$ -AI1 está ligado. Além disso, a substituição de duas glicinas neste *loop* (292 e 293) nas  $\alpha$ -amilases do bicudo reduzem a sua flexibilidade estrutural. Esta flexibilidade é importante para ligação do inibidor a enzima (Strobl *et al.*, 1998; Nahoum *et al.*, 1999). A enzima ZSA também não é inibida pelo  $\alpha$ -AI1 e similarmente as do bicudo do algodoeiro, ambas têm um *loop* curto e rígido com menos resíduos de glicina. Esta enzima é inibida pelo  $\alpha$ -AI2 que tem dois resíduos a menos que o  $\alpha$ -AI1 nas regiões de interação enzima/inibidor (Grossi-de-Sá *et al.*, 1997). Comparando a seqüência primária deste *loop* nas seqüências dos inibidores C3, C11, A11 e E11, nos dois primeiros (C3 e C11) têm o *loop* “curto” do  $\alpha$ -AI2 e os dois últimos (A11 e E11) o *loop* “longo” do  $\alpha$ -AI1. Além disso, possuem outras diferenças ao longo das seqüências (dados não mostrados). A interação proteína-proteína possibilita a seleção por *Phage Display*, contudo, enzimas e inibidores, precisam ter atividade catalítica e inibitória aliada a capacidade de ligação (Verhaert *et al.*, 2002). Além de um eficiente método de seleção, estudos de atividade são necessários para caracterização das enzimas ou inibidores variantes. Cabe ressaltar que nos experimentos de *Western blot*, ELISA e ensaio de atividade inibitória, foram utilizados os extratos de um *pool* de plantas (3) T2 (geração F2). A partir destes resultados preliminares, ensaios adicionais serão realizados. Atualmente, doze plantas da geração T2 de cada construção estão em desenvolvimento para que sejam analisadas individualmente quanto ao nível de expressão e avaliação da atividade inibitória de AGA. Após a determinação da concentração dos inibidores expressos nas plantas de *A. thaliana*, extratos destas serão incorporadas em dieta artificial do bicudo do algodoeiro para avaliação do efeito tóxico *in vivo*.

Os inibidores de  $\alpha$ -amilases variantes, o  $\alpha$ -AI1 e o  $\alpha$ -AI2, são potenciais moléculas a serem utilizadas em programas de melhoramento vegetal. Estas moléculas são foco de importantes linhas de pesquisa que avaliam a atividade, especificidade e efeitos tóxicos em organismos não alvos. Quando o  $\alpha$ -AI1 foi expresso em ervilha, a

infestação de sementes do inseto *B. pisorum* foi completamente impedida em condições de campo e armazenamento. Embora ervilhas expressando  $\alpha$ -AI2 não tenham tido a infestação de suas sementes reduzida o desenvolvimento do inseto foi retardado em aproximadamente trinta dias, indicando uma possibilidade para controle deste inseto-praga (Morton *et al.*, 2000). Recentemente, foi demonstrado novamente que a expressão do  $\alpha$ -AI1 em *Cicer arietinum* protegeu a planta do ataque do bruquídeo *C. maculatus* (Ignacimuthu & Prakash, 2006). Um estudo interessante realizado por Nishizawa *et al.* (2006) demonstrou que a resistência de acessos de feijão comum ao bruquídeo *Z. subfasciatus* não depende apenas da presença do  $\alpha$ -AI2. Outros fatores presentes nestes acessos agem sinergicamente provocando a resistência observada. Este indicativo fortalece a idéia de combinação de genes de resistência na transformação de plantas para obtenção de linhagens eficazes no controle de insetos-praga e patógenos. Estudos de especificidade e de toxicidade para vários organismos não alvos também foram realizados para o  $\alpha$ -AI1 purificados de sementes de feijão comum cultivar Magna. Ele foi capaz de inibir as  $\alpha$ -amilases dos insetos coleópteros *Crytolestes ferrugineus*, *T. castaneum*, dípteros *Drosophila melanogaster*, *Sarcophaga bullata*, himenópteros *Monomorium pharaonis*, *Apis mellifica*, *Venturia canescens*, na variação nM de concentração (Kluh *et al.*, 2005). Adicionalmente, foi demonstrado que ervilhas transgênicas expressando  $\alpha$ -AI1 não provocou efeito anti-nutricional significativo em camundongos alimentados com dietas contendo 30% de farinha das sementes transgênicas (Pusztai *et al.*, 1999). Entretanto, foi demonstrado que o  $\alpha$ -AI1 expresso em ervilha possui um padrão de glicosilação diferente do  $\alpha$ -AI1 produzido em feijão comum, o que estimula sistemicamente o sistema imune de camundongos expostos aos extratos das plantas transgênicas (Prescott *et al.*, 2005). Além disto, o  $\alpha$ -AI1 produzido em ervilha possui capacidade imunomodulatória elicitando o sistema imune contra outras proteínas consumidas concomitantemente com o inibidor (Prescott *et al.*, 2005). Isto demonstra a necessidade de estudos comparativos das proteínas produzidas transgenicamente com as produzidas nas plantas de origem. Salienta-se que esta característica observada não deve ser generalizada, uma vez que *Lupinus angustifolius* expressando albumina de semente de girassol e *Cicer arietinum* expressando o  $\alpha$ -AI1 não geraram a imunogenicidade observada para caso do  $\alpha$ -AI1 produzido em ervilha (Prescott *et al.*, 2005). Estes dados demonstram a necessidade de geração de moléculas mais específicas para o inseto-alvo, assim como atenção especial para o hospedeiro que

produzirá a proteína tóxica, uma vez que modificações pós-traducionais específicas do hospedeiro podem gerar características indesejadas na proteína.

