



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

Avaliação da Atividade Biológica de Proteínas de
Defesa Vegetal Expressas em Sistemas Heterólogos

Rafael Perseghini Del Sarto

Brasília
2012

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

Avaliação da Atividade Biológica de Proteínas de Defesa Vegetal Expressas em Sistemas Heterólogos

Rafael Perseghini Del Sarto

Orientadora: Maria Fátima Grossi de Sá

Co-orientadora: Maria Cristina Mattar da Silva

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas/Biologia Molecular.

Brasília
2012

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 e co-orientação da Dra. Maria Cristina Mattar da Silva.

Aprovado por:

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

Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres
Universidade de Brasília-UnB
Membro Titular da Banca Examinadora

Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes
Universidade de Brasília-UnB
Membro Titular da Banca Examinadora

Dra. Simoni Campos Dias
Universidade Católica de Brasília-UCB
Membro Titular da Banca Examinadora

Dr. Antônio Américo Barbosa Viana
Universidade Católica de Brasília-UCB
Membro Titular da Banca Examinadora

Dra. Patrícia Barbosa Pelegrine
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Membro Suplente da Banca Examinadora

**Dedico este trabalho aos meus Filhos, Catarina, Igor e Ian, aos meus Pais Lia e David,
ao meu Irmão Fábio e Vitor e principalmente a Minha incondicional amiga e esposa
Larissa.**

Agradecimentos

Agradeço,

Aos meus pais, David e Lia por tudo que fizeram e fazem por mim e aos meus irmãos Fábio e Vitor;

À minha eterna amiga e maravilhosa esposa Larissa, suave como à brisa e firme como uma rocha em todos os momentos de aflição que passei;

À Catarina (mocotó lindo), Igor (monstrão manhoso) e Ian (mais monstro ainda) meus gostosos filhotes que me encheram de energia para finalizar esta jornada;

À minha amiga Ariane que me suportou com minhas “chatices” e “agitações” de laboratório e também pela gigantesca ajuda durante o desenvolvimento do trabalho, serei eternamente grato e ao nobre colega Thiago que também participou desta jornada como um nobre guerreiro;

À Dra. Fátima, pela compreensão em todos os momentos de convivência e possibilidade de me formar junto ao seu grupo de pesquisa;

À Fabíola, colega de trabalho que tanto contribuiu com os trabalhos do nosso grupo;

À Cristina, pela ajuda despendida sempre com nobres intenções, pela orientação profissional e pessoal direcionada em tantos momentos;

Aos colegas de laboratório que contribuíram com a minha formação cada um com sua singularidade;

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 recebeu acolhedoramente, a Universidade de Brasília, a Facual, Fialgo, CAPES e CNPq;

E finalmente e principalmente, ao GADU.: que me guiou durante toda esta empreitada, sustentando-me e me animando em cada momento de atribulação.

“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

Índice de Figuras e Tabelas	ix
Abreviaturas	xi
Resumo	xii
<i>Abstract</i>	xiii
CAPÍTULO I	
Introdução Geral	14
CAPÍTULO II	
Validação da Atividade de Inibidores de α -amilase recombinantes contra α -amilase de bicudo do algodoeiro produzidos em <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
Inibidores de α -amilases	24
Objetivo Geral	27
Objetivos específicos	28
Materiais e Métodos	29
Produção de Plantas de <i>A. thaliana</i> Expressando Inibidores de α -amilase	29
Extração de Proteínas de Plantas de <i>A. thaliana</i> Geneticamente Modificadas	29
Análise da Expressão dos Inibidores de α -amilase Variantes em plantas de <i>A. thaliana</i> utilizando <i>Western Blot</i> e Ensaio de ELISA	30
Validação <i>in vitro</i> da Atividade dos Inibidores Recombinantes Seleccionados contra α -amilases do Bicudo do Algodoeiro	31
Resultados	33
Extração de Proteínas de Plantas de <i>A. thaliana</i> Geneticamente Modificadas	33
Análise da Expressão dos Inibidores de α -amilase em plantas de <i>A. thaliana</i> utilizando <i>Western Blot</i> e Ensaio de ELISA	34
Validação da Atividade Inibitória dos Inibidores de α -amilase Recombinantes contra α -amilases do bicudo do algodoeiro	37
CAPÍTULO III	
Avaliação da Atividade de Defensinas Recombinantes de Ervilha (Drr230a) e Girassol (SD2) produzidas em <i>Pichia pastoris</i>	39
Introdução	39
DEFENSINAS VEGETAIS	39

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DEFENSINAS VEGETAIS	40
Objetivo Geral	43
Objetivos Específicos	44
Materiais e Métodos	45
Sub-clonagem e Expressão dos genes de defensinas <i>Drr230a</i> e <i>SD2</i> em <i>Pichia pastoris</i>	45
Transformação de <i>Pichia pastoris</i>	46
Expressão de Defensinas Vegetais (DRR230a e SD2) em <i>Pichia pastoris</i>	46
Purificação de rDRR230a e rSD2 por IMAC	47
Avaliação de Atividade Antifúngica e Antibacteriana	47
Bioensaios contra Fungos Fitopatogênicos	47
Bioensaios contra Bactérias	48
Resultados	49
Sub-clonagem e Expressão dos genes de defensinas <i>Drr230a</i> e <i>SD2</i> em <i>Pichia pastoris</i>	49
Transformação de <i>Pichia pastoris</i>	52
Expressão de Defensinas Vegetais (DRR230a e SD2) em <i>Pichia pastoris</i>	52
Purificação de rDRR230a e rSD2 por IMAC	54
Avaliação de Atividade Antifúngica e Antibacteriana das Defensinas Vegetais Recombinantes	56
Bioensaios contra Fungos Fitopatogênicos	56
Bioensaios contra Bactérias	63
Discussão	65
Conclusão e Perspectivas	74
Referências Bibliográficas	76
Anexo I: Documento de submissão de patente AIs	88
Anexo II: Manuscrito em correção da defensina vegetal rDRR230a	91
Anexo III: Artigos publicados	97

Índice de Figuras e Tabelas

CAPÍTULO I

Tabela 1: Comparação entre diferentes sistemas heterólogos de expressão	15
Tabela 2: Mensuração da presença de açúcares redutores nas amostras dos inibidores de α -amilase extraídos de plantas <i>A.thaliana</i>	33
Figura 1: Alinhamento múltiplo de seqüências dos inibidores de α -amilase 1 (α -AI1) e 2 (α -AI2) de feijão comum	25
Figura 2: Representação esquemática do procedimento de <i>biopanning</i> para seleção de variantes de inibidores de α -amilases com afinidade para AGA	26

CAPÍTULO II

Figura 3: Representação esquemática e alinhamento múltiplo de seqüência peptídica dos inibidores de α -amilase selecionados contra α -amilases de bicudo do algodoeiro	35
Figura 4: Imunodetecção dos inibidores de α -amilase expressos em folhas de <i>A. thaliana</i> geneticamente modificadas	36
Figura 5: Análise da expressão dos inibidores de α -amilase recombinantes expressos em plantas de <i>A. thaliana</i>	37
Figura 6: Análise da atividade inibitória dos inibidores de α -amilase expressos em plantas de <i>A. thaliana</i>	38

CAPÍTULO III

Figura 7: Representação esquemática do plasmídeo resultante da sub-clonagem dos genes das defensinas vegetais Drr230a (genbank accession AF525685) e SD2 (genbank accession AF178634) no plasmídeo de expressão em levedura <i>Pichia pastoris</i> pPICZ α A [®] (Invitrogen, Co.)	50
Figura 8: Sequenciamento dos plasmídeos construídos com os genes das defensinas vegetais <i>Drr230a</i> e <i>SD2</i> e o vetor para expressão em <i>Pichia pastoris</i>	51
Figura 9: Análise da expressão das defensinas vegetais recombinantes rDrr230a e rSD2 produzidas em <i>Pichia pastoris</i>	53
Figura 10: Análise da purificação das defensinas vegetais recombinantes rDRR230a e rSD2 em cromatografia de afinidade usando metal quelado (IMAC)	55
Figura 11: Bioensaio de inibição de crescimento de hifas do fungo fitopatogênico <i>Fusarium solani</i> sp. glycine utilizando a defensina vegetal recombinante rDrr230a	57
Figura 12: Bioensaio de inibição de crescimento de hifas do fungo fitopatogênico <i>Colletotricum gossypii</i> var <i>cephalosporioides</i> utilizando a defensina vegetal recombinante rDrr230a	57
Figura 13: Bioensaio de inibição de crescimento de hifas do fungo fitopatogênico <i>Fusarium solani</i> sp glycine utilizando a defensina vegetal recombinante rSD2	58
Figura 14: Bioensaio de inibição de crescimento de hifas do fungo fitopatogênico <i>Colletotricum gossypii</i> var <i>cephalosporioides</i> utilizando a defensina vegetal recombinante	

rSD2
59

Figura 15. Bioensaio de germinação de esporos contra o fungo fitopatogênico *Collethotricum gossypii* var. *cephalosporioides* usando as defensinas vegetais recombinantes rDrr230a e rSD2 60

Figura 16. Bioensaio de germinação de esporos contra o fungo fitopatogênico *Fusarium solani* sp. glycine usando as defensinas vegetais recombinantes rDrr230a e rSD2 62

Figura 17. Avaliação da atividade antibacteriana da defensina vegetal recombinante rDrr230a 64

Abreviaturas

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: ensaio imunoabsorvente acoplado a enzima (enzyme-linked immunosorbent assay)
HRP: peroxidase
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPTG: β -D-tio-galactosídeo
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
RyeIII: inibidor de α -amilase extraído de centeio
SB: super broth
TBS: tampão tris-salino

RESUMO

Vários sistemas para expressão de proteínas estão disponíveis para a produção dessas macromoléculas em quantidades necessárias para sua caracterização estrutural ou da sua atividade biológica. São considerados importantes ferramentas biotecnológicas com a finalidade científica, clínica e industrial. Nesse contexto, surge o termo expressão heteróloga caracterizando a produção de uma determinada ou um conjunto de proteínas em sistemas biológicos diferentes do sistema original. Neste trabalho foram avaliados o potencial de proteínas recombinantes para o controle de insetos-praga e fitopatógenos de interesse agrônomico. Inicialmente, a expressão de inibidores de α -amilase recombinantes produzidos em plantas de *Arabidopsis thaliana* foi analisada. O nível de expressão dos inibidores AIC3, AIA11 e AIG4 observado foi de $\approx 0,2-0,3\%$ das proteínas totais solúveis de folha de plantas geneticamente modificadas. Em relação as suas atividades biológicas, na concentração de ≈ 35 nM foi possível reduzir significativamente a atividade enzimática de α -amilases intestinais do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis*, a molécula utilizada previamente para seleção dos inibidores por *phage display*. Estes resultados demonstram o potencial das moléculas recombinantes para o controle do bicudo do algodoeiro, importante inseto-praga para a cultura do algodoeiro. No mesmo sentido, em relação aos fitopatógenos, as defensas vegetais DRR230a de ervilha e SD2 de girasol foram expressas na levedura *Pichia pastoris*. A produção das proteínas recombinantes foi de 3,5 e 3 mg/l, respectivamente. Após a purificação em coluna de Ni (His Trap FF Crude) das defensas recombinantes suas atividades antifúngica e antibacteriana foram avaliadas. As proteínas foram capazes de inibir o desenvolvimento das hifas dos fungos fitopatogênicos testados (*Colletotrichum gossypii* var *cephalosporioides* e *Fusarium solani* sp. *glycine*) em diferentes níveis, entretanto, apenas a rDRR230a foi capaz de inibir a germinação de esporos fúngicos. Ainda, esta molécula reduziu o crescimento de bactérias Gram negativas e positiva. Conjuntamente, estes dados demonstram o potencial de proteínas de defesa vegetal recombinantes para o controle de insetos-praga e patógenos de importância agrônômica.

Palavras-chaves: Proteínas recombinantes vegetais, insetos-praga, fitopatógenos, inibidores de alfa-amilase, defensas vegetais.

ABSTRACT

In this work was evaluated the potential of recombinant proteins in the control of insect pests and pathogens. To produce proteins for biochemical characterizations various protein expression systems has been developed. These are biotechnological tools applied in scientific, clinical and industrial field. In this context, the term heterologous expression characterize protein production in a different system the parental system. Here, the α -amylase recombinant inhibitors were expressed *Arabidopsis thaliana* plants. The expression level of inhibitors AIC3, AIA11 and AIG4 was $\approx 0.2-0.3\%$ of leaf total soluble proteins. The inhibitors were able to reduce α -amylase activity of cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*, enzyme activity in low concentration (35 nM). The cotton boll weevil α -amylase was previously used as bait to selection inhibitors by phage display from combinatorial library. The results show the possible inhibitors effectiveness against cotton boll weevil, very important cotton crop insect-pest. Likewise, defensins from pea (DRR230a) and sunflower (SD2) were expressed in yeast *Pichia pastoris* and the recovery proteins reached 3,5 and 3 mg per culture liter, respectively. The recombinant defensins were purified by nickel column (His Trap FF Crude) and assay against fungi and bacteria were done. The hyphal growth of *Colletotrichum gossypii* var *cephalosporioides* and *Fusarium solani* sp. glycine was arrested by two defensins in different level. The rDRR230a was able to inhibit fungi spores germination, otherwise, rSD2 was not able. Yet, the Gram negative and positive grow was controlled by rDRR230. In this regard, rDRR230a is a antimicrobial peptide (AMP) and rSD2 antifungal peptide (AFP). Together, the results show the potential use of recombinant α -amylase inhibitor or plant defensins on management insect-pest and pathogens by crops genetic modification.

Key-words: recombinant proteins, insect-pests, plant pathogens, alpha-amylase inhibitors, plant defensins.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

Sistemas Heterólogos para Produção de Proteínas Recombinantes

Naturalmente, as proteínas produzidas endogenamente pelos organismos necessitam de processamentos específicos relacionados à sua expressão. Tais processamentos podem ser glicosilações, acetilações, formação de ligações específicas, processamento proteolítico, enfim, qualquer necessidade relacionada ao desempenho da sua atividade biológica (Desai *et al.*, 2010). Nesse sentido, visando a produção em quantidades necessárias para caracterizações bioquímicas dessas macromoléculas vários sistemas para expressão de proteínas foram desenvolvidos ao longo dos anos. Estes protocolos se tornaram importantes ferramentas biotecnológicas com a finalidade científica, clínica e industrial. Nesse contexto, surge o termo expressão heteróloga caracterizando a produção de uma determinada ou um conjunto de proteínas em sistemas biológicos diferentes do sistema original (Mahmoud, 2007). Essas inovações técnicas foram impulsionadas pelas necessidades geradas no mercado mundial principalmente pelo interesse na produção em larga escala de produtos biofarmacêuticos, estima-se que no ano de 2010 a movimentação econômica foi da ordem de aproximadamente 70 bilhões de dólares (Potvin *et al.*, 2012).

Na literatura, são citados basicamente os seguintes sistemas para a produção de proteínas em sistemas heterólogos aqui citados cronologicamente em relação a sua divulgação: bacteriano, 1977, (*Escherichia coli* como representante), células de mamíferos, 1980, (CHO), leveduras, 1981, (*Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*), células de inseto, 1983, (*Spodoptera frugiperda*, Sf21), e finalmente células vegetais ou plantas, 1986 (Desai *et al.*, 2010). As características distintivas de cada um desses sistemas justifica a sua escolha para produção de uma determinada proteína. Por exemplo, células procarióticas são de fácil manipulação e o custo associado é menor quando comparado com os outros sistemas disponíveis, entretanto, processamentos pós-traducionais “complexos” (ex. glicosilações em sítios específicos, processamento proteolítico em organelas específicas, dentre outros) não são realizados ocasionando possíveis problemas relacionados à atividade biológica da proteína. Contudo, para moléculas previamente caracterizadas e que não necessitam dessas complexas

modificações tais sistemas podem se tornar a opção mais adequada. Na tabela 1 são sumarizadas as principais características de cada um dos sistemas heterólogos citados.

Tabela 1: Comparação entre diferentes sistemas heterólogos de expressão

Sistema	Custo de Produção ^a	Tempo de escalonamento	Capacidade de escalonamento	Nível de Expressão	Glicosilação ^b	Riscos de contaminação	Custo com armazenamento
bactéria	+	+	+++	alto	ausente	endotóxicas	moderado
levedura	++	++	+++	baixo-alto	alta manos	risco baixo	moderado
células de inseto	+++	++	++	baixo-alto	alta manos	alto	alto
células de mamífero	+++	+++	-	baixo-mod	simil	vírus e prions	alto
células vegetais	+	+	+++	mod-alto	red ≠	baixo risco	baixo
plantas transgênicas	-	+++	++++	mod-alto	red ≠	baixo risco	baixo

^a+=: baixo; ++: médio; +++: alto; ++++: muito alto; -: muito baixo.

^b=Perfil de glicosilação considerado em relação a proteínas humanas
Adaptado de Dasei *et al.*, 2010.

Neste trabalho, duas classes de proteínas de defesa vegetal (inibidores de alfa-amilase do tipo lectina e defensinas vegetais- discutidos nos capítulos II e III, respectivamente) foram expressas em diferentes sistemas heterólogos em virtude das suas características peculiares necessárias para avaliação de sua atividade biológica. Os inibidores de alfa-amilase estudados neste trabalho originaram-se a partir da seleção de inibidores a partir de uma biblioteca combinatoria do tipo *Phage Display* construída por meio de DNA *shuffling* usando os inibidores α -AI 1 e 2 de feijão comum e α -amilase do bicudo do algodoeiro como “isca” durante o procedimento de seleção (Del Sarto, 2007). Para a expressão de inibidores de α -amilase do tipo lectina (Capítulo II) sabe-se que tais moléculas requerem um processamento específico para sua atividade biológica (Young, *et al.*, 1999). Dessa forma, optou-se pela planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Clough e Bent, 1998), que é de fácil transformação e manipulação, para produção de proteínas variantes selecionados contra α -amilases de bicudo do algodoeiro (Del Sarto, 2007), para a obtenção de quantidades necessárias para avaliação das suas atividades biológicas *in vitro*. A segunda classe de moléculas estudadas neste trabalho pertence à classe das defensinas vegetais. Os genes das defensinas aqui estudadas foram gentilmente cedidos por grupos colaboradores do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (LIMPP) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para utilização em programas de evolução molecular *in vitro* e por esta razão a produção das proteínas selvagens foi necessária para a devida comparação das suas atividades com as das moléculas desenvolvidas. Da mesma forma, a literatura já demonstrou as características físico-químicas necessárias para estas proteínas serem ativas (Thoma and Thevissen, 2002). Um exemplo é a necessidade de formação de quatro pontes di-sulfeto que estabilizam a estrutura protéica. Assim, a levedura *P. pastoris* foi escolhida por permitir que tais necessidades fossem supridas para novamente propiciar a avaliação da atividade biológica das proteínas

recombinantes contra organismos fitopatogênicos. Nesse contexto, brevemente serão descritos os dois sistemas aqui empregados.