## 5. Conclusão e Perspectivas

As  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro (AGA) foram parcialmente purificadas em cromatografia hidrofóbica e foram utilizadas em experimentos de *biopanning* para seleção de variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases. A aplicação das técnicas utilizadas na evolução direcionada, DNA *shuffling* e *Phage Display*, possibilitou a seleção de variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases com afinidade para AGA. Ainda, a  $\alpha$ -amilase do bicudo do algodoeiro, *Agamyl2*, foi expressa em *P. pastoris* para caracterização da atividade dos inibidores selecionados, contudo, a expressão será otimizada para caracterização enzimática da mesma e para determinação da  $K_d$  dos inibidores selecionados. Os estudos preliminares da atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase dos variantes selecionados contra AGA demonstrou que o C3, C11, E11 e A11 expressos em plantas de *Arabidopsis* são ativos para AGA. Contrariamente, a atividade não foi detectada com o  $\alpha$ -A11 nem com o  $\alpha$ -A12, utilizados para construção da biblioteca combinatória. A construção de modelos tridimensionais dos inibidores selecionados neste trabalho permitirá o entendimento do mecanismo de interação envolvendo o complexo mutante/AGA. Em adição, as informações obtidas contribuirão para estudo das interações entre os inibidores e as  $\alpha$ -amilases o que, no futuro, facilitará a síntese de moléculas mais efetivas e direcionadas as insetos-praga e patógenos de interesse para a agricultura, assim como para o tratamento de doenças relacionadas a atividade das  $\alpha$ -amilases (e.g diabetes). O mutante apresentando maior atividade inibitória contra as  $\alpha$ -amilases do bicudo, será utilizado em programas de melhoramento do algodoeiro por transgenia. Além disto, construções gênicas dos vinte e dois mutantes remanescentes estão sendo utilizadas para transformação de *A. thaliana* para avaliação da atividade inibitória, especificidade e toxicidade *in vivo* dos variantes. Os mutantes selecionados neste trabalho podem ser novamente recombinados por DNA *shuffling* e procedimentos de *biopanning* contra AGA poderá permitir a seleção de inibidores com a atividade potencializada com relação aos inibidores aqui selecionados.

## 6. Referências Bibliográficas

- Abe, J.I., Sidenius, U. & Svensson, B. 1993. Arginine is essential for the  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of the  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. *Biochem. J.* 293, 151-155.
- Abe, K., Emori, Y., Kondo, H., Suzuki, K. and Arai, S. 1987. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. *J. Biol. Chem.* 262. 16793-16797.
- Abe, M., Abe, K., Kuroda, M. and Arai, S. 1992. Corn kernel cystein proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies. *Eur. J. Biochem.* 209, 933-937.
- Alvarez, M.E., 2000. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance, *Plant Mol. Biol.*, 44:429-442.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. and Lamb, C. 1998. Reactive oxygen intermediates establish a systemic signal network in the establishment of plant. *Cell.*, 92:773-784.
- Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 408, 796-815.
- Atwell, S. and Wells, J.A. 1999. Selection for improved subtiligases by phage display. *Proc Natl Acad Sci USA* (96)9497-9502.
- Barbas III, C.F., Buston, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J. 2001. Selection from Antibody Libraries. *In: Phage Display a Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, p. 10.1-10.20.
- Beekwilder, J., Rakonjac, J., Jongsma, M. and Bosch, D. 1999. A phagemid vector using the E. coli phage shock promoter facilitates phage display of toxic proteins. *Gene*, 228, 23-31.
- Bellettini, S., Bellettini, N.M.T., Salvador, G., Mendes, E., Garcia, E.C., Da Silva, W.G. 1998. Diferentes inseticidas do controle do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis*-Boheman 1843. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17, p.133.
- Berrocal-Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., Lopez, G., Garcia-Olmedo, F., Molina, A. 2002. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol.*, 128(3):951-61.
- Bischoff, H., Ahr, H.J., Schmidt, D. & Stoltefuss, J. 1994. Acarboseein neues Wirkprinzip in der Diabetes-Therapie. *Nachr. Chem. Techn Laboratory* 42, 1119-1128.
- Bloch Jr, C. and Richardson, M. 1991. A new family of small (5 kD) protein inhibitors of insect  $\alpha$ -amylase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) have sequence homologies with wheat  $\delta$ -purothionins. *FEBS Lett.* 279, 101-104.
- Bloch, C. Jr., Patel, S. U., Baud, F., Zvelebil, M. J., Carr, M. D., Sadler, P. J. and Thornton, J. M. 1998. 1H NMR structure of an antifungal  $\gamma$ -thionin protein SI $\alpha$ 1: similarity to scorpion toxins. *Proteins*, 32:334-349.
- Bompard-Gilles, C., Rousseau, P., Rougea, P. & Payan, F. 1996. Substrate mimicry in the active centre of a mammalian  $\alpha$ -amylase: structural analysis of an enzyme inhibitor complex. *Structure*, 4: 1441-1452.