Plantas como Sistema Heterólogo para Produção de Proteínas

Plantas geneticamente modificadas usadas como sistema de expressão possuem várias características vantajosas em relação a outros sistemas. Por exemplo, são de fácil escalonamento na agricultura tornando-se extremamente competitivas economicamente e logisticamente (Mahmound *et al.*, 2007). Baseado nas informações sobre a proteína de interesse que deverá ser produzida alguns aspectos para a escolha do sistema adequado deverão ser feitos: escolha da planta (mono ou dicotiledônea, planta usada como alimento); do método de transformação; parâmetros da expressão, sobre o tipo de expressão (transiente ou estável, constitutivo ou tecido específico); e sobre localização: intracelular, citoplasma, cloroplasto, apoplastos (Egelkroust *et al.*, 2012).

Dentre as vantagens oferecidas pelas plantas para produção de proteínas heterólogas pode-se citar os custos de produção. Segundo Twyman *et al.*, 2003 o sistema produz a proteína de interesse com redução de custo de 90-98% quando comparado com sistemas microbianos fermentativos e 99,9% quando comparado com células de mamíferos. Ainda, de acordo com o mesmo autor, o direcionamento para vários tipos celulares pode permitir que a proteína seja mais estável fornecendo uma vantagem logística (ex. transporte sem refrigeração). O escalonamento pode ser alcançado com o cultivo de grandes áreas para alcançar a produtividade desejada (Desai *et al.*, 2010). Aditivamente, devido às plantas não serem suscetíveis a patógenos humanos o risco de contaminação de proteínas terapêuticas com microorganismos patogênicos é menor em comparação ao sistema animal (Giddings *et al.*, 2000). Ainda no contexto das vantagens, uma importante característica do sistema vegetal é que a proteína pode ser expressa numa região comestível da planta que após ingestão funcionaria como uma vacina, reduzindo passos de processamentos pós-produção que dificultam o escalonamento para atingir-se a produtividade desejada, ex. vacina da raiva produzida em tomate (Mason *et al.*, 2002). Além disso, quando o processamento pós-expressão é necessário normalmente é mais fácil e barato, principalmente quando a proteína é expressa de forma tecido-específica (Seon *et al.*, 2002) e finalmente as plantas fazem a maioria das modificações pós-traducionais necessárias para estabilidade, bioatividade e farmacocinética da proteína recombinante (Faye & Gomord, 2004).

Mesmo possuindo várias vantagens, o sistema vegetal para produção de proteínas heterólogas possui basicamente duas principais complicações. Normalmente o nível de expressão e o nível de acumulação da proteína são baixos e o há uma alta incidência de modificações pós-traducionais incorretas, como glicosilações indesejadas. Isto pode tornar a proteína de interesse alergênica tornando-se inviável para uso com fins terapêuticos. Vários grupos já se dedicam a superar essas limitações buscando por estratégias que contornem esses problemas (Streatfield, 2007).

A bibliografia exhibe uma quantidade significativa de trabalhos relacionados à produção de proteínas recombinantes em plantas, tanto com a finalidade de obtenção de plantas geneticamente modificadas para a agricultura, como para a produção de proteína com finalidade para pesquisa e terapêutica (Egelkrout, *et al.*, 2012; Desai, *et al.*, 2010).

Levedura *P. pastoris* e Produção de Proteínas Recombinantes

Desde o seu desenvolvimento como sistema de expressão mais de 500 proteínas exógenas foram produzidas na levedura metilotrófica *P. pastoris*, alcançando até 80% das proteínas secretadas ou 30% da proteínas totais (Potvin *et al.*, 2012). Esse potencial justifica-se por uma série de fatores, mas, sumariamente, é considerada como um dos mais versáteis sistemas para expressão heteróloga de proteínas. Ao longo do texto serão destacadas algumas características que compõem o sistema e citadas algumas proteínas que foram produzidas no sistema com sucesso, dando enfoque para proteínas de defesa vegetal da classe das defensinas vegetais.

A levedura metilotrófica *P. pastoris* foi descrita à cerca de 40 anos pelo grupo do pesquisador Koichi Ogata (1969) que descreveu a capacidade de determinadas leveduras utilizarem metanol como fonte de carbono e energia (Cereghino & Cregg, 2000). Devido a esta característica pensou-se no organismo como potencial fonte de proteína para alimentação animal devido à alta disponibilidade de metanol à época. Durante a década de 1970, a Companhia Phillips de Petróleo estabeleceu as condições ideais de crescimento em meio de cultura e protocolos para manipulação de *P. pastoris* usando metanol e alta densidade celular. Entretanto, uma crise econômica relacionada ao petróleo, matéria prima de produção de metano, e aumento da competitividade do preço da soja, resultou no abandono da idéia de utilização dessas leveduras como fonte de proteína animal (Cereghino & Cregg, 2000).

Na década de 80, a empresa que iniciou a manipulação de *P. pastoris* estabeleceu uma colaboração com o Instituto de Biotecnologia Industrial Salk associados Inc. (SIBIA) com o objetivo de desenvolver o sistema e adequá-lo para a expressão de proteínas heterólogas. Assim, foi isolado o promotor do gene álcool oxidase (usado até os dias atuais), foram desenvolvidos plasmídeos e estabelecidos protocolos de manipulação do organismo. Então, o sistema para expressão heteróloga foi patenteado em 1993 e foi concedida a licença para a empresa Invitrogen, Co., comercializar o sistema. Até hoje a companhia o faz e propondo novas estratégias para aumentar a capacidade e atender peculiaridades bioquímicas de proteínas exógenas para expressão em *P. pastoris* (Cereghino & Cregg, 2000).

A levedura *P. pastoris* é particularmente interessante como sistema de expressão devido a forte regulação e força de indução do promotor pAOX1 induzível por metanol, sua capacidade de secreção da proteína exógena e realização de modificações pós-traducionais como glicosilação e formação de pontes dissulfeto, habilidade de crescer em um meio definido em alta densidade celular agindo pelas vias respiratórias preferencialmente (Cos *et al.*, 2006), possui um genoma relativamente simples e de fácil manipulação, além da diversidade de kits para expressão disponíveis no mercado (Invitrogen, Co, 2011).

A levedura *P. pastoris* utiliza metanol como fonte de carbono por meio da síntese de enzimas necessárias a sua oxidação a partir da indução dos genes correlatos quando há presença do álcool. Quando isto ocorre, grandes quantidades das enzimas necessárias para o metabolismo do metanol são detectadas. A enzima álcool oxidase (AOX) catalisa o primeiro passo da oxidação do metanol formando moléculas como formaldeído e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) dentro dos peroxissomos. Catalases peroxissomais degradam o peróxido de hidrogênio e o formaldeído que difunde para o citoplasma e é oxidado por desidrogenases a formato e dióxido de carbono gerando energia para o crescimento celular. O formaldeído remanescente no peroxissomo é utilizado para a formação de constituintes celulares como dihidroxiacetona formado pela enzima dihidroxiacetona sintase (DHAS). As duas enzimas AOX e DHAS são apenas detectadas em células crescendo em meio que contém metanol como fonte de carbono. Em fermentadores, o nível de AOX pode alcançar 30% das proteínas solúveis totais (Cereghino & Cregg, 2000).

As principais vantagens do sistema reside na alta capacidade de produção da proteína de interesse utilizando uma série de promotores induzíveis ou constitutivos como pGAP (Waterhan *et al.*, 1997), pPGK1 (Almeida *et al.*, 2005), pTEF1 (Ahn *et al.*, 2007), séries plasmídeais simples e de fácil manipulação (Invitrogen, Co), manejo facilitado da cultura, bom crescimento celular em diferentes condições que propiciem aumento da produtividade,

dentre outros (Cereghino & Cregg, 2000; Potvin *et al.*, 2012). Contudo, tal sistema possui desvantagens significativas. Dentre elas, a alta densidade celular pode propiciar um aumento na produção de proteases que podem degradar a proteína de interesse. Entretanto, foram desenvolvidas linhagens que são deficientes em proteases para minimizar a possibilidade de degradação da proteína exógena. Além disso, para alcançar altas produtividades há a necessidade do acompanhamento do processo de produção de biomassa, controle do indutor ou de produção de metabólitos tóxicos e controle da aeração. Ainda, os custos associados aos processamentos necessários após a produção da proteína exógena são altos. Contudo, tal sistema é considerado o mais robusto e realizável para a produção de proteínas recombinantes que necessitam de processamentos que os organismos procariotos não realizam (Potvin *et al.*, 2012).

Mecanismos de Defesa Vegetal e Plantas Geneticamente Modificadas

Insetos e patógenos estão continuamente provocando danos a diversas espécies vegetais, inclusive as de interesse agroeconômico. Isso ocorre com a utilização de moléculas que agem no sentido de superar as barreiras físicas e químicas de defesa naturalmente empregadas pelas plantas. Evolutivamente, as plantas contam com um mecanismo inato de defesa que permite os organismos se protegerem das pragas e patógenos garantindo o sucesso reprodutivo e o seu desenvolvimento (Carlini & Grossi de Sá, 2002). Após o contato com o patógeno, a resposta fisiológica relacionada à produção de moléculas pode ocorrer ou então durante o seu desenvolvimento natural substâncias são constitutivamente produzidas provocando um efeito protetor continuado (Lamb *et al.*, 1989).

O aparato de defesa vegetal compreende a utilização de proteínas e peptídeos (Stintzi *et al.*, 1993); espécies reativas de oxigênio, como radicais superóxido, hidroxil e peróxido de hidrogênio (Alvarez *et al.*, 1998); e acumulação de metabólitos secundários de baixa massa molecular como as fitoalexinas (Castro & Fontes, 2005).

Como *commodities* são cultivadas em grandes extensões e objetiva-se alcançar produtividades cada vez maiores, alternativas de controle de pragas e patógenos são essenciais para melhorar o sistema produtivo e reduzir as perdas relacionadas à ação desses organismos. Assim, como uma nova perspectiva, o emprego de proteínas com atividade biológica contra pragas e patógenos encontra-se como uma maneira de minimizar os efeitos ocasionados pelo uso de insumos químicos como inseticidas e pesticidas.

Isto se justifica, pois, no Brasil, a ocorrência de pragas e doenças tem gerado grandes perdas econômicas. Por exemplo, no caso de culturas de algodão as doenças fúngicas são as mais relevantes, causando sérios danos ao cultivo. Destacam-se as advindas do ataque dos fungos causadores da ramulose do algodoeiro (*Collethotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*), podridão vermelha da raiz (*Fusarium solani* f. sp. *glycines*) dentre outros.

Iamamoto (2003) considera a ramulose como sendo uma das mais significativas doenças associadas ao cultivo do algodoeiro. Disseminada em todo o território brasileiro, os maiores danos são causados nas regiões de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Nordeste. Segundo dados da literatura, prejuízos da ordem de 75% da produção podem ser ocasionados pela ramulose (Iamamoto *et al.*, 2001; Cassetari Neto *et al.*, 2001). Em relação à podridão vermelha da raiz da soja danos na produtividade revertidos em prejuízos econômicos são recorrentes em todo o Brasil (Freitas *et al.*, 2004).

Ainda, o algodoeiro é acometido com intenso ataque provocado pelo inseto *Anthonomus grandis*, também conhecido como bicudo do algodoeiro. Os danos ocorrem nos botões florais e maçãs da planta, podendo ocasionar perdas da totalidade do plantio. Por possuir duas fases endofíticas no seu ciclo de vida, a larval e a pupal, seriadas aplicações de inseticidas são necessárias para o seu controle, onerando de forma significativa os custos de produção do algodão (Bellettini *et al.*, 1998). No lúmen intestinal do bicudo do algodoeiro há a presença de enzimas hidrolíticas responsáveis pela digestão das macromoléculas presentes em sua dieta. Estudos bioquímicos relacionados à fisiologia do inseto demonstraram que este utiliza de um repertório de proteases e carboidrases para digestão de proteínas e amido presentes nas estruturas reprodutivas da planta que são usadas como fonte alimentar (Oliveira-Neto *et al.*, 2004a,b). Uma alternativa para controle dessa praga pode ser o emprego de inibidores dessas enzimas em programas de melhoramento vegetal, alternativamente aos métodos tradicionais (Carlini & Grossi-de-Sa, 2002; Sarmah *et al.*, 2004).

Com um número de cultivares limitado, o método de controle de doenças mais utilizado no país é a aplicação de agrotóxicos compreendendo cerca de 10% (arroz, milho, soja e trigo) até 30% das despesas de custeio da lavoura. Por exemplo, na região de Chapadão do Sul-MS, foram gastos R\$ 1.142,00 com agrotóxicos na cultura de algodão sendo que o valor do custo da lavoura por hectare foi de R\$ 3.213,00 (CONAB, 2011). A questão econômica aliada aos impactos ambientais reflete a importância do desenvolvimento de metodologias alternativas que visam minimizar tais custos sócio-econômicos.

Como uma alternativa aos métodos convencionais de controle de pragas e patógenos, que normalmente empregam enormes quantidades de insumos químicos, contaminam o ambiente e perfazem um significativo valor dos custos de produção, existe o emprego de metodologias que possibilitam a introdução de genes exógenos em organismos de interesse conferindo uma característica desejada, incluindo a resistência a pragas e patógenos.

Há vários relatos na literatura do emprego de plantas geneticamente modificadas visando o controle de pragas e patógenos. Por exemplo, plantas de tomate e tabaco expressando genes de δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) modificadas conferindo resistência a insetos. Estudos preliminares para avaliação do efeito das plantas expressando toxinas Bt em campo demonstraram que tabaco, batata, algodão, milho, arroz e tomate exibiram resistência a insetos (Hilder & Boudier, 1999).

Dentro dessa abordagem biotecnológica, a utilização de proteínas de defesa vegetal torna-se uma estratégia interessante para o controle de pragas e patógenos. De fato, estudos demonstraram a resistência a fungos fitopatogênicos conferida a plantas de tabaco expressando defensinas (Terras *et al.*, 1995; Koike *et al.*, 2002; Elfstrand *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2002). *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 *Meloidogyne incognita* (Jouanin *et al.*, 1998; Hilder e Boulter, 1999), e plantas de tabaco expressando o inibidor de α -amilase ryeIII foram eficientes no controle de larvas do bicudo do algodoeiro quando incorporadas em dieta artificial (Dias *et al.*, 2010).

Plantas de ervilha transformadas com o gene do inibidor de α -amilase 1 de feijão comum (α -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 foi resistente ao *C. chinenses*, principal praga desta cultura (Ishimoto *et al.*, 1996) e *chickpea* (*Cicer arietinum*) resistente ao *C. maculatus* (Ignacimuthu & Prakash, 2006). Sementes de ervilha expressando α -AI 2 utilizadas em bioensaios geraram resistência ao bruquídeo *Zabrotes subfasciatus* (Grossi-de-Sa *et al.*, 1997b). Aditivamente, plantas de feijão azuki expressando o α -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).

Nesse contexto, esta tese se divide em três capítulos, onde nos dois últimos são realizadas abordagens semelhantes utilizando-se proteínas com atividade biológica diferenciada, contudo, objetiva-se apresentar os resultados que atestam a possibilidade da utilização das proteínas recombinantes para o controle de pragas e patógenos. No Capítulo I são elencados aspectos gerais relacionados ao trabalho no tópico Introdução Geral. No capítulo II são mostrados os resultados relativos à validação da atividade de inibidores de α -amilase recombinantes gerados por meio de técnicas de evolução molecular *in vitro* previamente relatadas (Del Sarto, 2007). Uma biblioteca combinatória de inibidores de α -amilase de feijão comum foi gerada utilizando-se a combinação entre as técnicas de DNA *shuffling* e *Phage Display*. A partir desta biblioteca, inibidores variantes de α -amilase foram selecionados a partir da utilização de α -amilases do bicudo do algodoeiro imobilizada em uma superfície de poços de placa de ELISA. Foi selecionada uma população de 31 inibidores variantes que tiveram sua sequência determinada por meio de sequenciamento. Então, plantas de *A. thaliana* foram transformadas e utilizadas para a análise da atividade inibitória das moléculas selecionadas. Entretanto, no estudo anterior só foi possível avaliar a atividade a partir de uma mistura de plantas da mesma construção gênica. Assim, a proposta deste trabalho é validar os resultados encontrados para os inibidores variantes utilizando plantas individualizadas de cada construção gênica. No capítulo III são apresentados o resultados relativos à expressão de defensinas vegetais recombinantes utilizando a levedura *P. pastoris* para produção das proteínas em quantidade necessária para caracterização da atividade biológica contra fungos fitopatogênicos e adicionalmente bactérias.

CAPÍTULO II

Validação da Atividade de Inibidores de α -amilase recombinantes contra α -amilases do bicudo do algodoeiro produzidos em *Arabidopsis thaliana*

Há várias proteínas de defesa de plantas relatadas na literatura, dentre estas se incluem os inibidores de enzimas hidrolíticas (Ryan, 1990; Sales *et al.*, 2000; Carlini e Grossi de Sá, 2002, Selitrennikoff, 2001).

Enzimas hidrolíticas são moléculas essenciais para o desenvolvimento da maioria dos organismos. Nesse sentido, insetos praga e patógenos usam essas proteínas como componentes do processo digestivo ou para romper barreiras presentes nos tecidos vegetais durante o processo infectivo (Castro & Fontes, 2005). Estudo com plantas expressando inibidores dessas proteínas demonstraram a sua importância para o desenvolvimento dos insetos praga e patógenos (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002). Uma das classes de enzimas hidrolíticas muito utilizada por vários organismos são as α -amilases e glicosidases envolvidas na degradação de carboidratos. As α -amilases (α -1-4glucano-4-glucanohidrolases, EC 3.2.11) estão envolvidas diretamente na digestão do amido. São responsáveis pela hidrólise de ligações α -1-4 do amido, do glicogênio e outros carboidratos. Dados da literatura já demonstraram a importância dessas enzimas hidrolíticas para o desenvolvimento de insetos-praga, principalmente aqueles que atacam órgãos com elevada concentração de amido. Estudos tridimensionais da α -amilase do inseto *Tenebrio molitor* (TMA), mostraram que estas moléculas são monoméricas com três domínios distintos A, B e C (Strobl *et al.*, 1998). Possuem uma estrutura característica em forma de barril (β/α)₈, segmentos lineares e α -hélices curtas, onde há o sítio de ligação para o íon Ca^{++} , importante para a integridade estrutural da enzima. Ainda, há o domínio que é formado por dez folhas β , oito destas organizadas em β -sanduíche com topologia tipo chave grega. A tríade catalítica da enzima é formada pelos resíduos ácidos Asp185, Glu 222 e Asp287. Seis resíduos de açúcar são alocados na cavidade de ligação da enzima. 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).

Inibidores de α -amilases

Os inibidores de α -amilases (α -AI) proteicos já foram encontrados em cereais, como o trigo *Triticum aestivum* (Franco *et al.*, 2000), a cevada *Hordeum sativum* (Abe *et al.*, 1993), o centeio *Secale cereale* (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 γ -Purothionins-like e inibidores bifuncionais (Franco *et al.*, 2000).

A classe mais estudada de inibidores de α -amilases é a Lectin-like de acordo com os dados disponíveis na literatura. Estas moléculas são encontradas em diferentes variedades e acessos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Apesar de compartilharem 78% de identidade, os inibidores α -AI1 e o α -AI2 de feijão comum (Figura 1), são diferentes quanto a sua atividade inibitória, onde o primeiro inibe α -amilase pancreática de porco (PPA), α -amilase salivar humana (HSA) e as α -amilases dos bruquídeos *Calosobruchus maculatus* e *C. chinenses* (CMA, CSA) (Ishimoto & Kitamura, 1989). O segundo inibidor, α -AI2, inibe as α -amilases do inseto-praga *Zabrotes subfasciatus*, mas não possui atividade contra as α -amilases de mamíferos (Ishimoto & Chrispeels, 1996; Suzuki *et al.*, 1993; Grossi de Sá *et al.*, 1997a,b). A especificidade do α -AI1 foi detalhadamente estudada demonstrando a inibição de α -amilases de coleópteros, dípteros, himenópteros e lepidópteros. As α -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). Esses 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, α e β , com 7,8 e 14 kDa, respectivamente, (Yamaguchi, 1993) que formam uma estrutura heterotetramérica com 2 cadeias α e 2 cadeias β (Kasahara & Yamaguchi, 1996; Nakaguchi.& Yamaguchi, 1997). Análises estruturais do complexo do α -AI1 com a α -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 α -AI/TMA com o complexo α -AI1/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).

```

AI1 1  -ATETSFIIDA FNKTNLILQG DATVSSNGNLQLSYNSYDSMSRAFYSAPIQIRDSTTGNV 59
AI2 1  -ASDTSFNFYSFNETNLILQG DATVSSKGYLQL--HTVDSMCSAFYSAPIQIRDSTTGNV 57

AI1 60  ASFDTNFTMNI RTHRQANS AVGLDFVLVPVQPESKGD TVTV EFDTF LSRISIDVNN-DIK 118
AI2 58  ASFDTNFTMNI TQREANS VI GLDFALVPVQPKSKGHTVTVQFDTF RSRISIDVNNNDIK 117

AI1 119  SVPWDVHDYD GQNAEVRITYNSSTKVFSVLSNPSTGKSNNVSTTVELEKEVYDWVSVGF 178
AI2 118  SVPWDEQDYD GQNAKVRITYNSSTKVLAVLSNPSTGKSNEVSARMEVEKE LDDWVRVGF 177

AI1 179  SATSGAYQWSYETHDVL SWSFSSKF INLKDQK SERSNIVLNKIL 222
AI2 178  SAISGVHEYSFETRDVLSWSFSSKFS--QHTTSERSNILLNNIL 219

```

Figura 1: Alinhamento múltiplo de seqüências dos inibidores de α -amilase 1 (α -AI1) e 2 (α -AI2) 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.

Por possuírem distinta especificidade com uma elevada identidade de seqüência, os inibidores de α -amilase de feijão comum, α -AI1 e α -AI2, são moléculas interessantes para aplicação de técnicas de evolução molecular *in vitro* visando a obtenção de diferentes capacidades inibitórias das moléculas parentais.

O emprego de técnicas de evolução direcionada possibilita a geração de proteínas com atividade otimizada ou diferenciada quando comparada com a molécula parental. Dentre as técnicas que possibilitam essa abordagem pode-se citar o DNA *shuffling*, metagênese sítio-dirigida, PCR tendente a erro, utilização de oligonucleotídeos degenerados em regiões específicas, e outros (Yuan *et al.* & Keenan, 2005). Normalmente, após a geração de uma grande população de variantes aplica-se uma metodologia que permita a seleção de “clones” com determinada especificidade, por exemplo *Phage Display*.

Stemmer (1994) relatou a abordagem da combinação de DNA *shuffling* e *Phage Display* na criação de bibliotecas com elevada quantidade de moléculas variantes que podem ser isoladas e caracterizadas quanto a sua atividade biológica. Enzimas já foram selecionadas com a atividade otimizada (Zhang *et al.*, 1997) e toxinas Bt com maior atividade que moléculas parentais sendo efetivas contra insetos-praga (Oliveira *et al.*, 2011; Craveiro *et al.*, 2010).

Neste estudo foram validadas as atividades de proteínas expressas por três genes de inibidores selecionados contra α -amilases do bicudo do algodoeiro, *AIC3*, *AIA11* e *AIG4* obtidos a partir de uma biblioteca combinatória do tipo *Phage Display* de inibidores de α -amilase de feijão comum (Del Sarto, 2007). Na figura 2 é demonstrada a estratégia utilizada no trabalho anterior para a obtenção dos variantes validados neste trabalho.

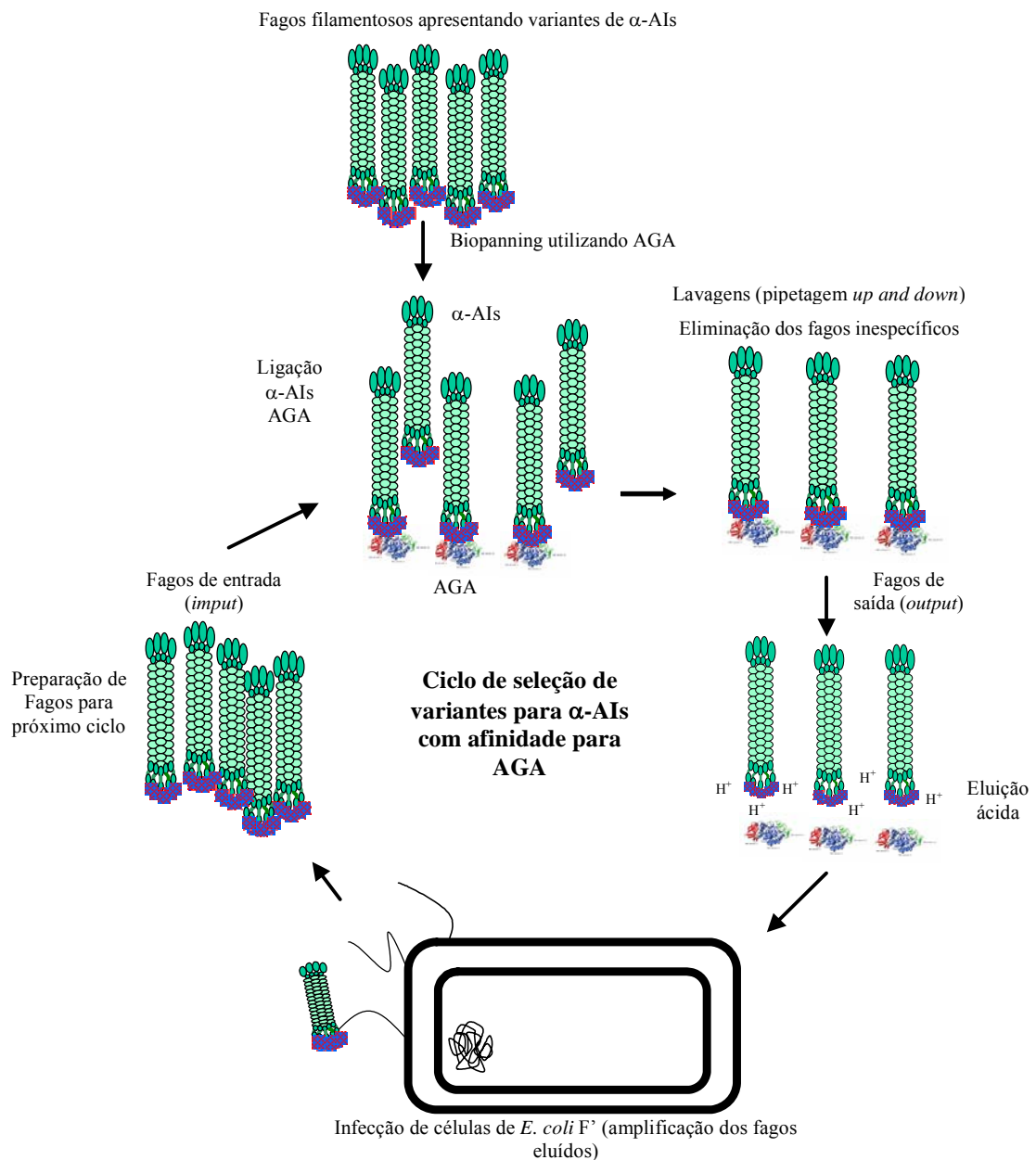


Figura 2: Representação esquemática do procedimento de *biopanning* para seleção de variantes de inibidores de α -amilases com afinidade para AGA (Del Sarto, 2007).

Objetivo Geral

Validação da atividade de inibidores variantes selecionados contra α -amilases do bicudo do algodoeiro produzidos em plantas de *A. thaliana*.

Objetivos específicos

1. Quantificar a expressão relativa de inibidores variantes selecionados contra α -amilases do bicudo do algodoeiro produzidos em plantas de *A. thaliana* por meio de ensaio de ELISA.
2. Avaliar a atividade de inibidores selecionados contra α -amilases do bicudo do algodoeiro produzidos em plantas de *A. thaliana* por meio de ensaio inibitório de atividade amilásica.

Materiais e Métodos

Produção de Plantas de *A. thaliana* Expressando Inibidores de α -amilase

Sementes de plantas F1 de *A. thaliana* ecótipo Columbia transformadas com construções contendo genes de inibidores de α -amilase recombinantes (*AIC3*, *AIG4*, *AIA11*) gerados no Laboratório de Interação Molecular Planta Praga utilizado as técnicas de DNA *shuffling* e *Phage Display* (Del Sarto, 2007) foram germinadas após a embebição em água destilada e incubação à temperatura ambiente por 24hs. Antes da germinação as sementes foram desinfestadas em solução de etanol 70% (v/v) e Triton X-100 0,1% (v/v) durante 5 minutos, secadas e germinadas em meio MS (Murashige & Skhoog - Sigma) sólido seletivo (25% meio MS, 0,8% de Agar, Canamicina 100 μ g/ml). Após a quebra da dormência as sementes foram incubadas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas/dia. As sementes que germinaram e resultaram em plântulas saudáveis na presença de canamicina foram transferidas para o substrato (Bioplant) e crescidas em casa de vegetação até a expressiva produção de folhas. Estas foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C até a utilização para extração de proteínas totais.

Extração de Proteínas de Plantas de *A. thaliana* Geneticamente Modificadas

Folhas das plantas de *A. thaliana* geração F2 foram pesadas após congelamento em nitrogênio líquido e cuidadosamente maceradas em cadinho. O pó gerado foi solubilizado em tampão de atividade amilásica (succinato de sódio 50 mM, pH 4,5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0.1 mM) na proporção 1:10. A solução foi incubada por 3 h à 4 °C em agitação vigorosa, foi centrifugada à 10.000 g por 15 min, então o precipitado foi novamente submetido a mesma extração, entretanto, foi adicionado ao tampão o detergente Triton X-100 0.1% (v/v). A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Análise da Expressão dos Inibidores de α -amilase Variantes em plantas de *A. thaliana* utilizando *Western Blot* e Ensaio de Elisa

Os sobrenadantes provenientes da extração de proteínas totais de folhas de *A. thaliana* foram utilizados para a imunodeteção dos inibidores de α -amilase por meio das técnicas de *Western blot* e ensaio de ELISA.

Para imunodeteção por *Western blot*, uma separação em eletroforese unidimensional por SDS-PAGE 15% (Laemmli, 1970) foi realizada usando 35 μ g de proteína do extrato total de folhas. Após, o gel foi usado para transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C[®] Amersham) usando o sistema semi-seco da BioRad, durante 30 min à 10 μ A de corrente. Então a membrana foi imersa em uma solução de gelatina (3%, p/v, solubilizada em TBS) por 16 horas sob agitação constante a temperatura ambiente. Logo após, foi incubada com o anticorpo primário anti- α AI-1 produzido em coelho (Grossi de Sá and Chrispeels, 1997), diluído na proporção de 1:700 em TBS, durante 2 horas a temperatura ambiente e sob agitação constante. Adicionou-se o anticorpo secundário IgG HRP (Bio Rad) produzido em coelho (diluído 1:1000 em gelatina 1%, p/v, em TBS) e incubou-se a membrana por 2 horas, com leve agitação a temperatura ambiente. A membrana foi lavada a cada incubação com TBS-Tween 0.02%, v/v, por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, foi adicionada a 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 H₂O₂) para detecção das proteínas de interesse. O inibidor α -AI1 foi utilizado como controle positivo no ensaio.

No ensaio de ELISA, 2.5 μ g de proteína do extrato total de plantas transformadas e não transformadas foi utilizado para sensibilização de placas de microtitulação de 96 poços por 2 h a 37 °C. Os poços sensibilizados foram lavados por quatro vezes com a solução de lavagem (0,3% de leite em pó, p/v; Tween-20 0,05%, v/v e PBS 1X) e, subsequentemente, bloqueados com a solução de bloqueio (leite em pó 3%, p/v; EDTA 0.5M 0,4%, v/v; Tween-20 3%, v/v, e PBS 1X, pH corrigido para 8.0) após a incubação a 4°C por 16 horas e uma hora adicional a 37°C. Os poços foram novamente lavados e foram adicionados 100 μ l do anticorpo primário anti- α AI-1 produzido em coelho (diluído 1:750 em PBS 1X) e a placa foi incubada à 37°C por 2 horas e, após, incubados por duas horas à 37°C com 100 μ L do anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina produzido em coelho (diluído 1:5000 em PBS 1X). Então, após a nova lavagem dos poços, 150 μ L de solução de revelação foi adicionada (1mg/ml de pNPP dissolvido em solução 1 M de dietanolamina, 0.5 mM de

MgCl₂, pH 9.8). Após 15 minutos de reação a absorvância foi medida em λ de 405 nm. A curva padrão para quantificação foi produzida com α -AI1 puro nas concentrações de 0.125-8 ng.

Validação *in vitro* da Atividade Inibitória dos Inibidores Recombinantes Seleccionados contra α -amilases do Bicudo do Algodoeiro

A atividade dos inibidores de α -amilase recombinantes seleccionados contra α -amilases do bicudo do algodoeiro, previamente produzidos por meio das técnicas de DNA *shuffling* e *Phage Display* (Del Sarto, 2007), foi preliminarmente analisada, entretanto, foi conduzido com um *pool* de plantas. Nesta validação, plantas individuais da geração F2 foram utilizadas. A geração foi obtida a partir do cultivo de plantas da geração F1 oriundas da germinação de sementes das plantas transformadas. No método de transformação por imerção do botão floral as inflorescências de plantas adultas são mergulhadas em uma solução contendo *Agrobacterium tumefaciens* transformado com o vetor da construção desejada (Clough & Bent, 1998). Após certo período de tempo, necessário para secagem das vagens e obtenção das sementes, estas são coletadas e germinadas e obtem-se a geração F1 de plantas que são caracterizadas quanto a presença ou ausência da construção desejada por meio de meio seletivo e PCR. Uma planta de cada construção, rica em folhas da geração F2 foi utilizada para quantificação da expressão por ensaio de ELISA e no ensaio inibitório de α -amilases.

O método para análise da atividade inibitória das moléculas seleccionadas contra α -amilases do inseto bicudo do algodoeiro utilizou ácido dinitrosalicílico (DNS) como reagente de mensuração dos açúcares redutores liberados pela degradação de amido após a adição da enzima (Bernfeld, 1955).

O ensaio inibitório foi realizado adicionando-se 85 μ g de proteína proveniente do extrato total de folhas de plantas de *A. thaliana* de cada um dos inibidores, AIC3, AIA11 e AIG4 a uma unidade enzimática de α -amilases de bicudo do algodoeiro. Uma unidade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima necessária para aumentar a OD₅₅₀ em 0.1 unidade. Para a inibição a mistura enzima/inibidor foi incubada a 37 °C por 30 min, posteriormente, foi adicionado 250 μ l de solução de amido 2% (p/v) e incubado por 20 min

na mesma temperatura de inibição. Após, 1 ml de solução de DNS foi adicionado e as amostras foram fervidas com auxílio de ebulidor. Foram adicionados 10 ml de água e alíquotas de 150 μ l foram usadas para análise da OD₅₅₀ com auxílio de leitor de microplaca. Os ensaios foram realizados em triplicada.

Resultados

Extração de Proteínas de Plantas de *A. thaliana* Geneticamente Modificadas

A metodologia para extração de proteínas totais, de plantas de *A. thaliana* geneticamente modificadas expressando os inibidores de α -amilase previamente selecionados (Del Sarto, 2007) AIC3, AIA11 e AIG4 (sequências mostradas na Figura 4), favoreceu a diminuição da presença de açúcares redutores presentes endogenamente. Estes provocavam um aumento da absorvância de cada amostra conduzindo a uma omissão na atividade enzimática, assim como, na atividade inibitória das proteínas recombinantes analisadas. Por exemplo, no caso do inibidor recombinante AIA11, a primeira extração exibiu uma inibição de $\approx 33\%$ e na segunda uma de $\approx 57\%$. A tabela 2 exhibe a mensuração da quantidade de açúcares redutores que interferiam no ensaio de atividade amilásica usando DNS. As amostras foram adicionadas a uma reação padrão sem adição de amido, entretanto, após a simulação dos tempos de inibição e degradação do substrato a mensuração observada foi maior do que a reação contendo a enzima/amido. A extração inicial com o tampão de atividade enzimática permitiu a superação desse inconveniente e na subsequente extração com a presença do detergente neutro Triton X-100 foi possível realizar a ruptura completa do tecido vegetal. O extrato total protéico foi assim utilizado para os ensaios de inibição contra α -amilases do bicudo do algodoeiro.

Tabela 2: Mensuração da presença de açúcares redutores nas amostras dos inibidores de α -amilase extraídos de plantas de *A. thaliana*

Amostras	Atividade amilásica	Desvio padrão	n°. Observações
AIC3*	288%	3%	3
AIA11*	151%	1%	2
AII *	134%	3%	3
NT*	125%	5%	2
Enzima (AGA)	100%	2%	-

*: não foi adicionado amido a reação, DNS reagiu com açúcares redutores da amostra

Del Sarto, 2007.