- Botella, M.A., Xu, Y., Prabha, T.N., Zhao, Y., Narashimhan, M.L., Wilson, K.A., Nielsen, S.S., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. 1996. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and response to wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 112, 1201-1210.
- Broekaert, W. F., B. P. A. Cammue, M. F. C. Debolle, K. Thevissen, G. W. Desamblanx, and R. W. Osborn. 1997. Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16:297–323.
- Broekaert, W. F., F. R. Terras, B. P. Cammue, and R. W. Osborn. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108:1353-1358
- Broekaert, W.F., Marien, W., Terras, F.R., De Bolle, M.F., Proost, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S.B., Vanderleyden, J. and Cammue, B.P.A. 1992. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, 31:4308-4314.
- Brunet, E., Chauvin, C., Choumet, V. and Jestin, J.L. 2002. A novel strategy for the functional cloning of enzymes using filamentous phage display: the case of nucleotidyl transferases. *Nucleic Acids Res*, 30(9) e40.
- Calderon, L. A., Teles, R. C. L., Leite, J. R. S. A., Franco, O. L., Grossi-De-Sa, M. F., Medrano, F. J., Bloch, C. Jr, Freitas, S. M. 2005. PURIFICATION OF A 6.5 KDA PROTEASE INHIBITOR FROM AMAZON *Inga umbratica* SEEDS EFFECTIVE AGAINST SERINE PROTEASES OF THE BOLL WEEVIL *Anthonomus grandis*. *Protein and Peptide Letters* 12(6): 583-587.
- Cammue, B.P., De Bolle, M.F., Terras, F.R., Proost, P., Van Damme, J., Rees, S.B., Vanderleyden, J. and Broekaert, W.F. 1992. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.* 267:2228-2233.
- Campos, F.A.P., Xavier-Filho, J.O., Silva, C.P. and Ary, M. B. 1989. Resolution and partial characterization of proteinases and alpha-amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 92(B): 51-57.
- Campos, I.T., Silva, M.M., Azzolini, S.S., Souza, A.F., Sampaio, C.A., Fritz, H., and Tanaka, A.S. 2004. Evaluation of phage display system and leech-derived trypsin inhibitor as a tool for understanding the serine proteinase specificities. *Arch. Biochem. Biophys.* 425: 87–94.
- Carlini, C.R. and Grossi-de-Sa, M.F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40: 1515-1539.
- Castro, M. de S., Fontes, W. 2005. Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide Letters*, v. 12, n. 1, p. 13-18.
- Cater, S.A., Lees, W. E., Hill, J., Brzin, J., Kay J., Phylip, L. H. 2002. Aspartic proteinase inhibitors from tomato and potato are more potent against yeast proteinase A than cathepsin D. *Biochim. Biophys. acta, Prot. struct. mol. enzymol.*, vol. 1596, n°1, pp. 76-82.
- Ceci, L.R., Volpicella, M., Rahbe, Y., Gallerani, R., Beekwilder, J., Jongsma, M.A. 2003. Selection by phage display of a variant mustard trypsin inhibitor toxic against



aphids. *The Plant Journal*, 33, 557–566.

Cereghino, J. L. e Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology, Reviews* 24 , 45-66.

Chen, Y., Diener, K., Patel, I.R., Kawooya, J.K., Martin, G.A., Yamdagni, P., Zhang, X., Sandrasagra, A., Sahasrabudhe, S., and Busch, S.J. 2002. Phage Display of Functional Human TNF- $\alpha$  Converting Enzyme Catalytic Domain: A Rapid Method for the Production of Stabilized Proteolytic Proteins for Assay Development and High-Throughput Screening. *The Society for Biomolecular Screening*, 7(5): 433-440.

Choo, Y. and Klug, A. 1994. Selection of DNA binding sites for zinc fingers using rationally randomized DNA reveals coded interactions. *PNAS* 91(23), 11168–11172.

Christeller, J.T., Farley, P. C., Ramsay, R. J., Sullivan, P.A. and Laing, W.A. 1998. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. *Eur. J. Biochem.* 254, 160.

Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D. and Winter, G. 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, 352: 624–628.

Clough, S. J. and A. F. Bent, 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* - mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16:735-743.

Dangl, J.L., Dietrich, R.A. and Richberg, M.H. 1996. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, 8:1793-1807.

Desjobert C., Richard de Soultrait, V., Faure, A., Parissi, V., Litvak, S., Tarrago-Litvak, L., and Fournier, M. 2004. Identification by Phage Display Selection of a Short Peptide Able To Inhibit Only the Strand Transfer Reaction Catalyzed by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase. *Biochemistry*, 43 (41), 13097 –13105

Dias, S.C., Franco, O.L., Magalhães, C.P., Oliveira Neto, O.B., Laumann, R.A., Figueira, E.L.Z., Melo, F.R. & Grossi-de-Sá, M.F. 2005. Molecular cloning and expression of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from rye with potential for controlling insect pests. *The Protein Journal*, v. 24, n. 2, p. 113-123.