Análise da Expressão dos Inibidores de α -amilase em plantas de *A. thaliana* utilizando *Western Blot* e Ensaio de Elisa

A imunodeteção por *Western blot* dos inibidores de α -amilase selecionados contra α -amilases do bicudo do algodoeiro foi realizada utilizando-se os AIC3 e AIA11 (Figura 4). No experimento utilizando-se o extrato total de plantas de *A. thaliana* expressando esses inibidores foi possível observar que as proteínas recombinantes exibiram duas bandas relacionadas as sub-unidades α e β do inibidor selvagem α -A11 de feijão comum usado como controle. Estas apresentaram massa molecular aproximada de 11 kDa e 14kDa, respectivamente. Esses resultados demonstram que os inibidores de interesse foram processados no sistema de expressão utilizado conforme o inibidor selvagem. Isto sugere que possivelmente as moléculas processadas encontram-se ativas para serem avaliadas quanto a sua capacidade inibitória de α -amilases de bicudo do algodoeiro. Na literatura há vários relatos da expressão ativa dos inibidores de α -amilase de feijão em outras plantas como ervilha, *Cicer arietinum* (chickpea), feijão azuki e tabaco (Morton *et al.*, 2000; Sarmah *et al.*, 2004; Nishizawa, *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2000). Similarmente a estes relatos, em *A. thaliana* foi possível verificar o processamento pós-traducional semelhante aos inibidores parentais.

Após a imunodeteção por *Western blot* o nível de expressão dos inibidores AIC3, AIG4 e AIA11 foi avaliado por meio de ensaio de ELISA.

O inibidor parental α -A11 também expresso em *A. thaliana* foi quantificado da mesma maneira que os inibidores recombinantes. A expressão relativa desses inibidores foi determinada como porcentagem das proteínas totais extraídas das folhas de *A. thaliana* expressando cada um desses (Figura 5). O inibidor AIC3 representa 0.2% das proteínas totais das folhas das plantas geneticamente modificadas, o AIG4 0.23%, entretanto, a análise estatística dos dados demonstrou que ambos não possuem diferença significativa na expressão (P value >0.05). O inibidor AIA11 foi produzido num nível de 0.28% e o α -A11 0.3%, e são estatisticamente semelhantes (P value >0.05).

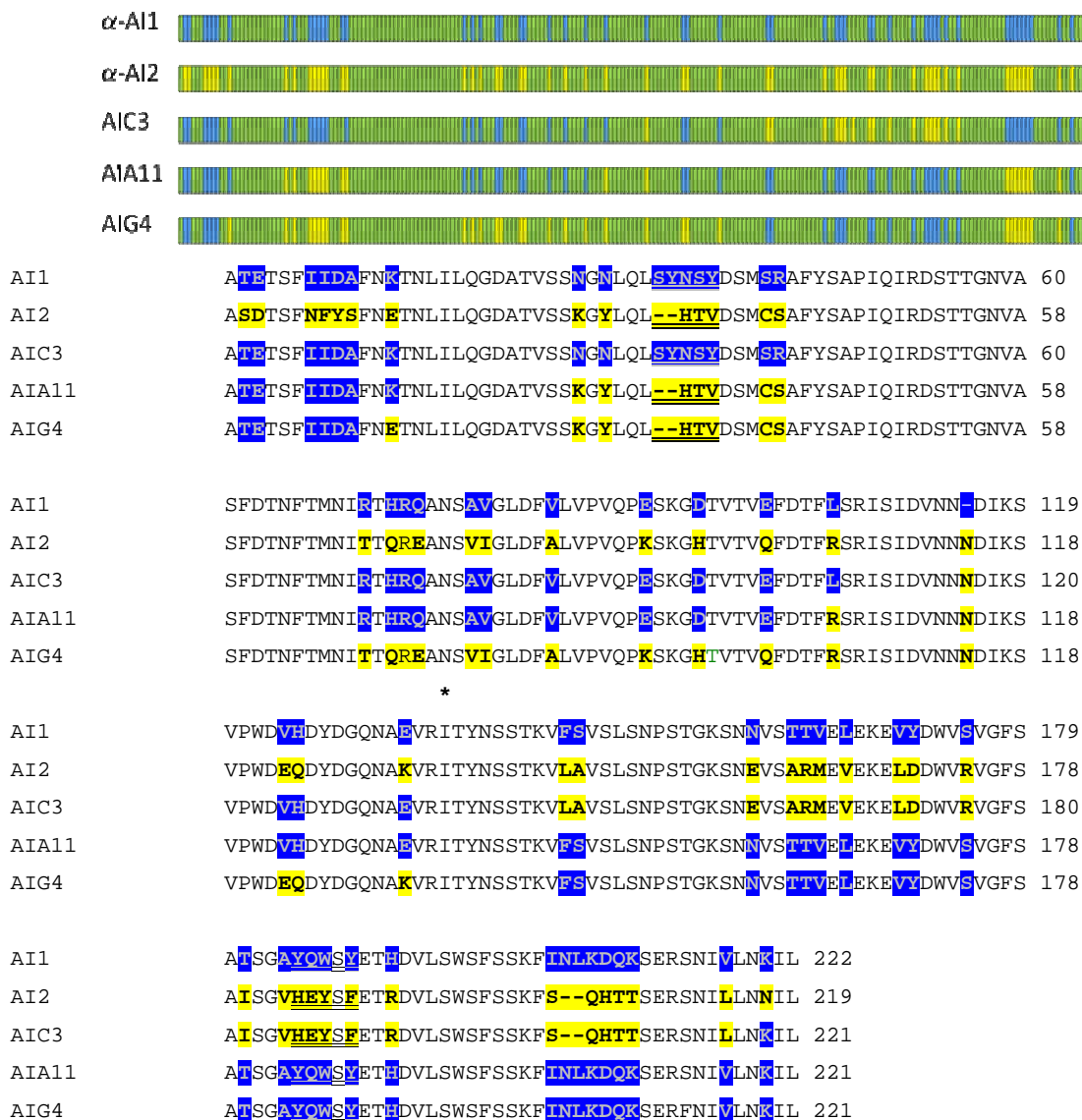


Figura 3. Representação esquemática e alinhamento múltiplo de sequência peptídica dos inibidores de α -amilase selecionados contra α -amilases de bicudo do algodoeiro (Del Sarto, 2007). Em verde são mostrados os aminoácidos conservados entre os inibidores selvagens (α -AI1 e 2) e os variantes AIC3, AIA11 e AIG4, em azul os herdados pelo α -AI1 e em amarelo os do α -AI2. O alinhamento múltiplo de seqüências foi realizado pelo programa ClustalW (www.expasy.org) Os resíduos duplamente sublinhados indicam os resíduos que formam os dois loops principais (N e C-terminal) envolvidos na interação enzima/inibidor (Grossi-de-Sá et al., 1997; Silva et al., 2000;2004). (*) Indica a N77 envolvida no processamento pós-traducional (Young et al., 1999).

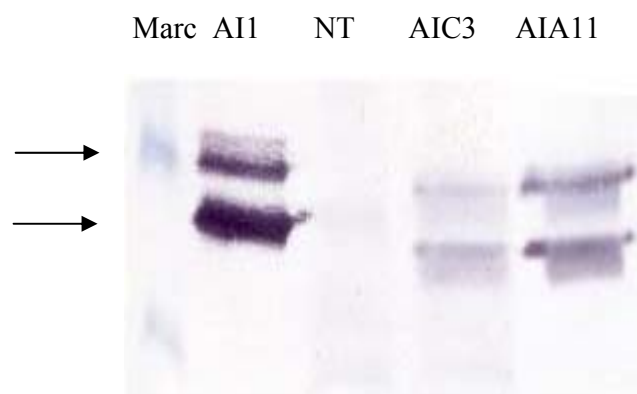


Figura 4. Imunodeteccção dos inibidores de α -amilase expressos em folhas de *A. thaliana* geneticamente modificadas (Del Sarto, 2007). A análise da presença dos inibidores selecionados contra α -amilases de bicudo do algodoeiro foi realizada por *Western Blot* partindo de proteínas totais de extratos foliares de plantas transformadas com os inibidores de α -amilases AIC3 e AIA11. Marc: marcador de massa molecular Bech Mark protein ladder; AI1: inibidor de α -amilase 1 (α -AI1) de feijão comum (controle positivo); 3: extrato de folhas de plantas de *A. thaliana* não transformada; 4: planta transformada com o inibidor AIC3; 4: planta transformada com o inibidor AIA11. As subunidades α e β que formam a molécula ativa do inibidor são indicadas pelas setas.

Contudo, o nível de expressão dos inibidores AIC3 e AIG4 é estatisticamente diferente do nível de expressão de AIA11 e α -AI1 (P value <0.05). Estes níveis de expressão relativas foram determinadas em comparação com uma curva padrão gerada com o inibidor selvagem purificado ($R^2= 0,99$). Os extratos protéicos quantificados foram então utilizados para análise da atividade inibitória de cada um dos inibidores.

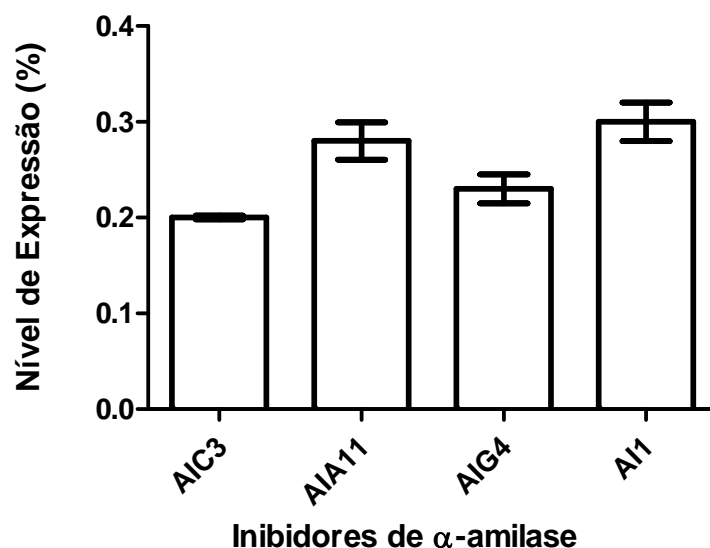


Figura 5. Análise da expressão dos inibidores de α -amilase recombinantes expressos em plantas de *A. thaliana*. O nível de expressão de cada planta foi determinado por meio de ensaio de ELISA em comparação com uma curva padrão obtida a partir do inibidor selvagem purificado.

Validação da Atividade Inibitória dos Inibidores de α -amilase Recombinantes contra α -amilases do bicudo do algodoeiro

Previamente, a atividade dos inibidores recombinantes foi avaliada (Del Sarto, 2007), entretanto, as proteínas utilizadas foram provenientes de um *pool* de plantas da geração F2 de *A. thaliana* geneticamente modificadas. Dessa forma, complementarmente, após a produção das proteínas de interesse em plantas da geração F2, os ensaios foram realizados para validação da atividade dos inibidores AIC3, AIA11 e AIG4 contra α -amilases do bicudo do algodoeiro utilizando plantas individuais e não uma misturas de plantas expressando o mesmo inibidor. No estudo prévio foram selecionados 31 inibidores variantes, contudo, apenas três foram objeto de análise nestes ensaios, restando os outros para futuros estudos quanto a sua efetividade contra as α -amilases do inseto usado para seleção. A concentração que foi utilizada nos ensaios foi de aproximadamente 35 nM para AIC3, AIA11, AIG4 e α -AI1. O inibidor selvagem foi testado após sua produção no mesmo sistema de expressão utilizado para obtenção das proteínas recombinantes selecionadas previamente visando assegurar que a possível atividade encontrada pudesse ser artefato indesejado desse sistema.

Assim, a inibição observada para os as proteínas recombinantes foi de: AIC3 inibiu 77%, AIA11 inibiu 57% e AIG4 inibiu 74% (Figura 6). O inibidor selvagem α -AI1 não foi capaz de reduzir a atividade amilásica das enzimas do bicudo do algodoeiro, assim como, extrato protéico de plantas de *A. thaliana* não transformada (Figura 6). Análise estatística dos dados permitiu afirmar que os valores encontrados para os inibidores recombinantes (AIC3, AIA11 e AIG4) foram significativamente diferentes dos encontrados para o inibidor α -AI1, planta não transformada (NT) e a amostra contendo apenas α -amilases do bicudo do algodoeiro (enzima), P value <0.05 (Figura 6). Estes resultados coincidem com os encontrados anteriormente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Interação Molecular Planta Praga em análise de *pool* de plantas de *A. thaliana* de geração F1 expressando os inibidores recombinantes selecionados (Del Sarto, 2007).

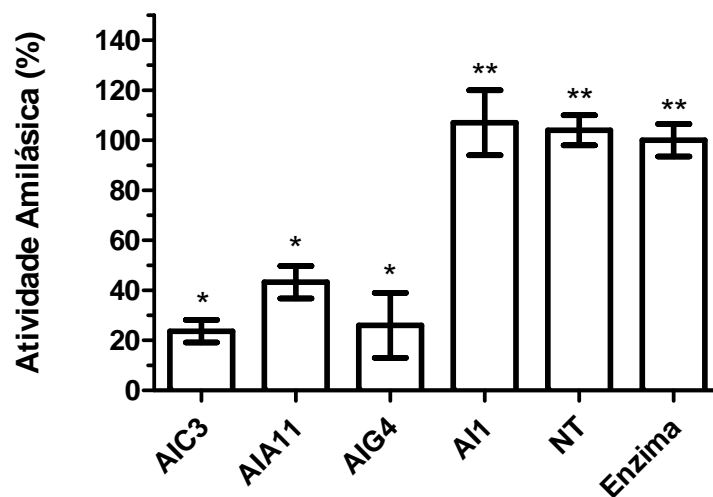


Figura 6. Análise da inibição de α -amilases do bicudo do algodoeiro provocada por inibidores de α -amilase expressos em plantas de *A. thaliana*. * A inibição encontrada para as moléculas recombinantes foi estatisticamente significativa ($P < 0.05$). ** Os valores de atividade amilásica das amostras contendo o inibidor α -AI1, extrato de planta não transformada (NT) e α -amilase de bicudo de algodoeiro são estatisticamente similares ($P > 0.05$). ANOVA e teste de Comparação Múltipla de Tukey's foram calculados por meio do programa Prism5.

Capítulo III

Avaliação da Atividade de Defensinas Recombinantes de Ervilha (Drr230a) e Girassol (SD2) produzidas em *Pichia pastoris*

Introdução

Peptídeos antimicrobianos são moléculas constantemente utilizadas por vários organismos como mecanismo de defesa fazendo parte da imunidade inata, inclusive no reino vegetal (Thomma *et al*, 2002; Carvalho e Gomes, 2009; Padovan *et al*, 2010). Dentre os peptídeos antimicrobianos utilizados pelas plantas incluem-se as proteínas pertencentes à classe das defensinas vegetais (Padovan *et al*, 2010).

DEFENSINAS VEGETAIS

Dentro do gênero dos peptídeos antimicrobianos vegetais as defensinas são um dos grupos mais bem caracterizados. Existem centenas de membros relatados, ocorrendo em várias espécies vegetais das famílias Amaranthaceae, Arecoideae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Curcubitaceae, Fabaceae, Solanaceae, dentre outras. Ainda, os dados disponíveis na literatura demonstram a sua natureza diversificada em relação a sua distribuição ao longo da planta estando presentes em folhas, caules, inflorescências, sementes, pólen, frutos e etc. Também, os relatos bibliográficos demonstram várias atividades biológicas das defensinas vegetais sendo ativas contra fungos, bactérias Gram negativas e positivas, tolerância a metal, efeito inibitório de enzimas como α -amilases e proteases, envolvimento com processos relacionados a desenvolvimento, dentre outros (Carvalho e Gomes, 2009).

Os peptídeos antimicrobianos foram inicialmente designados como defensinas pela sua marcante característica estrutural e funcional relacionada às defensinas caracterizadas de mamíferos e insetos (Terras *et al.*, 1995).

Estruturalmente, as defensinas são proteínas de baixa massa molecular compostas por \approx 44-60 aminoácidos com característica básica e alto conteúdo de cisteínas em sua estrutura, geralmente conservada entre os seus representantes ao longo do reino vegetal (Thomma *et al.*, 2002; Carvalho e Gomes, 2009; Padovan *et al.*, 2010). Comumente, as defensinas são sintetizadas com um peptídeo sinal para direcionamento extracelular e a região referente à proteína madura. Esta possui pI altamente básico (\approx 9) com 8 cisteínas conservadas e envolvidas em pontes dissulfetos que são responsáveis pela estabilidade da estrutura tridimensional. O motivo estrutural CS α B normalmente visualizado nesta família de peptídeos antimicrobianos é compartilhada também com outros grupos. A estrutura resolvida de um dos representantes mais bem estudados pertencente a essa classe de moléculas, *Rs*-AFP1, foi determinada por Ressonância Magnética Nuclear (NMR) e foi demonstrada uma estrutura globular composta de uma folha β , uma α -hélice e mais duas folhas β ($\beta\alpha\beta\beta$) com as cisteínas formando o motivo característico CS $\alpha\beta$ (cysteine stabilized $\alpha\beta$). As pontes dissulfetos se distribuem entre Cis₂₁ e Cis₂₅ na α -hélice e Cis₄₅ e Cis₄₇ na terceira folha β , Cis₁₅ na primeira folha β e Cis₃₆ na terceira e finalmente Cis₄ e Cis₅₁ ligando as regiões N e C-terminal (Kobayashi *et al.*, 1991 ; Cornet *et al.*, 1995, Almeida *et al.*, 2002). Estas proteínas são moléculas anfipáticas e estudos demonstram que o possível mecanismo de ação que explica a atividade antimicrobiana está relacionado à sua interação com a membrana do organismo alvo provocando vários efeitos adversos, dentre eles, a ruptura da membrana (Pelegriani *et al.*, 2011; Lay *et al.*, 2005).

A atividade biológica das defensinas vegetais inclui a capacidade de inibir a tradução de proteínas em sistemas *cell free*, de inibir enzimas hidrolíticas, como α -amilases e proteases, de mediar tolerância a zinco, de modificar o estado do ácido ascórbico, de bloquear canais iônicos e finalmente de controlar a atividade microbiana incluindo fungos e bactérias (Pelegriani *et al.*, 2011; Carvalho e Gomes, 2009).

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DEFENSINAS VEGETAIS

Os estudos relacionados à caracterização da atividade biológica das defensinas vegetais têm revelado que a maioria dessas moléculas são ativas contra fungos, inclusive os causadores de doenças de interesse agrônomico. Entretanto, relatos significativos têm mostrado que elas também possuem a capacidade de inibir bactérias Gram negativas e positivas (Carvalho e Gomes, 2009; Stotz *et al.*, 2010; Pelegriani *et al.*, 2011).

Além de inibir fungos como *Aspegillus niger*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* também inibem fungos fitopatogênicos como *Collethotricum lindemuthianum*, *Fusarium culmorum*, *F. decemcellulare*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, dentre outros, e patogênicos como *Candida albicans*, *Phytophthora infestans* e *P. parasítica* (Carvalho e Gomes, 2009).

Em relação à capacidade de inibição do crescimento de bactérias já foram encontradas defensinas com atividade contra as pertencentes ao grupos das Gram negativas como *Agrobacterium tumefaciens*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* e etc., e Gram positivas como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e etc (Carvalho e Gomes, 2009)

Ainda, há relatos da atividade anti-transcriptase reversa de HIV-1 *in vitro* demonstrada para as defensinas RBAFP, PBAFP, sesquina e vulgarinina (XY *et al.*, 2001; XY *et al.*, 2002, Wong *et al.*, 2005a e b).

O mecanismo de ação dessas proteínas ainda não foi completamente elucidado, entretanto, estudos específicos mostraram que provavelmente cada defensina age de uma maneira relativamente diferente, por exemplo, interagindo com alvos na membrana, provocando desbalanço iônico, interagindo com alvos intracelulares (nuclear ou citoplasmático) ou ainda provocando a geração de espécies reativas de oxigênio (Carvalho e Gomes, 2009, Stotz *et al.*, 2010). No caso da ação bacteriana existem basicamente três hipóteses para o mecanismo de ação dessas moléculas. No modelo *Barrel-Staff*, onde o peptídeo monomericamente ou oligomericamente interage com a membrana e os resíduos positivamente carregados se ligam à região polar de fosfolipídeos alcançando uma determinada concentração, há a formação dos poros. No modelo Toroidal a principal diferença entre o modelo *barrel-stave* é o tipo de poro formado. No modelo *Carpet* os monômeros ou oligômeros se ligam a membrana de maneira que a região hidrofílica fica voltada para o solvente e a hidrofóbica para a membrana e após alcançar uma concentração limite ocorre aumento da sua permeabilidade facilitando a formação de poros e desintegração (Pelegri *et al.*, 2011).

Neste estudo as defensinas vegetais de ervilha, DRR230a (Lai *et al.*, 2002), e girassol, SD2 (Canal *et al.*, 2000) foram expressas na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, e utilizadas para avaliação da atividade antimicrobiana contra fungos fitopatogênicos (*Collethotricum gossypii* var *cephalosporioides*, *Fusarium solani* sp *glycine*), bactérias patogênicas (*Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Salmonella* sp.), e entomopatogênicas (*Bacillus thuringiensis kustaki*).

Previamente, a caracterização molecular da defensina DRR230a foi conduzida por Lai *et al.* (2002). Neste estudo foi demonstrada a presença da defensina nas folhas maduras e jovens, caule, raiz, flores e vagens e também em tecidos infectados com patógenos fúngico e bacteriano. Adicionalmente, plantas de tabaco foram transformadas utilizando-se a defensina DRR230a e amostras de extratos semipurificados foram capazes de controlar o crescimento de fungos fitopatogênicos como *Asochyta pinodes*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, dentre outros. Entretanto, o autor discute sobre a interferência no resultado decorrente de componentes das plantas de tabaco. Requerendo estudos adicionais para efetiva confirmação.

Em relação à defensina SD2, Urgandarin *et al.*, (2000) publicou a caracterização molecular desta defensina. Esta é expressa em inflorescência de girassol e há um aumento na acumulação do transcrito do gene *SD2* durante o estágio de desenvolvimento da flor, como flor fechada, emergência da antera, emergência do estigma no tubo da antera (estágio que caracteriza a flor madura) e flor fertilizada. Estas análises sugerem que a proteína esteja envolvida com a defesa da estrutura reprodutiva do girassol.

Objetivo Geral

Caracterizar a atividade biológica das defensinas vegetais recombinantes de ervilha (DRR230a) e girassol (SD2) contra fungos fitopatogênicos e bactérias.

Objetivos Específicos

1. Expressar as defensinas vegetais em *Pichia pastoris*;
2. Purificar as defensinas vegetais recombinantes por meio de cromatografia de afinidade usando metal quelado;
3. Avaliar a atividade das defensinas vegetais recombinantes por meio de ensaio de inibição de crescimento de hifas de fungos fitopatogênicos;
4. Avaliar a atividade das defensinas vegetais recombinantes por meio de ensaio de germinação de esporos de fungos fitopatogênicos;
5. Avaliar a atividade das defensinas vegetais recombinantes por meio de ensaio de inibição de crescimento bacteriano em meio líquido.

Materiais e Métodos

Sub-clonagem e Expressão dos genes de defensinas *Drr230a* e *SD2* em *Pichia pastoris*

O gene da defensina DRR230a foi gentilmente cedido pelo pesquisador do Instituto de Biotecnologia Vegetal do Centro Nacional de Pesquisa do Canadá, Pierre R.Forbet. O gene da defensina SD2 foi gentilmente cedido pela pesquisadora do Instituto de Investigações Biológicas da Universidade de Mar del Plata, Maria Carina Urdangarín.

Foram realizadas, separadamente, reações de PCR utilizando os plasmídeos contendo os genes *Drr230a* (genbank accession AF525685) e *SD2* (genbank accession AF178634) como moldes. Os primers que foram utilizados são mostrados abaixo:

DRR230a01For 5'gccgaattcaacacatgtgagaac3'

DRR230a02Rev 5'tgggcccgcctcaatgatgatgatgatggcagtttttagtacaccaacagcgaaagtcac 3'

SD2 For 5`ggggaattcaggacatgtgagtcgcagagc 3`

SD2 Rev 5`gaggcggcccgcctcagtggtggtggtgatgacaatgcgtagtacagaaacaccgtcg tcgaaacccccg 3`

A reação de PCR inseriu os sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* and *NotI* nas regiões 5' e 3', respectivamente, dos genes de defensinas. Para auxiliar o processo de purificação da proteína recombinante foi inserido na região 3', ainda, uma cauda contendo seis histidinas em série (6xHIS). As condições utilizadas para as amplificações foram: 94 °C, 30 s, 58 °C, 30 s, 72 °C, 30s durante 30 ciclos. Os amplicons gerados foram recuperados após eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) e subclonados no plasmídeo de replicação pGEM-T easy[®], e subsequentemente propagado em *E. coli*, linhagem X11-Blue. Após, os plasmídeos resultantes, pGEM/*Drr230a* e pGEM/*SD2*, foram digeridos primariamente com a enzima *NotI* e posteriormente com a *EcoRI* utilizando a relação enzima/DNA segundo o fabricante das enzimas (Invitrogen, Co). Concomitantemente, o vetor pPICZαA[®] (Invitrogen Co.) foi digerido com as mesmas enzimas para geração de extremidades complementares nas regiões 5' e 3'. Então, foram preparadas reações de ligação onde foram adicionados os genes das defensinas *Drr230a* e *SD2* e o plasmídeo (pPICZαA) na relação molar de 5:1 contendo T4 DNA ligase (1U) e o seu tampão de reação (Invitrogen, Co). A reação foi mantida em Banho

Maria à 15 °C, por aproximadamente 16 h. Após, o produto da ligação dos dois genes foram usados para transformação de células competentes de *E. coli* (XL-1 *Blue*), via eletroporação. Os genes de interesse foram clonados em fase com o fator de secreção sexual (mating α -factor secretion signal) e sob controle do promotor de álcool oxidase I. A presença dos genes das defensinas nas construções foi confirmada por digestão com as enzimas de restrição utilizadas para a sub-clonagem (\approx 5 μ g de DNA e proporção de unidades enzimáticas utilizadas conforme o fabricante) e sua integridade analisada por meio de sequenciamento automático (ABI sequencer -Perkim-Elmer) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores pAOX1 sense e antisense (sequência disponível no manual da Invitrogen, Co).

Transformação de *Pichia pastoris*

Após a confirmação da presença dos genes de DRR230a e SD2 no plasmídeo de expressão, 20 μ g de DNA dessas construções foram linearizados com a enzima *SacI* e usados para eletroporação de células eletrocompetentes de *P. pastoris*, linhagem X-33 usando as condições de fornecidas pelo fabricante. Os clones resultantes foram selecionados em placas contendo meio YPD sólido (1% extrato de levedura, p/v; 2% glicose p/v; 2% peptona p/v, 1,5% Agar, p/v) e o antibiótico zeocina (100 μ g/ml) e confirmados por meio de PCR. Aditivamente, esses clones foram re-analisados em placas com uma maior concentração de zeocina (500 μ g/ml). Assim, clones com mais de uma inserção no genoma da levedura foram selecionados para os experimentos de expressão de acordo com Vassileva, 2001 e Chugh *et al.* 2001.

Expressão de Defensinas Vegetais (DRR230a e SD2) em *Pichia pastoris*

Um clone previamente selecionado de cada construção de defensinas foi inoculado em 2 ml de meio YPD líquido (sem adição de Agar) e incubado por 12h à 28 °C, 200 rpm. Então, o inóculo foi adicionado a 200 ml de meio BMG (1,34% de base nitrogenada de levedura, p/v, 1% de glicerol, p/v, 4x10⁻⁵% de biotina, p/v, 100 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,0) e incubado até alcançar OD_{600nm} de 20 (aproximadamente 24h). Após, as células foram concentradas por meio de centrifugação à 1500 g, 5 min, e foram ressuspendidas em 200 ml de meio BMM (1,34% base nitrogenada de levedura, p/v, 1% de

metanol, p/v, 4x10⁻⁵% de biotina, p/v, 100 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,0). Os inóculos foram incubados por 48h à 28°C, 200 rpm. Finalmente, foram centrifugados e os sobrenadantes recolhidos e analisados em SDS-Tricine-PAGE (Schagger & Von Jagow, 1987).

Purificação de rDRR230a e rSD2 por IMAC

A purificação das defensinas vegetais expressas em *P. pastoris* foi realizada utilizando cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC). O extrato total produzido após a expressão de cada uma das defensinas foi diluído em tampão de ligação (100 mM tampão fosfato de sódio, pH 7.2; 500 mM NaCl) na proporção 1:1 e aplicado na coluna (1.6x 2.5 cm, 5 ml) His Trap FF (GE helthcare) equilibrada com o tampão de ligação (sete volumes em relação a coluna). Então a coluna foi lavada com o tampão de ligação (sete volumes da coluna) adicionado de imidazole em baixa concentração (20 mM). As proteínas de interesse foram eluídas com o mesmo tampão contendo 500 mM de imidazole (sete volumes) usando o fluxo de 1 ml/min. As amostras coletadas foram analisadas em SDS-Tricine-PAGE 14%, a fração contendo as defensinas recombinantes foram dializadas, liofilizadas e solubilizadas em água milli-Q.

Avaliação de Atividade Antifúngica e Antibacteriana

Bioensaios contra Fungos Fitopatogênicos

A defensinas recombinantes foram testada contra os fungos *Fusarium solani* sp glycine isolado de soja, *Collethotricum gossypii* var. cephalosporioides isolado de algodão.

Os esporos foram produzidos pela inoculação dos fungos em meio PDB sólido (Potato dextrose broth, acessado FDA, 2010) e incubação durante o tempo necessário para esporulação de acordo com a espécie (5 dias *F.solani* sp. glycine e 10 dias *C. gossipy* var cephalosporioides). Os esporos foram coletados pela adição de 1 ml de água estéril as placas e leve agitação. A solução foi coletada e os esporos contados em câmara de Newbauer.

Primariamente, 10µl de uma solução de esporo (10^4) foi adicionada a 80µl de meio PDB, 200g de batata em infusão, 20 g de dextrose para volume final de 1l (Potato dextrose broth, acessado FDA, 2010). Então, foi adicionada uma concentração crescente de rDrr230a e rSD2 completando o volume final de 100µl em placa de 96 poços estéril. O crescimento fúngico, assim como sua inibição foram analisados por meio da adição de água e peróxido de hidrogênio, respectivamente, como controles negativo e positivo da inibição. As placas de 96 poços foram incubadas à 28°C no escuro por 48h e então a OD_{600nm} foi mensurada em leitor de microplaca (BIORAD) (Broekaert *et al.*, 1990).

A avaliação do potencial de inibição de germinação de esporo foi realizada com a adição de 5µl de solução de esporo a 15µl de solução das defensinas (25 ng/µl) e a mistura foi incubada à 28°C por 12h. A germinação de esporos foi analisada pela contagem em câmara de Neubauer e registrada fotograficamente em microscópio óptico (Broekaert *et al.*, 1990). Todos os ensaios foram realizados em triplicada.

Bioensaios contra Bactérias

Ainda, a defensina rDRR230a foi utilizada para a realização de bioensaio para avaliação da sua atividade antibacteriana. A defensina recombinante foi testada contra as seguintes espécies de bactérias: *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Proteus* sp. e *Bacillus thuringiensis*. Uma colônia isolada fresca de cada bactéria foi inoculada em 3 ml de meio LB e incubada por 12 h, na temperatura de crescimento ideal *in vitro* (37°C para as bactérias patogênicas e 30°C para a entomopatogênica), a 180 rpm. Após, as culturas foram diluídas 20 vezes (para OD₆₀₀ de 0,1) no mesmo meio e então a proteína foi adicionada nas concentrações de 16, 32, 64, 128 ng/µl. A OD₆₀₀ das culturas foi registrada após 60, 120, 180 e 240 min de crescimento. Como controle positivo da inibição foi usado o antibiótico clorafenicol na concentração de 25 µg/ml.

Resultados

Sub-clonagem e Expressão dos genes de defensinas *DRR230a* e *SD2* em *Pichia pastoris*

As defensinas vegetais recombinantes foram subclonadas no plasmídeo pPCIZ α A[®] (Invitrogen, Co.) para expressão na levedura *P. pastoris*. Este plasmídeo foi escolhido por possuir um peptídeo sinal (fator α de *Saccharomyces cerevisiae*) que possibilita a secreção da proteína de interesse facilitando a sua recuperação após a expressão.

Ainda, os genes clonados no plasmídeo ficam sob controle do promotor AOX1 (promotor álcool oxidase I), que é induzido por metanol. Esta característica possibilita que proteínas sejam produzidas após a densidade populacional das leveduras atingirem o nível desejado. Isso, minimiza a possibilidade da proteína de interesse provocar algum efeito adverso ao organismo geneticamente modificado que produz a proteína recombinante. Ainda, o plasmídeo possui o gene *Sh ble* que confere resistência ao antibiótico Zeocina[™].

O plasmídeo possibilita a fusão do epitopo *c-myc* à proteína recombinante, entretanto, foram adicionados os nucleotídeos codificantes para a cauda de histidina (6xHIS) e um *stop* códon aos genes de interesse de forma a eliminar a presença do epitopo (Figura 7a). Após a sub-clonagem dos genes das defensinas *DRR230a* e *SD2* no vetor de expressão e transformação de células competentes de *E. coli*, clones foram selecionados em placas contendo zeocina. O DNA plasmídeo de cinco (05) colônias resistentes ao antibiótico foi extraído e digerido com as enzimas *EcoRI* e *NotI* para verificação da presença dos genes das defensinas. Após análise da digestão por eletroforese em gel de agarose foram visualizados os fragmentos referentes ao plasmídeo pPICZ α A com aproximadamente $\approx 3,6$ kb e aos genes das defensinas vegetais com ≈ 180 pb (Figura 7b). O sequenciamento automático do DNA plasmídeo dos clones positivos (Figura 7b) confirmou a integridade do cassete de expressão. O alinhamento automático utilizando os genes depositados no banco de dados e as sequências oriundas do sequenciamento das defensinas são mostrados na figura 8. Os sítios das enzimas de restrição *EcoRI* (5') e *NotI* (3') foram identificados a montante e a jusante dos genes, respectivamente. Ainda, antes do sítio de *NotI* encontram-se compreendidas as sequências codantes para a cauda de histidina (6xHIS) e logo após o stop códon, conforme a simulação *in silico* da clonagem. Também foi identificada a sequência referente ao peptídeo sinal do fator α para secreção das proteínas (dados não mostrados).

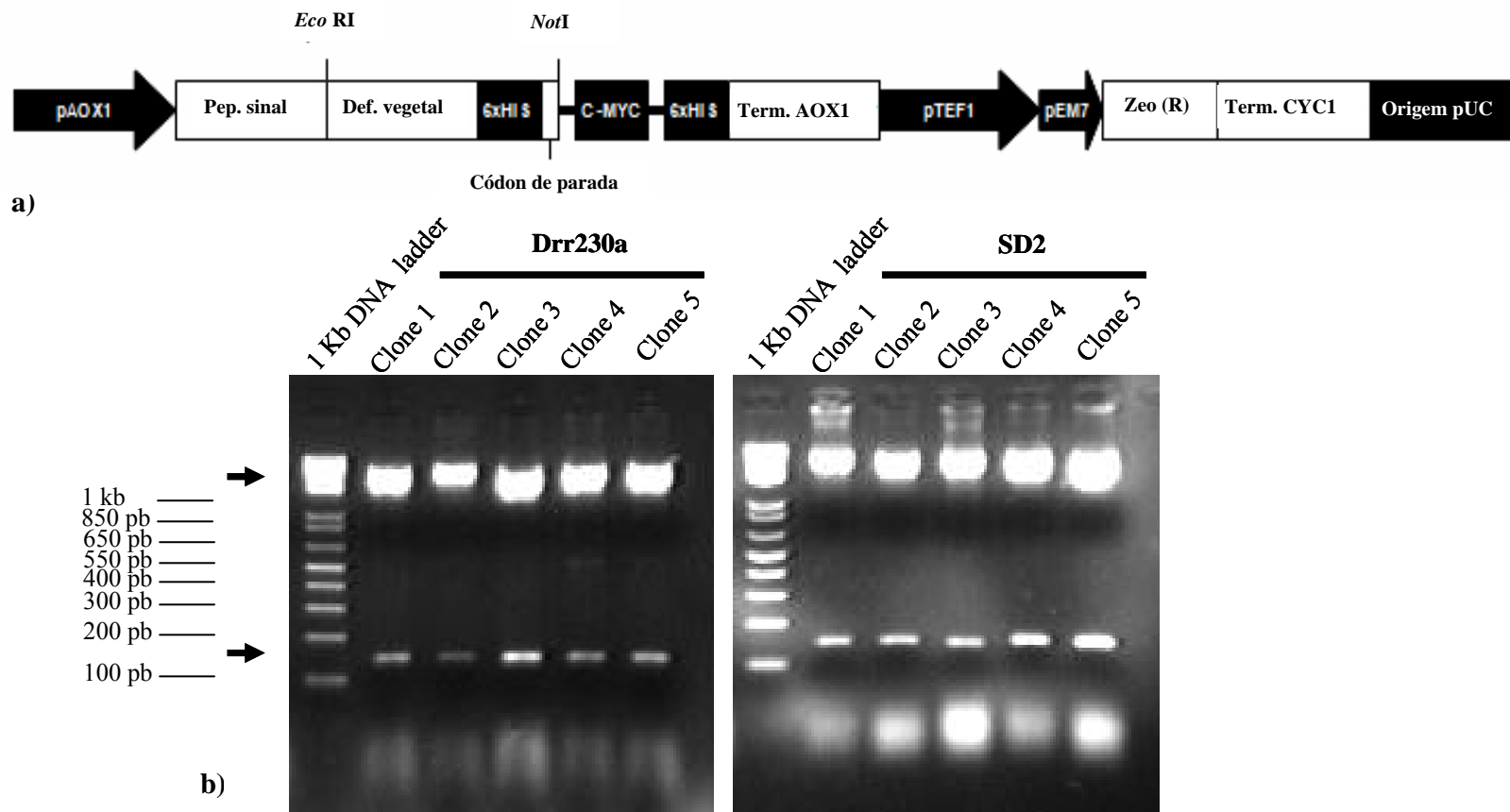


Figura 7. **a)** Representação esquemática do plasmídeo resultante da sub-clonagem dos genes das defensinas vegetais Drr230a (genbank accession AF525685) e SD2 (genbank accession AF178634) no plasmídeo pPICZ α A[®] (Invitrogen, Co.) para expressão em levedura *Pichia pastoris*. **b)** Eletroforese em gel de agarose das digestões dos plasmídeos pPICZ α A/Drr230a e pPICZ α A/SD2 utilizando as enzimas *EcoRI* e *NotI*. As setas indicam os fragmentos resultantes de \approx 3,6 Kb (pPICZ α A) e \approx 180 pb (defensinas vegetais).