Dixon, R.A., and Harrison, M.J., 1990. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Adv. Gen.*, 28:165-234.

Dixon, R.A., Harrison, M.J. and Lamb, C.J. 1994. Early events in the activation of plant defense response. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32, 479-501.

El Zoeiby, A., Sanschagrin, F., Darveau, A. *et al.* 2003. Identification of novel inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* MurC enzyme derived from phage-displayed peptide libraries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51, 531–43.

Elfstrand, M., Fossdal, C.G., Swedjemark, G., Clapham, D., Olsson, O., Sitbon, F., Sharma, P., Lönneborg, A. and von Arnold, S. 2001. Identification of Candidate Genes For Use in Molecular Breeding – A Case Study With the Norway Spruce Defensin-like Gene, *Spi 1*. *Silvae Genetica*, 50, 75-81.

Erlich, P.R. & Raven, P.H. 1964. Butterflies and plants: a study in co-evolution. *Evolution*, 1:18.755.

Feitelson, J.S., Payne, J., Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond, *BioTechnology* 10, 271–275.

- Feng, G.H., Richardson, M., Chen, M.S., Kramer, K.J., Morgan, T.D. & Reeck, G.R. 1996.  $\alpha$ -Amylase inhibitors from wheat: a sequences and patterns of inhibition of insect and human  $\alpha$ -amylases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 419-426.
- Florach, D. E. and Stiekema, W. J., 1994. Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol. Biol.*,26:25–37.
- Franco, O. L., Freitas, S.M., Santos, R. C. dos, Batista, J.A.N., Mendes, A.C.M., Araújo, M.A.M. de, Monnerat, R.G., Grossi de Sá, M.F. 2003. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. *Phytochemistry, USA*, v. 63, nº. 3, p. 343-349.
- Franco, O.L., Rigden, D.J., Melo, F.R., Grossi-de-Sa, M.F. 2002. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases. *Eur. J. Biochem.*, 269: 397-412.
- Franco, O.L., Rigden, D.J., Melo, F.R., Bloch Jr, C., Silva, C.P. & Grossi de SaA , M.F. 2000. Activity of wheat  $\alpha$ -amylase inhibitors towards bruchid  $\alpha$ -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.* 267 (8), 1466-1473.
- Franco, O.L., Dias, S.C., Magalhaes, C.P., Monteiro, A.C., Bloch, C., Melo, F.R., Oliveira-Neto, O.B., Monnerat, R.G. & Grossi-de-Sa, M.F. 2004. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Phytochemistry* 65. 81-89.
- Gallo, D., Nakano, O, Silveira Neto, S. 1988. *Manual de Entomologia Agrícola*. 2ª edição, Ed. Agrônômica Ceres, São Paulo, 649 p.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramin, J.D., Marcini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C. 2002. *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 920p.
- Gao, A., Hakimi, S.M., Mittanck, C.A., Wu, Y., Woerner, M.B., Stark, D.M., Shah, D.M., Liang, J., Rommens, C.M.T. 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat Biotechnol.* 18: 1307–1310.
- Garcia-Casado, G.L., Sanchez-Monge, R., Lopez-Otin, C. and Salcedo, G. 1994. Rye inhibitors of animal  $\alpha$ -amylases shown different specificities, aggregative properties and IgE-binding capacities than their homologues from wheat and barley. *Eur. J. Biochem.* 224, 525-531.
- Garcia-Maroto, F., Carbonero, P. & Garcia-Olmedo, F. 1991. Site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli* of WMAI-1, a wheat monomeric inhibitor of insect  $\alpha$ -amylase. *Plant Mol. Biol.* 17, 1005-1011.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., Moreno, M. 1995. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol* 3: 72–74.
- Garcia-Olmedo, F., Salcedo, G., Sanchez-Monge, R., Hernandez-Lucas, C., Carmona, M.J., Lopez-Fando, J.J., Fernandez, J.A., Gómez, L., Royo, J., Garcia-Maroto, F., Castagnaro, A. & Carbonero, P. 1992. Trypsin/ $\alpha$ -amylase inhibitors and thionins: possible defense proteins from barley. In *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*, CAB International, Wallingford, UK. (Shewry, P.R., ed.) pp. 335-350.
- Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A., Boulter, D. 1992. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance, in: *Biotechnology in Agriculture nº 7: Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*, CAB International, pp. 155–181.