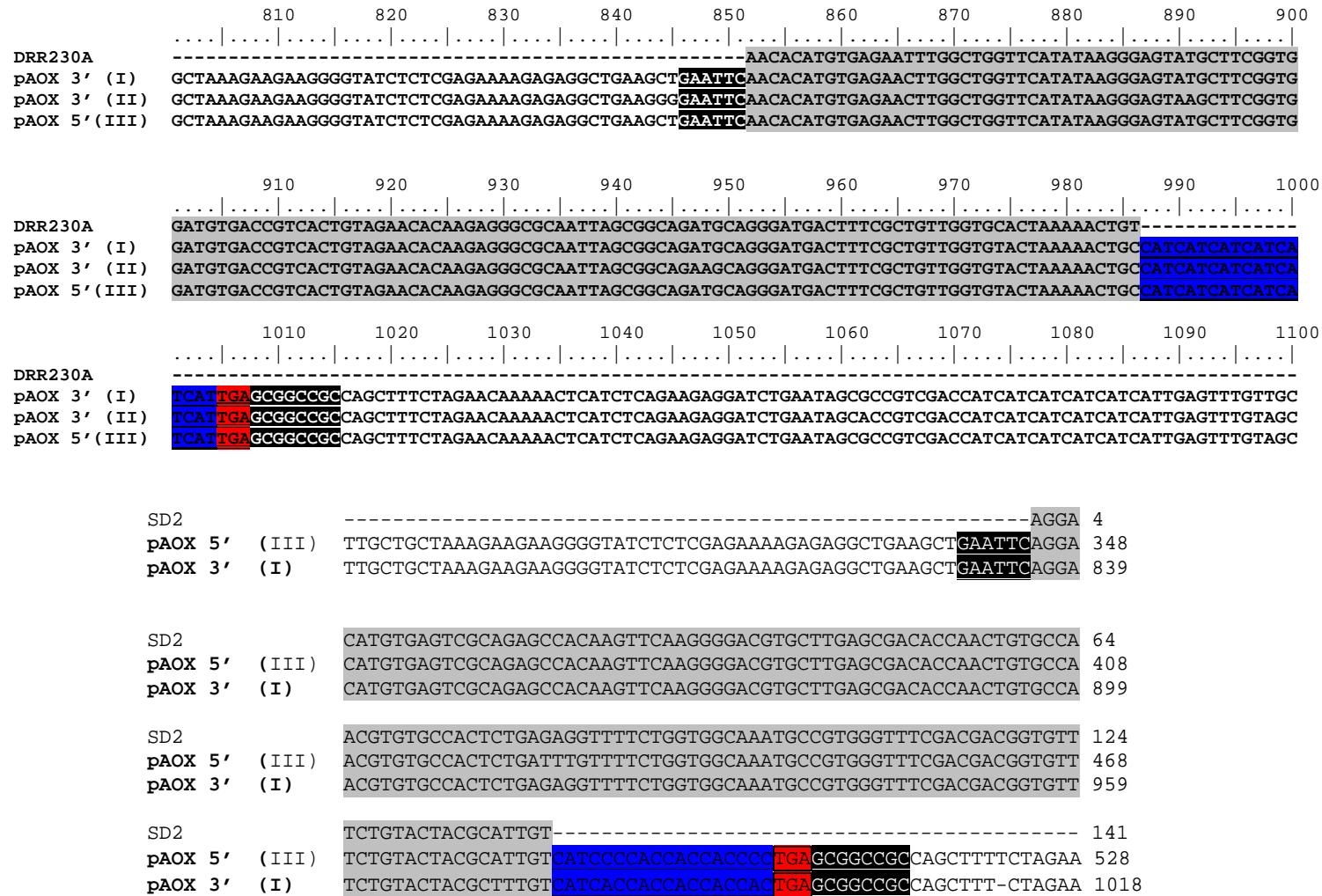


Figura 8. Sequências obtidas a partir de sequenciamento automático dos plasmídeos construídos com os genes das defensinas vegetais *Drr230a* e *SD2* e o vetor para expressão em *Pichia pastoris*. **a)** *Drr230a* (genbank accession AF525685), o alinhamento foi realizado por meio do programa Multalin (expasy.org). **b)** *SD2* (genbank accession AF178634), o alinhamento foi realizado por meio do programa Clustal-W (expasy.org). Em preto são exibidos os sítios das enzimas *EcoRI* e *NotI*, em cinza as sequências das defensinas vegetais, em azul a cauda de histidina (6xHIS) e em vermelho o stop códon.

Transformação de *Pichia pastoris*

Após a transformação de células competentes de *P. pastoris* os clones resultantes foram desafiados em meio de cultivo contendo zeocina na concentração de 50 µg/ml. O DNA cromossomal extraídos dos clones positivos foi usado para a realização de PCR utilizando os iniciadores indicados pelos fabricantes do plasmídeo e os que produziram fragmentos do tamanho esperado (800pb) novamente forem semeados em meio de cultivo contendo concentração elevadas do antibiótico para seleção de clones com presumível integração múltipla ao genoma da levedura selecionando-se 5 clones com maior potencial de produção da proteína recombinante.

Expressão de Defensinas Vegetais (DRR230a e SD2) em *Pichia pastoris*

A expressão das defensinas vegetais foi inicialmente realizada em pequena escala com clones que foram resistentes a alta concentração de zeocina e confirmados via PCR. Cinco (05) clones de cada defensina foram submetidos a esse procedimento. O nível de expressão observada para cada um dos clones foi similar, variando de 0,3-0,35 ng/µl, para as defensinas *Drr230a* e outro da *SD2* e o procedimento em larga escala foi realizado para um clone de cada gene.

A análise em TRICINE-PAGE (Schagger & Von Jagow, 1987) das amostras coletadas ao longo de 96h após a indução da defensina *Drr230a* com metanol mostrou a presença de uma banda de ≈ 6 kDa (Figura 9a) que foi confirmada como sendo a proteína *rDrr230a* por meio da detecção por western blot utilizando o anticorpo anti-his tag (Figura 9b). Tanto no TRICINE-PAGE (Schagger & Von Jagow, 1987), como na imunodetecção, amostras coletadas da levedura selvagem não resultou na presença de qualquer proteína de massa molecular aproximada a da *rDRR230a*. Então, para produção em massa da proteína de interesse foi escolhido o tempo de 48h para reprodução do procedimento de expressão, uma vez que a cada 24h o as células eram semeadas em novo meio de cultura com o indutor tornando o procedimento de obtenção da *rDrr230a* mais viável.

Em relação a *SD2*, após o TRICINE-PAGE (Schagger & Von Jagow, 1987) foi possível verificar uma banda protéica com massa molecular \approx de 6 kDa, referente ao tamanho da proteína recombinante (Figura 9c). Entretanto, no western blot foi possível apenas

visualizar fracamente a presença da rSD2 ao longo de 72h (Figura 9d). Todavia, as amostras referentes à levedura selvagem nos tempos de 24,48 e 96h não exibiu proteína que pudesse corresponder a rSD2. Assim, similarmente à rDrr230a, o tempo de 48h foi escolhido para expressões posteriores devido a viabilidade de execução.

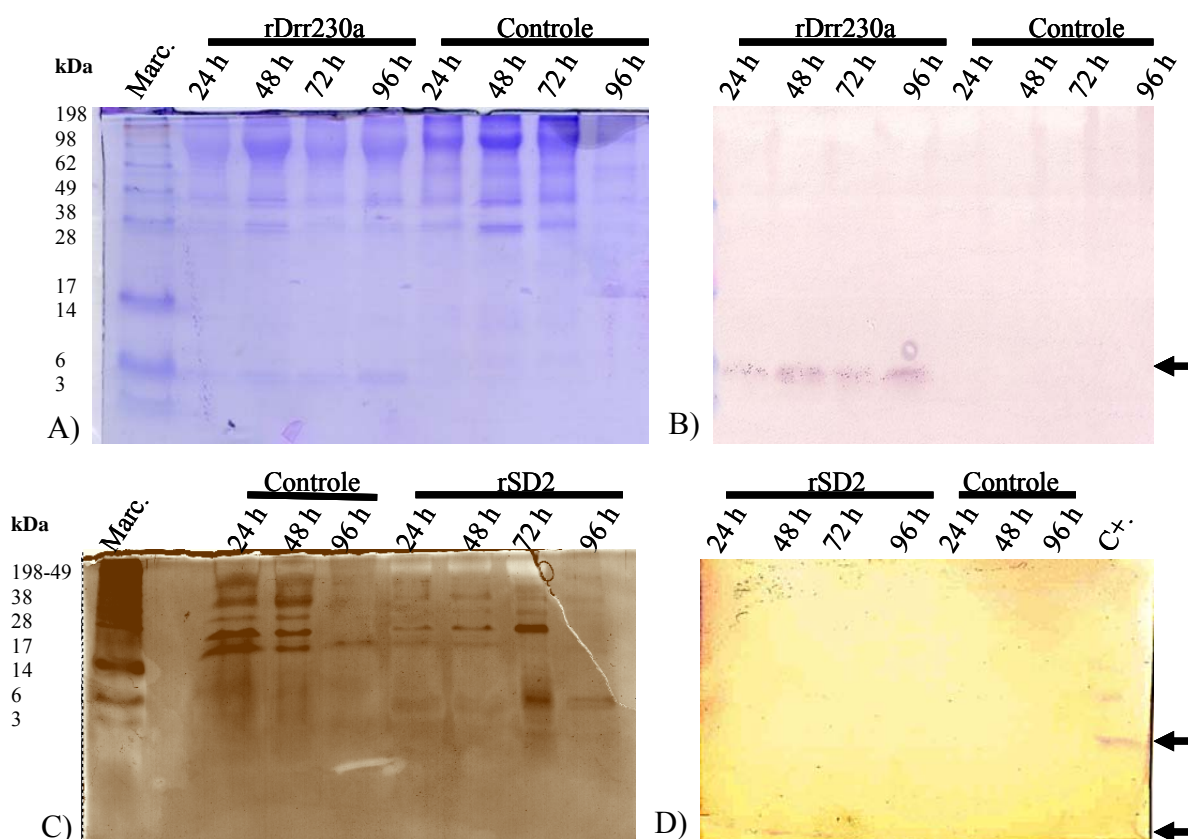


Figura 9. Análise da expressão das defensinas vegetais recombinantes rDrr230a e rSD2 produzidas em *Pichia pastoris*. A e C) Tricine-PAGE 15% das amostras coletadas durante a indução da expressão de rDrr230a e rSD2 corados com Coomassie blue G-250 e AgNO_3 , respectivamente. B e D) Western Blot das amostras coletadas durante a indução da expressão de rDrr230a e rSD2. Marc: marcador de proteína Seeblue[®] plus2. As setas indicam as proteínas recombinantes. (C+) controle positivo para o western blot.

Purificação de rDRR230a e rSD2 por IMAC

Após a expressão em larga escala das defensinas vegetais rDRR230a e rSD2, o sobrenadante coletado das culturas foi aplicado a uma coluna de níquel para purificação das proteínas de interesse. A cromatografia de afinidade utilizando metal imobilizado possibilita explorar a capacidade de ligação de resíduos de histina em série (geralmente seis) a determinados metais acoplados a matrizes amorfas. Neste estudo a coluna utilizada foi a HisTrap™ FF Crude (GE). Esta coluna possibilita a aplicação direta sem a necessidade de passos adicionais de “limpeza” da amostra. Entretanto, a quantidade de proteínas endógenas secretadas pela levedura é relativamente pequena o que torna a coluna uma excelente aplicação para a obtenção das defensinas vegetais recombinantes pela reduzida complexidade do sobrenadante contendo as proteínas secretadas. O procedimento de purificação foi realizado com auxílio de bomba peristáltica e as amostras foram coletadas em frações de 1 ml, analisadas em TRICINE-PAGE (Schagger & Von Jagow, 1987) e por meio de western blot.

Na figura 10a é mostrado o gel de poliacrilamida e o *western blot* da purificação da defensina rDRR230a. A coloração com AgNO₃ permitiu visualizar a proteína recombinante possivelmente num grau de pureza significativo em comparação ao extrato total e por meio do western blot foi confirmado que a banda visualizada refere-se a rDRR230a. Já em relação a defensina rSD2 a análise em gel de poliacrilamida corado com Comassie Blue G-250 mostrou que majoritariamente a banda visualizada refere-se a proteína de interesse (Figura 10b). Entretanto, a análise em gel corado com AgNO₃ mostrou que, contrariamente a rDRR230a, a amostra após a purificação encontrava-se com contaminantes. Ainda assim, de acordo com a sensibilidade da coloração com prata e Comassie Blue G-250 infere-se que os contaminantes estejam em quantidades menores que 100 ng e maiores que 2 ng, conforme especificações do fabricante.

Após coleta das amostras pós-purificação e análise da quantidade obtida por densitometria em gel utilizando BSA como proteína padrão, foi possível definir o rendimento médio da expressão das defensinas rDRR230a, 3,5 mg/l e rSD2, 3 mg/l, respectivamente.

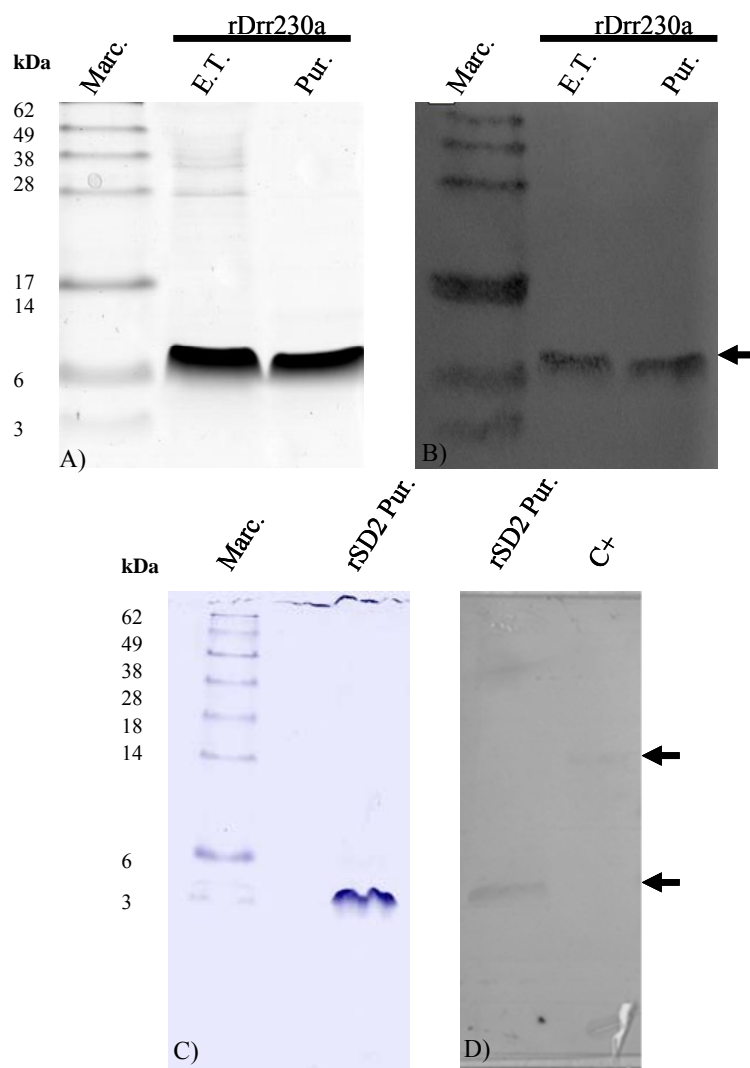


Figura 10. Análise da purificação das defensinas vegetais recombinantes rDRR230a e rSD2 em cromatografia de afinidade usando metal quelado (IMAC). A e C) TRICINE-PAGE (Schagger & Von Jagow, 1987) 15% das amostras purificadas de rDRR230a e rSD2 corados com AgNO_3 e Coomassie blue G-250, respectivamente. B e D) Western Blot das amostras coletadas durante a indução da expressão de rDRR230a e rSD2. As setas indicam as proteínas recombinantes com aproximadamente 5 kDa e o controle positivo (C+) para o western blot. Marc: marcador de proteína Seebblue[®].

Avaliação de Atividade Antifúngica e Antibacteriana das Defensinas Vegetais Recombinantes

Bioensaios contra Fungos Fitopatogênicos

A avaliação da atividade biológica da defensina vegetal rDRR230a foi verificada inicialmente por meio de ensaio de inibição de crescimento de hifas contra os fungos *Fusarium solani* sp. glycine e *Collethotricum gossypii* var. cephalosporioides. Cabe ressaltar que cada amostra foi adicionada a inóculos previamente preparados com a mesma quantidade de esporos em meio específico para avaliar o desenvolvimento das hifas e posteriormente foram incubados durante o mesmo período de tempo para a mensuração da OD₆₀₀.

A inibição ocasionada pela defensina recombinante rDRR230a ao desenvolvimento das hifas do fungo *F. solani* sp. glycine isolado de soja foi observada acentuadamente na concentração de 50 ng/μl, onde o desenvolvimento das hifas foi reduzido em 52% (de 0,8 da amostra controle para 0,38 contendo a defensina na concentração citada), *P* value <0.05 (Figura 11). Aditivamente, a partir da menor concentração testada, 5 ng/μl, também foi possível observar uma redução significativa de 25% (de 0,8 para 0,6), *P* value <0.05, no desenvolvimento do fungo (Figura 11). Ainda, nas amostras contendo concentrações intermediárias a inibição observada foi de: 10 ng/μl inibiu 27% (0,591), 25 ng/μl inibiu 36% (0,515) e 35 ng/μl inibiu 43% (0,462) (*P* value <0.05). As análises estatísticas (ANOVA e teste de comparação múltipla de Tukey's) foram realizadas por meio do programa Prism5 e os valores obtidos para OD₆₀₀ das amostras contendo a defensina rDRR230a foram comparadas com os valores obtidos para a amostra controle.

Secundariamente, a defensina rDRR230a também foi utilizada para avaliar o efeito no desenvolvimento de hifas do fungo *C. gossypii* var. cephalosporioides isolado de plantas de algodão. Considerando a comparação dos valores das OD₆₀₀ observadas para as amostras contendo a proteína recombinante foi possível observar que com 15 ng/μl o crescimento das hifas do fungo desafiado foi reduzido em 80% (de 0,723 na amostra controle para 0,130 na amostra contendo a defensina na concentração citada) (*P* value <0.05).

Ainda, com o dobro dessa concentração 30 ng/μl, praticamente não houve desenvolvimento de hifas (OD₆₀₀ de 0,011), assim como na concentração quatro vezes maior, 60 ng/μl (OD₆₀₀ de 0,01), *P* value <0.05, (Figura 12).

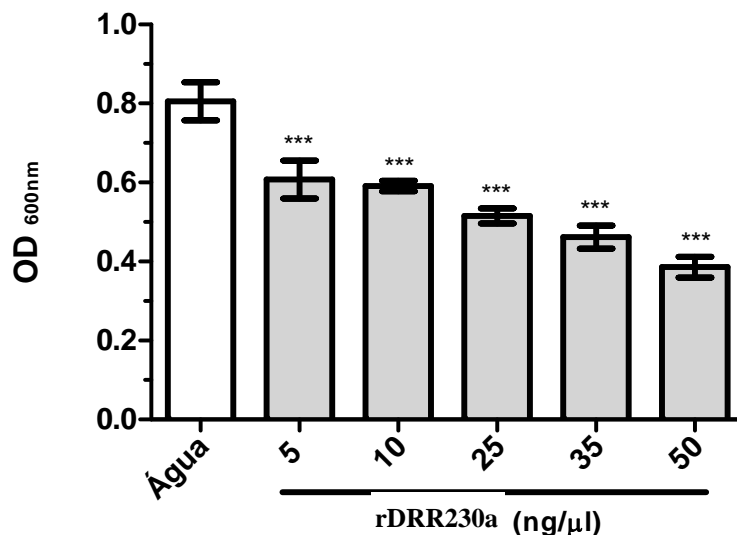


Figura 11. Análise do crescimento de hifas do fungo fitopatogênico *Fusarium solani* sp. glycine na presença da defensina vegetal recombinante rDRR230a. A defensina vegetal foi testada nas concentrações de 5-50 ng/μl. ANOVA e Teste de comparação múltipla de Tukey's foram calculados utilizando o programa Prism5. *** P<0.05, médias com diferença significativa.

Entretanto, na amostra contendo 0.2 ng/μl não foi possível observar qualquer efeito adverso provocado pela defensina vegetal recombinante (OD₆₀₀ de 0,761), P value >0.05, (Figura 12).

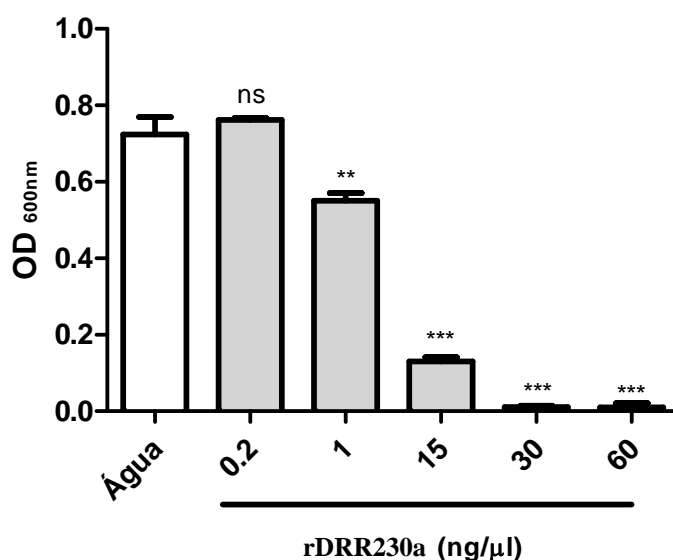


Figura 12. Análise do crescimento de hifas do fungo fitopatogênico *Colletotricum gossypii* var *cephalosporioides* na presença da defensina vegetal recombinante rDRR230a. A defensina vegetal foi testada nas concentrações de 0.2-60 ng/μl. ANOVA e Teste de comparação múltipla de Tukey's calculados pelo programa Prism5. **, *** P value <0.05, médias com diferença significativa. ns, P value >0.05, médias sem diferença significativa).

Ressalta-se que a inibição do desenvolvimento de hifas provocada pela presença da defensina vegetal rDRR230a contra os fungos *F. solani* sp glycine e *C. gossypii* var *cephalosporioides*, foi relativamente diferente entre si, uma vez que o segundo mostrou-se mais sensível ao efeito da proteína que o primeiro. Comparativamente, seria necessária uma quantidade aproximadamente oito vezes maior para se observar a inibição do fungo *F. solani* sp. glycine equivalente ao visualizado para o fungo *C. gossypii* var *cephalosporioides*.

A inibição do desenvolvimento de hifas do fungo *F. solani* sp. glyine provocada pela defensina vegetal rSD2 também foi observada. As concentrações 5 (OD₆₀₀ 0,665), 10 (OD₆₀₀ 0,633), 25 (OD₆₀₀ 0,686) e 35 ng/μl (OD₆₀₀ 0,654) foram estatisticamente similares entre si (P value >0.05), entretanto, diferentes da amostra controle (água) e a inibição observada foi entre 15-21% (Figura 13). Contudo, a amostra contendo 50 ng/μl (OD₆₀₀ 0,481)foi capaz de reduzir em 40% o desenvolvimento do fungo testado. O valor de P da amostra comparado com o controle (água, OD₆₀₀ 0,805) foi menor que 0.05, assim como, quando comparado com as outras concentrações testadas.

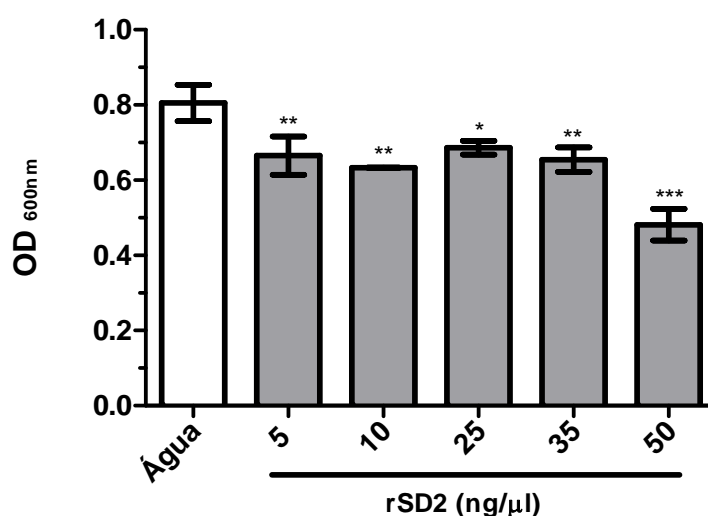


Figura 13. Análise do crescimento de hifas do fungo fitopatogênico *Fusarium solani* sp glycine na presença da defensina vegetal recombinante rSD2. A defensina vegetal foi testada nas concentrações de 5-50 ng/μl. ANOVA e Teste de Tukey's calculados pelo programa Prism5. *, **, *** P<0.05, médias com diferença significativa.

Em relação à inibição do desenvolvimento de hifas do fungo *C. gossypii* var. *cephalosporioides* a defensina vegetal rSD2 foi capaz de reduzi-lo em mais de 70% nas concentrações de 75 (OD₆₀₀ 0,217), 150 (OD₆₀₀ 0,202) e 300 ng/μl (OD₆₀₀ 0,102) quando comparadas com a amostra controle (água, OD₆₀₀ 0,776). A concentração de 60 ng/μl (OD₆₀₀

0,463) foi capaz de reduzir em apenas 24% o desenvolvimento das hifas fúngicas. A menor concentração testada (12 ng/μl, OD_{600nm} 0,916) não foi capaz de afetar o desenvolvimento do fungo (Figura 14). A maior concentração avaliada 300 ng/μl reduziu 87% do crescimento das hifas do fungo, entretanto, estatisticamente as concentrações de 75 e 150 ng/μl são similares (P value >0.05).

Analisando comparativamente a inibição do desenvolvimento das hifas dos fungos *F. solani* sp glycine e *C. gossypii* var *cephalosporioides*, a quantidade necessária da defensina vegetal rSD2 para resultar em uma inibição similar, seria de 63 μg/ml e 50 ng/μl, respectivamente, demonstrando que a sensibilidade dos fungos é similar no caso da defensina analisada.

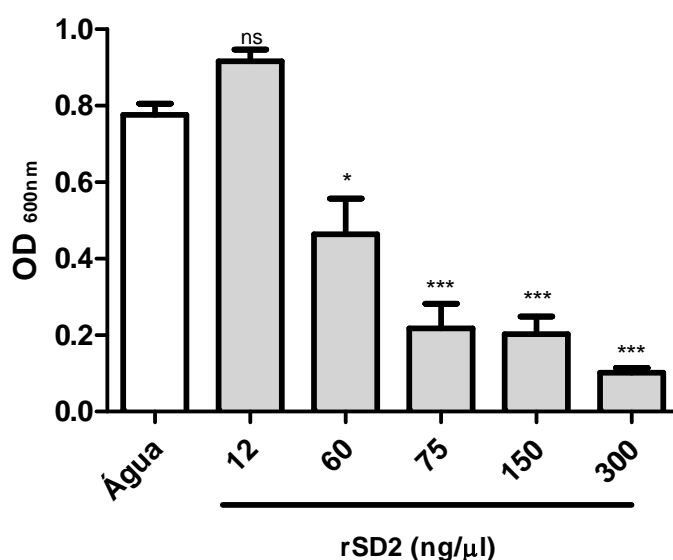


Figura 14. Avaliação do crescimento de hifas do fungo fitopatogênico *Colletotrichum gossypii* var *cephalosporioides* na presença da defensina vegetal recombinante rSD2. A defensina vegetal foi testada nas concentrações de 12-300 ng/μl. ANOVA e Teste de Tukey's calculados pelo programa Prism5. *** P<0.05, médias com diferença significativa. ns, P>0.05, médias sem diferença significativa.

A inibição da germinação de esporos ocasionada pela presença das defensinas vegetais recombinantes também foi avaliada. Os esporos usados foram os dos fungos testados anteriormente para a inibição de desenvolvimento de hifas, *F. solani* sp glycine e *C. gossypii* var *cephalosporioides*. Foi possível verificar que na concentração de 25 ng/μl a defensina vegetal rDRR230a inibiu completamente a germinação dos esporos do fungo *C. gossypii* var.

cephalosporioides, ação comparável com o peróxido de hidrogênio (70 μ M), reagente usado como controle positivo da inibição (Figura 15).

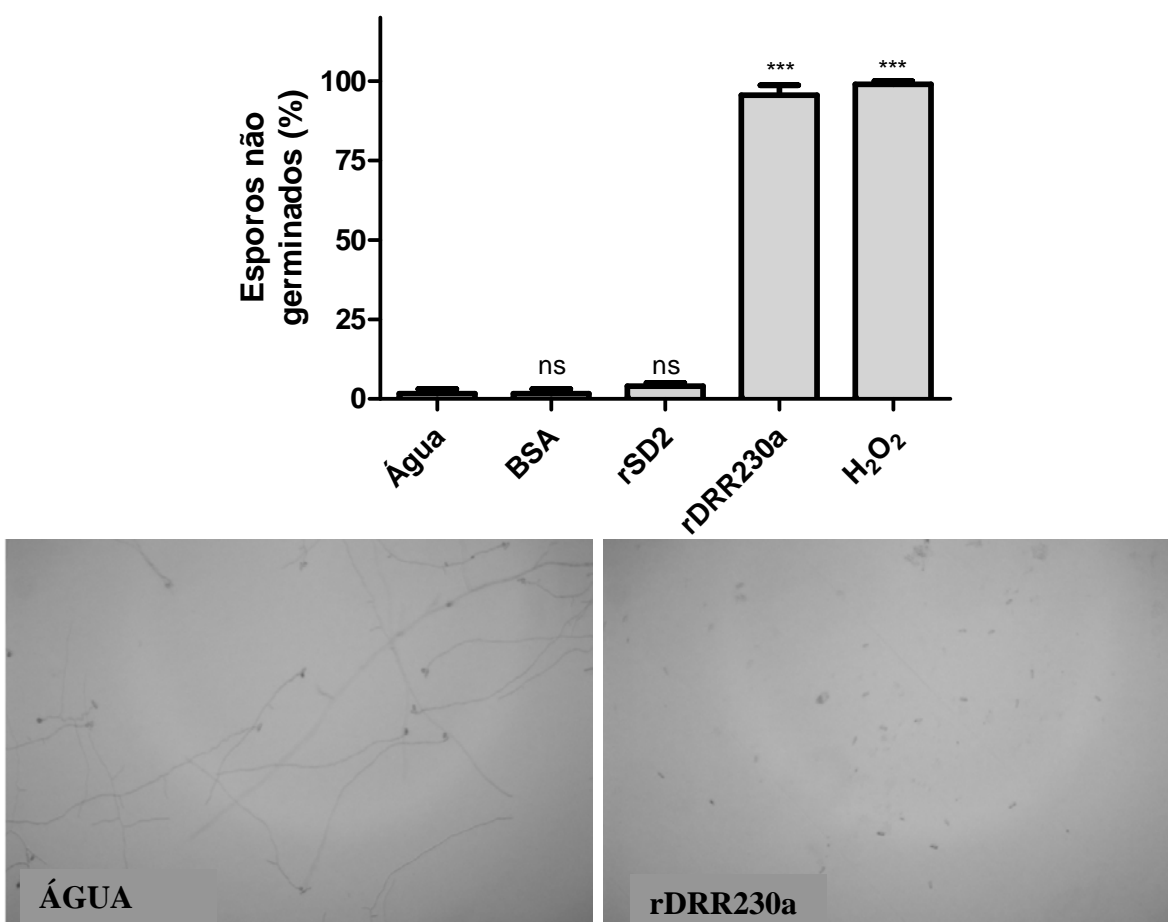


Figura 15. Bioensaio de germinação de esporos contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* usando as defensinas vegetais recombinantes rDRR230a e rSD2. A concentração utilizada no bioensaio foi de 25 ng/ μ l. Os controles negativos (água e BSA, 10 μ g/ μ l) e positivo (peróxido de hidrogênio na concentração de 70 μ M) são mostrados na figura. A contagem e o registro da imagem foi realizado por meio de análise em Microscópio óptico com aumento de 20x. Os ensaios foram realizados em triplicada. ANOVA e Teste de Tukey's calculados pelo programa Prism5. *** $P < 0.05$, médias com diferença significativa. ns, $P > 0.05$, médias sem diferença significativa.

Entretanto, a defensina vegetal rSD2, contrariamente a rDRR230a, não provocou qualquer efeito adverso a germinação do fungo mencionado acima (Figura 15). Estes resultados são concordantes com os observados no ensaio de inibição de germinação de hifas. Onde o fungo *C. gossypii* var *cephalosporioides* foi sensível a partir de 1 ng/ μ l de rDRR230a e >12ng/ μ l de rSD2 (Figura 12 e 14). Conjuntamente, estes resultados demonstram que nas situações dos ensaios realizados, a defensina vegetal rDRR230a foi mais eficaz no controle de *C. gossypii* var *cephalosporioides* do que a rSD2 nos dois métodos usados para avaliação da

atividade antifúngica. Entretanto, as duas defensinas recombinantes demonstraram capacidade em reduzir o crescimento do fungo analisado.

O segundo fungo avaliado quanto a inibição da germinação de esporo foi o *F. solani* sp glycine. Similarmente ao *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, na concentração testada a defensina vegetal rDRR230a foi capaz de inibir quase completamente a inibição da germinação dos esporos em um nível aproximado ao do controle positivo (Figura 16). Contudo, rSD2 novamente não foi capaz de inibir a germinação dos esporos do fungo *F. solani* sp glycine, mas, foi possível verificar que a defensina provocou um efeito diferenciado as hifas, pois, apresentaram sintomas de hiperramificação, diferentemente da amostra contendo apenas água (Figura 16). Se comparados os ensaios de inibição de germinação de esporos com o de desenvolvimento de hifas para este fungo, no caso de rDRR230a, aparentemente não há uma relação, uma vez que na concentração de 25 ng/μl houve inibição do crescimento das hifas em 37% e no caso de inibição de germinação de esporos o resultado foi de quase 100%. Entretanto, o tempo de avaliação de cada um dos ensaios é diferente, enquanto os esporos são incubados durante 12h, o ensaio de desenvolvimento das hifas dura 48h. Esta diferença metodológica é que permite avaliar a germinação e o desenvolvimento de hifas, observando-se resultados relativamente diferentes.