- Gomes, A.D., Dias, S.C., Bloch Jr, C., Melo, F.R., Furtado Jr, J.R., Monnerat, R.G., Grossi-de-Sá, M.F. & Franco, O.L. 2005. Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds. *Comparative Biochemistry Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, v. 140, n. 2, p. 313-319.
- Greenberg, J. T., and Yao, N. 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiology*, 6:201-211.
- Grossi de Sá, M.F., Mirkov, T.E., Ishimoto, M., Colucci, G., Bateman, K.S. & Chrispeels, M.J. 1997a. Molecular characterization of a bean  $\alpha$ -amylase inhibitor that inhibits the  $\alpha$ -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. *Planta*, 203: 295-303.
- Grossi de Sá, M.F., and Chrispeels, M.J. 1997b. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 271-281.
- H. Fuwa. 1954. A new method of microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. *J. Biochem.* 41, 583–603.
- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G., 1996. Resistance gene dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8:1773-1791.
- Heil, M., and Bostock, R.M. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defenses. *Ann. Bot.*, 89:503-512.
- Heinis, C., Huber, A., Demartis, S. et al. 2001. Selection of catalytically active biotin ligase and trypsin mutants by phage display. *Protein Eng.*, Vol. 14, pp. 1043–1052.
- Hilder, V. A., Boulter, D. 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance a critical review. *Crop Protection* 18, 177-191.
- Ishimoto, M. & Kitamura, K. (1989) Growth inhibitory effects of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *Appl. Ent. Zool.* 24, 281-286.
- Ishimoto, M. and Chrispeels, M.J. 1996. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of  $\alpha$ -amylase inhibitor in the common bean. *Plant Physiology*, 11: 393-401.
- Iulek, J., Franco, O.L., Silva, M., Slivinski, C.T., Bloch Jr, C., Rigden, D.J. & Grossi de Sá, M.F. 2000. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereale* (Rye). *Inter. J. Biochem. Cell Physiol.* 32, 1195-1204.
- Jennings, C., West, J., Waine, C., Craik, D. and Anderson, M. 2001. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: The cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *PNAS, U.S.A.*, 98:10614-10619.
- Jouanin, L., Bonadé-Bottino, M., Girard, C., Morrot, G., Giband, M. 1998. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science* 131,1–11.
- Kanzaki, H., Nirasawa, S., Saitoh, H., Ito, M., Nishihara, M., Terauchi, R. and Nakamura, I. 2002. Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. *Theor. Appl. Genet.*, 105, 809-814.

- Kasahara, K., Hayashi, K., Arakawa, T., Philo, J.S., Wen, J., Hara, S. & Yamaguchi, H. 1996. Complete sequence, subunit structure and complexes with pancreatic  $\alpha$ -amylase of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney beans. *J. Biochem.*, 120: 177-183.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M., McPherson, J. 1987. Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes. *Science, New Series*, Vol. 236, No. 4806, pp. 1299-1302.
- Kiczak, L., Kasztura, M., Koscielska-Kasprzak, K., Dadlez, M., Otlewski, J. 2001. Selection of potent chymotrypsin and elastase inhibitors from M13 phage library of basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1550: 153-163.
- Koike M., Okamoto T., Tsuda S. and Imai R., 2002. A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 298:46-53.
- Koncz, C.; Schell, J. 1986. The promoter of T-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics*, v.204, p.383-396.
- Koukiekoulou, R., Desseaux, V., Moreau, Y., Marchis-Mouren, G. & Santimone, M. 2001. Mechanism of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. Inhibition of amylose and maltopentaose hydrolysis by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\chi$ -cyclodextrins. *Eur. J. Biochem.* 268, 841-848.
- Koukiekoulou, R., Le Berre-Anton, V., Desseaux, V., Moreau, Y., Rouge, P., Marchis-Mouren, G. & Santimone, M. 1999. Mechanism of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. Inhibition of amylose and maltopentaose hydrolysis by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor and comparison with that by acarbose. *Eur. J. Biochem.* 265, 20-26.
- Krook, M., Lindbladh, C., Eriksen, J.A. and Mosbach, K. 1997. Selection of a cyclic nonapeptide inhibitor to  $\alpha$ -chymotrypsin using a phage display peptide library. vol. 3, n° 3, 149-159.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lai, F.M., DeLong, C., Mei, K., Wignes, T. and Fobert, P.R. 2002. Analysis of the DRR230 family of pea defensins: gene expression pattern and evidence of broad host-range antifungal activity *Plant Sci.*, 163, 855-864.
- Lamb, C. and Dixon, R. A., 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:251-275.
- Lamb, C. J., Lawton, M. A., Dron, M., and Dixon, R. A. 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56, 215-224.
- Lay, F.T. and Anderson, M.A. 2005. Defensins – Components of the Innate Immune System in Plants. *Curr. Prot. and Pep. Sc.*, 6:85-101.
- Liu, D., Raghobama, K.G., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. 1994. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1888-1892.
- Loo, B. van, Spelberg, J.H.L., Kingma, J., Sonke, T., Wubbolts, M.G., and Janssen, D.B. 2004. Directed Evolution of Epoxide Hydrolase from *A. radiobacter* toward

- Marcus, J.P., Goulter, K.C., Green, J.L., Harrison, S.J. and Manners, J.M. 1997. Purification, characterisation and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. *Eur. J. Biochem.*, 244:743-749.
- Marshall, J.J.; Lauda, C.M. 1975. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of  $\alpha$ -amilase, from kidney bean, *Phaseolus vulgaris*, *Journal of Biological Chemistry*, 250,(20): 8030-8037.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. *Nature* 348, 552–554 (1990).
- McConnell,S.J. and Hoess,R.H. 1995. Tendamistat as a scaffold for conformationally constrained phage peptide libraries. *J. Mol. Biol.*, 250, 460–470.
- McManus, A.M., Nielsen, K.J., Marcus, J.P., Harrison, S.J., Green, J.L., Manners, J.M. and Craik, D.J. 1999. MiAMP1, a novel protein from *Macadamia integrifolia* adopts a Greek key beta-barrel fold unique amongst plant antimicrobial proteins. *J. Mol. Biol.* 293:629-638.
- Melo, F.R., Mello, M.O., Rigden, D.J., Mello, L.V., Genu, A.M., Franco, O.L.; Silva-Filho, M.C., Gleddie, S. & Grossi de Sa, M.F. 2003. Use of Phage display to select novel cystatins specific for *Acanthoscelides obtectus* cysteine proteinases. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1651, n. 1, p. 146-152.
- Melo,F.R., Sales, M.P., Silva, L.S., Franco,O.L., Bloch,C. Jr and Ary, M.B. 1999.  $\alpha$ -Amylase from cowpea seeds. *Prot. Pept. Lett.* 6, 387-392.
- Monnerat, R.G., Dias, S. C., Oliveira-Neto, O.B. De, Nobre, S.D., Silva-Werneck, J.O., Grossi de Sá, M.F. 2000. Criação massal do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* em laboratório. *Comunicado Técnico*, nº 46, p. 14.
- Morton,R.L., Schroeder, H.E., Bateman,K.S., Chrispeels,M.J., Armstrong, E. & Higgins, T.J.V. 2000. Bean alpha-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97 (8), 3820-3825.
- Moscardi, F. 1998. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo, p. 509- 539 In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*, Piracicaba, Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, p.1163.
- Nahoum, V., Farisei, F., Le-Berre-Anton, V., Egloff, M.P., Rouge, P., Poerio, E. & Payan, F. 1998. A plant-seed inhibitor of two classes of alpha-amylases: X-ray analysis of *Tenebrio molitor* larvae alpha-amylase in complex with the bean *Phaseolus vulgaris* inhibitor. *Acta Biol. Crystal. D.*, 55: 360-362.
- Nakaguchi, T.,Arakawa, T., Philo, J.S.,Wen, J., Ishimoto, M.& Yamaguchi, H. 1997. Structural characterization of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from a wild common bean (*Phaseolus vulgaris*): insight into the common structural features of leguminous  $\alpha$ -amylase inhibitors. *J. Biochem.*, 121: 350-354.
- Nishizawa, K., Teraishi, M., Utsumi, S., Ishimoto, M. 2006. Assessment of the importance of a-amylase inhibitor-2 in bruchid resistance of wild common bean. *Theor. Appl. Genet.* DOI 10.1007/s00122-006-0476-y.
- O'Donnell, M.D., Fitzgerald, O. & McGeeney, K.F. 1997. Differential serum amylase determination by use of an inhibitor and design of a routine procedure. *Clin. Chem.* 23, 560-566.

- Oerke, E.C., Dehne, H.W., SchoK nbeck, F., Weber, A., 1994. Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops. Elsevier, Amsterdam. 590–594.
- Oliveira-Neto, O.B., Batista, J.A.N., Rigden, D. J., Franco, O. L., Falcão, R., FragoSo, R.R., Mello, L. V., Santos, R.C. dos, Grossi-de-Sá, M. F. 2003. Molecular Cloning of  $\alpha$ -Amylases from Cotton Boll Weevil, *Anthonomus grandis* and Structural Relations to Plant Inhibitors: An Approach to Insect Resistance. *Journal of Protein Chemistry*, 22(1): 77-87.
- Oliveira-Neto, O.B., Batista, J.A.N., Rigden, D.J., FragoSo, R.R., Silva, R.O., Gomes, E.A., Franco, O.L., Dias, S.C., Cordeiro, C.M.T., Monnerat, R.G. & Grossi de Sa, M.F. 2004a. A diverse family of serine proteinase genes expressed in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*): Implications for design of pest-resistant transgenic cotton plants. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, v. 34, n. 9, p. 903-918.
- Oliveira-Neto, O.B., Batista, J.A.N., Rigden, D.J., Franco, O.L., FragoSo, R.R., Monteiro, A.C. S., Monnerat, R.G. & Grossi de Sa, M.F. 2004b. Molecular cloning of a cysteine proteinases cDNA from cotton boll weevil *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 68, n. 6, p. 1235-1242
- Oudjeriouat, N., Moreau, Y., Santimone, M., Svensson, B., Marchis-Mouren, G., and Desseaux, V. 2003. On the mechanism of  $\alpha$ -amylase: Acarbose and cyclodextrin inhibition of barley amylase isozymes. *FEBS J.* 270, 3871-3879.
- Patel, S.U., Osborn, R., Rees, S. and Thornton, J.M. 1998. Structural Studies of *Impatiens balsamina* Antimicrobial Protein (Ib-AMP1). *Biochemistry*, 37: 983-990.
- Pellegrini, P. B., Franco, O. L. 2005. Plant gamma-thionins - novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins . *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology*, v. 37, p. 2239-2253.
- Pennell, R.I. and Lamb, C., 1997. Programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 9(7):1157-1168.
- Prescott, V.E., Campbell, P.M., Moore, A., Mattes, J., Rothenberg, M.E., Foster, P.S., Higgins, T.J., Hogan, S.P. 2005. Transgenic expression of bean alpha-amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicity. *J Agric Food Chem.*53(23)-9023-30.
- Pusztai, A., Bardocz, G.G., Alonso, R., Chrispeels, M.J., Schroeder, H.E., Tabe, L.M., Higgins, T.J. 1999. Expression of the insecticidal bean alpha-amylase inhibitor transgene has minimal detrimental effect on the nutritional value of peas fed to rats at 30% of the diet. *Journal Nutr.* (8):1597-603.
- Rahbé, Y., Deraison, C., Bonadé-Bottino, M., Girard, C., Nardon, C., Jouanin, L. 2003. Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduced performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape. *Plant Science* 164,441-450.
- Richardson, M. 1991. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: *Methods in Plant Biochemistry*, New York, Academic Press, Press, New York, v.5. p.259-305.
- Ryan, C.A.1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28:425-449.

- Sales, M.P., Gerhardt, I.R., Grossi-de-Sá, M.F. & Xavier-Filho, J. 2000. Do legumes storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? *Plant Physiol.*, 124:515-522.
- Sarmah, B.K., Moore, A., Tate, W., Molvig, L., Morton, R.L., Rees, D.P., Chiaiese, P., Chrispeels, M.J., Tabe, L.M., Higgins, T.J.V. 2004. Transgenic chickpea seeds expressing high levels of a bean  $\alpha$ -amylase inhibitor, *Mol. Breed.* Vol. 14, n° 1, 73-82.
- Segura, A., Moreno, M., and Garcia-Olmedo, F. 1993. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. *FEBS Lett.*, 332:243-246.
- Selitrennikoff, C.P. 2001. Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no.7, p. 2883-2894.
- Shade, R.E., Schroeder, H.E., Pueyo, J.J., Tabe, L.M., Murdock, L.L., Higgins, T.J.V., Chrispeels, M.J. 1994. Transgenic pea seeds expressing the  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles, *Bio:Technology* 12, 793-796.
- Showalter, A.M. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*. 5: 9-23.
- Shroeder, H.E., Gollash, S., Moore, A. *et al.* 1995. Bean  $\alpha$ -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.), *Plant Physiol.* 107, 1233-1239.
- Silva, C.P., Terra, W. R., Xavier-Filho, J., Grossi de Sá, M.F., Isejima, E. M., DaMatta, R.A., Miguens, F.C., Bifano, T.D. 2001. Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of  $\alpha$ -amylases in response to different diets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 41-50.
- Silva, C.P., Terra, W. R., Xavier-Filho, J., Grossi de Sá, M.F., Lopes, A. R., Pontes, E. G. 1999. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on  $\alpha$ -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 355-366.
- Silva, M.C.M. da, Grossi-de-Sa, M. F., Chrispeels, M.J., Togawa, R.C., and Neshich, G. 2000. Analysis of structural and physico-chemical parameters involved in the specificity of binding between  $\alpha$ -amylases and their inhibitors. *Protein Eng.* Vol. 13, n° 3, 167-177.
- Silva, M.C.M., Mello, L.V., Coutinho, M.V., Rigden, D.J., Neshich, G., Chrispeels, M.J. & Grossi de Sa, M.F. 2004. Mutants of common bean  $\alpha$ -amylase inhibitor-2 as an approach to investigate binding specificity to  $\alpha$ -amylases. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 3, p. 201-208.
- Soumillion, P., Jespers, L., Bouchet, M., Marchand-Brynaert, J., Winter, G. and Fastrez, J. 1994. Selection of beta-lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. *J. Mol. Biol.*, 237: 415-422.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M. & Fritig, B., 1993. Plant "pathogenesis-related" proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75: 687-706.
- Strobl, S., Maskos, K., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Ruth, F.X. & Glockshuber, R. 1998. A novel strategy for inhibition of  $\alpha$ -amylases: yellow meal worm  $\alpha$ -amylase in complex with the Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. *Structure* 6, 911-921.

- Suzuki, K., Ishimoto, M.; Kikuchi, F.; Kitamura, K. 1993. Growth inhibitory effect of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from the wild common bean resistant to the Mexican bean weevil (*Zabrotes subfasciatus*). Japanese Journal of Breeding. 43: 257-265.
- Taylor, R.H., Acland, D.P., Attenborough, S., Cammue, B.P., Evans, I.J., Osborn, R.W., Ray, J.A., Rees, S.B. and Broekaert, W.F., 1997. A Novel Family of Small Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Seed of *Impatiens balsamina* Is Derived from a Single Precursor Protein. J. Biol. Chem., 272:24480-24487.
- Tanaka, A.S., Sampaio, C.A, Fritz H. and Auerswald, E.A. 1995. Functional display and expression of chicken cystatin using a phagemid system. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 214, p. 389-395.
- Terras F.R., Eggermont K., Kovaleva V., Raikhel N.V., Osborn R.W., Kester A., Rees S.B., Torrekens S., Van Leuven F., Vanderleyden J., *et al.*, 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. Plant Cell, 7:573–588.
- Varner, J.E., and Lin, L.S., 1989. Plant cell wall architecture. Cell, 56:231-239
- Veen, B.A. van der, Potocki-Véronèse, G., Albenne, C., Joucla, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M. 2004. Combinatorial engineering to enhance amylosucrase performance: construction, selection, and screening of variant libraries for increased activity. FEBS Letters, 560: 91-97.
- Verhaert, R.M., Beekwilder, J., Olsthoorn, R., van Duin, J., Quax, W.J. 2002. Phage display selects for amylases with improved low pH starch-binding. J Biotechnol. 2002 Jun 13;96(1):103-18.
- Vilchez, S., Jacoby, J., Ellar, D. J. 2004. Display of biologically functional insecticidal toxin on the surface of  $\lambda$  phage. American Society for Microbiology. vol. 70, no11, pp. 6587-6594.
- Volpicella, M., Ceci, L.R., Gallerani, R., Jongmsa, M.A., and Beekwilder, J. 2001. Functional Expression on Bacteriophage of the Mustard Trypsin Inhibitor MTI-2. Biochemical and Biophysical Research Communications, 280: 813–817.
- Wang, J.D., Herman, C., Tipton, K.A., Gross, C.A., and Weissman, J.S. 2002. Directed Evolution of Substrate-Optimized GroEL/S Chaperonins. Cell, 111: 1027–1039.
- Yamagata, H., Kunimatsu, K., Kamasaka, H., Kuramoto, T. & Iwasaki, T. 1998. Rice bifunctional  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds. Biosci. Biotechnol. Biochem., 62: 978-985.
- Yamaguchi, H. 1993. Isolation and characterization of the subunits of a heat labile  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney bean. Biosci. Biotechnol. Biochem., 57: 297-302.
- Young, N.M., Thibault, P., Watson, D.C. & Chrispeels, M.J. 1999. Post-translational processing of two  $\alpha$ -amylase inhibitors and an arcelin from the common bean, *Phaseolus vulgaris*. FEBS Lett., 446: 203-206.
- Young, N.M., Watson, D.C., Yaguchi, M., Adar, R., Arango, R., Rodriguez-Arango, E., Sharon, N., Blay, P.K.S. & Thibault, P. 1995. C-Terminal post-translational proteolysis of plant lectins and their recombinant forms expressed in *Escherichia coli*. Characterization of 'ragged ends' by mass spectrometry. J. Biol.Chem., 270: 2563-2570.



- Zhang, X.C., Shao, H.L., Wang, J.X., Zhao, X. F., 2006. Purification and characterisation of an inhibitor of a cathepsin B-like proteinase from sunflower seed. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 21(4):433-439.
- Yuan, L., Kurek, I., English, J., and Keenan, R. 2005. Laboratory-Directed Protein Evolution. *Microb. and Mol. Biol. Reviews*, 373–392.
- Levina, A.M. and G. A. Weiss, G.A.2005. Optimizing the affinity and specificity of proteins with molecular display. *Mol. BioSyst.*, 2006, 2, 49–57
- Stemmer, W. P. C. 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature (London)* 370, 389-391.
- Zhang, J.-H., Dawes, G. & Stemmer, W. P. C. 1997. Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 94, 4504-4509.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem*, 72:248-54.
- Bernfeld, P. 1955. Amylase alpha and beta. *Methods Enzymol.*, 1:149-58.
- Barbas *et al.* 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 88, 7978-82.
- Ignacimuthu S. and Prakash, S. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea with  $\alpha$ -amylase inhibitor gene for insect resistance. *J. Biosc.* 31(3), 339-345
- Kluh I, Horn M, Hyblova J, Hubert J, Doleckova-Maresova L, Voburka Z, Kudlikova I, Kocourek F, Mares M. 2005. Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of alpha-amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*, 66(1):31-9.
- Pereira, R. A., Batista, J.A.N., Silva, M.C.M., Oliveira-Neto, O.B., Figueira, E.L.Z., Jimenez, A.V., Grossi de Sa, M.F. 2006. An alpha-amylase inhibitor gene from *Phaseolus cocconeus* encodes a protein with potential control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Phytochemistry*, 67: 2009-2016.
- Valência, A., Bustillo, A.E., Ossa, G.E. & Chrispeels, M.J. 2000.  $\alpha$ -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 207-213.
- Dayler, C.S.A., Mendes, P.A.M., Prates, M.V., Bloch Jr, C., Franco, O.L. & Grossi de Sa, M.F. 2005. Identification of a novel bean  $\alpha$ -amylase inhibitor with chitinolytic activity. *FEBS Letters*, 579(25):2561-2566.
- Franco, O.L., Melo, F.R., Mendes, P.A., Paes, N.S., Yokoyama, M., Coutinho, M.V., Bloch Jr, C. & Grossi de Sa, M.F. 2005. Characterization of two *Acanthoscelides obtectus*  $\alpha$ -amylases and their inactivation by wheat inhibitors. *J Agricultural Food Chemistry*, v. 53, n. 5, p. 1585-1590.