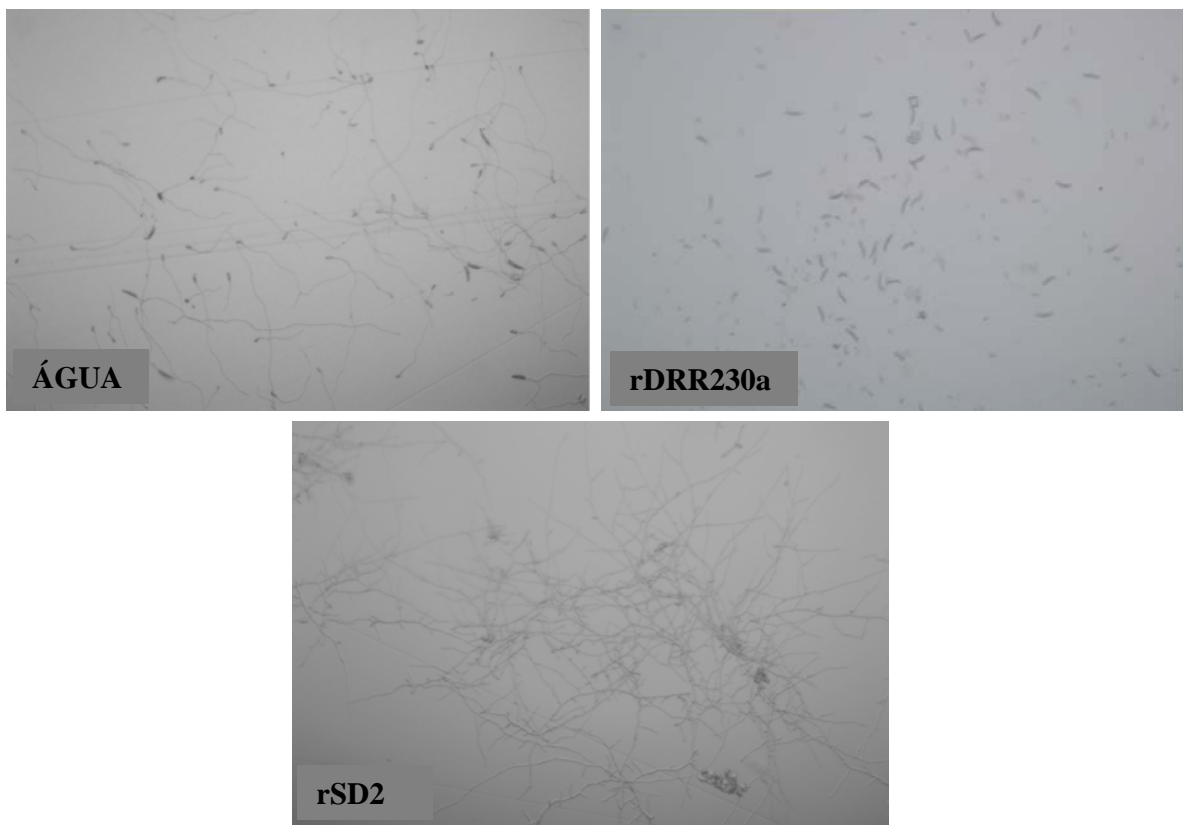
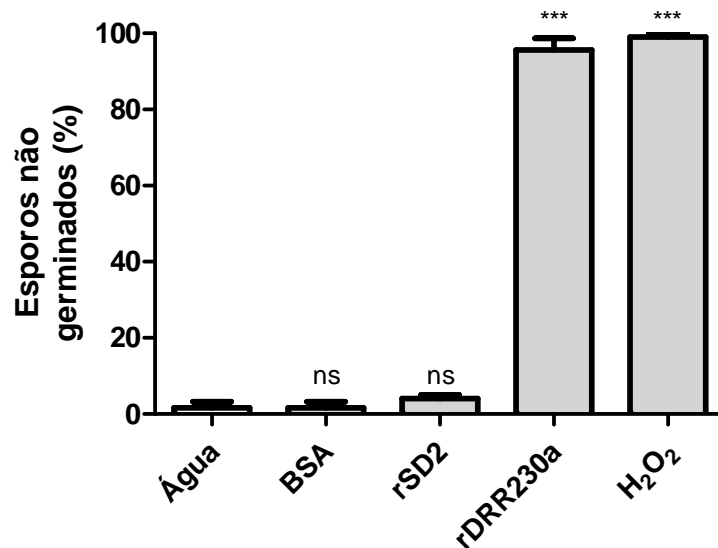


Figura 16. Bioensaio de germinação de esporos contra o fungo fitopatogênico *Fusarium solani* sp. glycine usando as defensas vegetais recombinantes rDRR230a e rSD2. A concentração utilizada no bioensaio foi de 25 ng/μl. Os controles negativos (água e BSA, 10μg/μl) e positivo (peróxido de hidrogênio na concentração de 70 μM) são mostrados na figura. A contagem e o registro da imagem foi realizado por meio de análise em Microscópio óptico em aumento de 20x. Os ensaios foram realizados em triplicada. ANOVA e Teste de Tukey's calculados pelo programa Prism5. *** P<0.05, médias com diferença significativa. ns, P>0.05, médias sem diferença significativa.

Bioensaios contra Bactérias

As defensinas recombinantes rDRR230a e rSD2 foram utilizadas também para avaliação da sua atividade antibacteriana. As bactérias patogênicas usadas nos ensaios foram, *Proteus* sp., *Salmonella* sp. e *E. coli*, todas Gram negativas. Ainda, foi avaliado o efeito das defensinas sobre a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* sp. kustaki como representante de bactérias Gram positivas. Entretanto, nenhuma atividade foi observada para a rSD2 nos ensaios realizados.

Na figura 17 são mostradas as curvas de sobrevivência com os valores de inibição demonstrados em relação ao crescimento bacteriano apenas em meio de cultura nas condições ideais no período de tempo analisado. A defensina rDRR230a foi capaz de reduzir o crescimento bacteriano das quatro espécies testadas, entretanto, o grau de redução foi significativamente diferente entre elas. No caso de *Proteus* sp. apenas na concentração de 128 ng/ μ l foi possível observar uma redução de 40% após 120 minutos de incubação e nos tempos de 180 e 240 min, 36 e 38%, respectivamente. Similarmente, o efeito adverso ocasionado a bactéria *E. coli* só foi observado na maior concentração testada (128 ng/ μ l) e reduziu o crescimento em 20% após 120 min de crescimento e 36% após 180 min. Contudo, o efeito de rDRR230a a bactéria *Salmonella* sp. ocorreu da seguinte maneira. Na concentração de 128 ng/ μ l após 60 min de incubação houve uma redução de 37% no crescimento bacteriano, após 120, 180 e 240 min houve de 70, 72 e 74%, respectivamente. Ainda, na concentração 2 vezes menor (64 ng/ μ l) após 120 min 49% do crescimento foi reduzido permanecendo até 240 min. E finalmente, na concentração 4 vezes menor (32 ng/ μ l) após 120 min foi possível observar redução no crescimento de 34%, atingindo o máximo em 180 e 240 min (36%). Conjuntamente, estes resultados demonstram a sensibilidade diferenciada dessas bactérias Gram negativas a defensina recombinante rDRR230a. A atividade da proteína recombinante contra a bactéria Gram positiva *B. thuringiensis* kustaki foi similar, apesar de menos pronunciada, a encontrada para *Salmonella* sp. Na maior concentração testada (128 ng/ μ l) a inibição iniciou-se aos 60 min de crescimento (60%) e persistiu até 240 min (72%), entretanto, a maior inibição observada foi após 120 min (85%). Semelhantemente, este ápice de inibição foi observado na concentração 2 vezes menor (64 ng/ μ l) onde aos 120 min de crescimento a redução no crescimento bacteriano foi de 67%. Aos 60, 180 e 240 min o valor encontrado foi de 48, 45 e 28%, respectivamente.

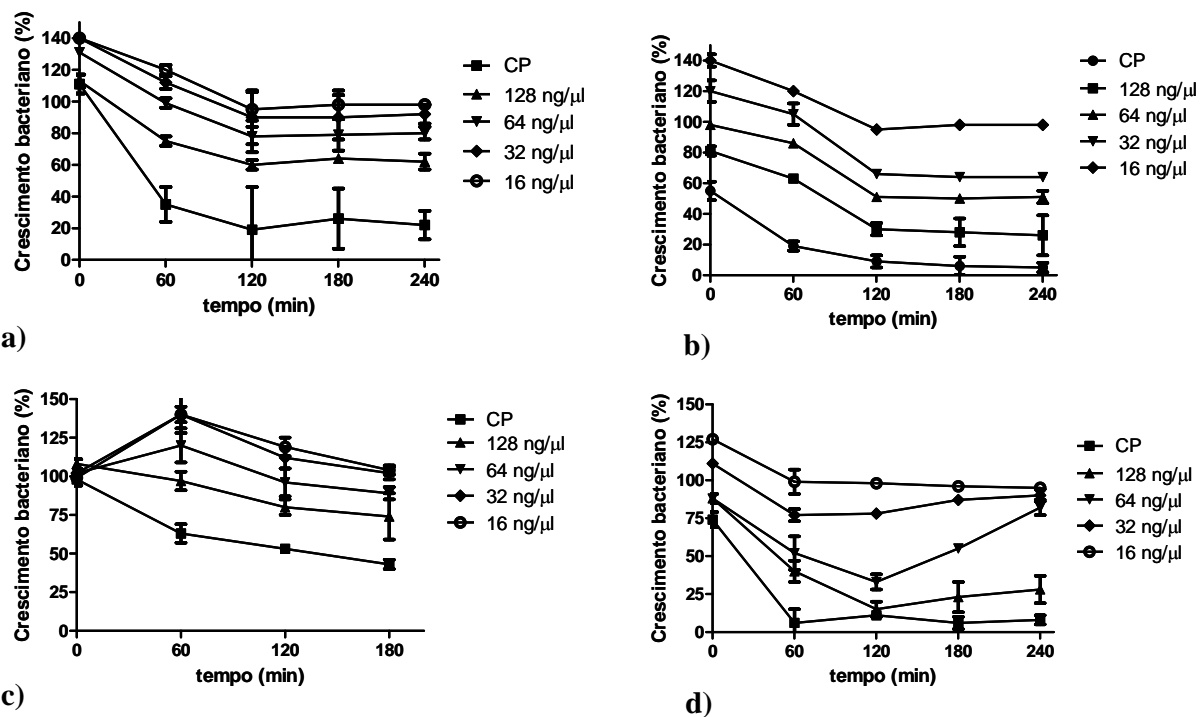


Figura 17. Avaliação da atividade antibacteriana da defensina vegetal recombinante rDDR230a. Os bioensaios foram realizados contra três bactérias patogênicas (Gram negativas), *Proteus* sp. (a), *Salmonella* sp. (b) e *E. coli* (c) e uma entomopatogênica (Gram positiva) *Bacillus thuringiensis* (d). A porcentagem de inibição resultou da comparação dos valores obtidos em cada tratamento e os controles negativos (crescimento normal) nos tempos analisados. No controle negativo as bactérias foram crescidas apenas em meio de cultura e no controle positivo foi adicionado o antibiótico clorafenicol na concentração 2.5 μg/ml.

Discussão

O nível de expressão observado para as plantas de *A. thaliana* geneticamente modificadas com os inibidores Recombinantes AIC3, AIG4 e AIA11, assim como para o inibidor selvagem α -AI1 foi compatível com a força do promotor 35SCaMV dobrado. Por exemplo, o inibidor de *Phaseolus coccineus* produzido em plantas de tabaco corresponderam a 0,05% das proteínas solúveis totais (Pereira *et al.*, 2006). Neste trabalho os inibidores em geral corresponderam a quase 10 vezes a produção obtida com plantas de tabaco expressando α -AIPc1. Ainda em comparação com a expressão de inibidor em plantas de tabaco, o inibidor Rye III foi produzido num nível de cerca 0,3% (Dias *et al.*, 2010), similar ao observado neste trabalho. Contudo cabe ressaltar que ambos inibidores foram expressos sob controle do promotor de fitohemaglutinina tecido específico.

A atividade detectada para os inibidores recombinantes AIC3, AIG4 e AIA11 foi similar a inibição observada para as α -amilases de *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 α -AI1, em pH 4.5 e 6.0, respectivamente (Kluh *et al.*, 2005). Entretanto, cabe salientar que as moléculas selvagens não possuíam atividade inibitória contra amilases do bicudo do algodoeiro e que a geração destes mutantes com atividade similar aos encontrados naturalmente é algo de relevante importância para o desenvolvimento de estratégias de controle da praga. Ainda, a inibição de 50% da atividade das α -amilases de *Hypothenemus hampei* utilizando o inibidor α -AIPc1 expresso em tabaco foi obtida apenas com mais de 75 ng do inibidor (Pereira *et al.*, 2006). Entretanto, o inibidor α -AIPc1 foi testado com o extrato intestinal de *H. hampei* que possui majoritariamente duas α -amilases (Valencia, *et al.*, 2000). O inibidor de feijão comum, PvCAI inibiu a ZSA com a concentração de 5.5 e 9 μ M, restando apenas 10% de atividade amilolítica residual (Dayler *et al.*, 2005). A inibição de 60% da atividade amilásica das α -amilases do bruquídeo *A. obtectus*, AoA1 e AoA2 provocada pelos inibidores de trigo 0.19 e 0.53, foi alcançada com a concentração de 3,75 μ M e 2.5 μ M, respectivamente (Franco *et al.*, 2005). Recentemente, Wang *et al.*, (2011) caracterizou a atividade de α -AIs purificados de acessos de feijão mutantes contra α -amilase pancreática de porco. Foi observado que a quantidade de inibidores necessária para inibir 50% da atividade enzimática variou de 0,4 μ g a 0,59 μ g. Por outro lado, os inibidores recombinantes gerados por técnicas mutacionais e produzidos em *A. thaliana* foram de 4 a 5 vezes mais ativos que os AIs selvagens de acessos de feijão mutantes. No mesmo contexto, Mehrabadi, *et al.*, (2012) caracterizou a capacidade

inibitória da proteína TAI (*Triticale aestivum inhibitor*) semi-purificada contra α -amilases salivares de um importante inseto-praga *Eurygaster integriceps* e demonstrou que na concentração de 0,79 μ g a atividade enzimática foi reduzida em 50% e a pH dependência da reação com um ótimo de inibição em pH 5. Contudo, os inibidores recombinantes aqui avaliados foram 7 vezes mais potentes contra a enzima-alvo alcançando inibição similar. Para inibir $\geq 60\%$ foi necessária a adição de 0,1 μ g de inibidor. Esta comparação corrobora com a alta capacidade inibitória dos AIs recombinantes e reafirma o potencial dessas moléculas para uso em programas de melhoramento.

Estes resultados indicam que os variantes selecionados são inibidores muito ativos para AGA. Por exemplo, Oliveira-Neto *et al.* (2003) relatou que o α -AI2 inibiu cerca de 20% da atividade das α -amilases intestinais do bicudo. Os estudos de modelagem molecular, utilizando a estrutura tridimensional predita das α -amilases do inseto em complexo com os inibidores, indicaram os resíduos envolvidos na interação e discutiu o tipo de inibição encontrada. Análises *in silico* demonstraram que as amilases do bicudo do algodoeiro possuem características estruturais levemente diferentes das amilases susceptíveis aos inibidores selvagens de feijão como o α -AI1, sendo uma delas uma reduzida flexibilidade num *loop* específico. 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 α -AI1 e similarmente as do bicudo do algodoeiro, tem um *loop* curto e rígido, com menos resíduos de glicina. Esta enzima é inibida pelo α -AI2 que tem dois resíduos a menos que o α -AI1 nas regiões de interação enzima/inibidor (Grossi-de-Sá *et al.*, 1997). Análises de seqüências demonstraram que o loop N-terminal do AIC3 é igual ao do α -AI1, contudo, do AIA11 e AIG4 é equivalente ao do α -AI2. No caso do loop C-terminal o AIC3 possui o do α -AI2 e AIA11 e AIG4 do α -AI1. Nesse sentido, apesar da inversão observada entre os inibidores variantes, o *Loop1* e 2 do α -AI2 possuem 2 aminoácidos a menos que o α -AI1 atendendo a sugestão estabelecida anteriormente para ocorrer a inibição de amilases como do bicudo do algodoeiro. Interessantemente, os resíduos herdados pelos três inibidores recombinantes foi diferenciado, por exemplo, partindo da região N-terminal para C-terminal o AIG4 difere do AIA11 em 14 posições. Essas modificações observadas sugerem que alguma mudança conformacional ocorreu devido as inversões de loops e outras substituições ao longo das moléculas favorecendo a interação dos inibidores recombinantes com a amilase do inseto-alvo.

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).

Os inibidores de α -amilases variantes, o α -AI1 e o α -AI2, são potenciais moléculas para uso em programas de melhoramento vegetal. Estas são foco de importantes linhas de pesquisa que avaliam a atividade, especificidade e efeitos tóxicos em organismos não alvos. Quando o α -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 α -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 α -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 α -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 α -AI1 purificado de sementes de feijão comum, cultivar Magna. Ele foi capaz de inibir as α -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 α -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 α -AI1 expresso em ervilha possui um padrão de glicosilação diferente ao da molécula naturalmente produzida em feijão comum, o que estimula sistemicamente o sistema imune de camundongos expostos aos extratos das plantas transgênicas (Prescott *et al.*, 2005). Além disso, o α -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 α -AI1 não geraram a imunogenicidade observada no caso do α -AI1 produzido em ervilha (Prescott *et al.*, 2005). Foi demonstrado que moléculas com capacidade de interferir na atividade de enzimas *in vitro* geralmente ocasionam efeitos

adversos no desenvolvimento biológico do inseto-alvo. Dias *et al.*, (2010) demonstrou isto quando incorporou a dieta artificial de bicudo do algodoeiro o inibidor de amilase de centeio RyeIII. Na concentração de 0,5% houve mortalidade de 32% das larvas de primeiro instar do referido isento, com o aumento da concentração em 3 vezes (1,5%) foi possível observar 72% de mortalidade. Nesse mesmo sentido, Farias *et al.*, (2007) demonstrou que a incorporação de inibidor de amilase de *Carica papaya* a dieta de *Callosobruchus maculatus* provocou uma mortalidade de 60% e redução da longevidade e fecundidade do inseto. Então, a disponibilidade dos AI recombinantes poderá gerar uma estratégia satisfatória para controle do bicudo do algodoeiro.

A defensinas vegetais expressas em *P. pastoris* neste trabalho foram produzidas em quantidades satisfatórias para a realização dos ensaios aqui apresentados. Contudo, os níveis de expressão não foram similares ao publicados na literatura como por exemplo para a defensina de sementes de ervilha PsD1 clonadas no plasmídeo pPIC9 e expressa em *P. pastoris*. A produtividade de rPsD1 foi de ≈ 13.8 mg/l de cultura (Almeida *et al.*, 2001). Ainda, a defensina AX2 também foi expressa em *P. pastoris* em processo fermentativo utilizando o plasmídeo pHIL (Kristensen *et al.*, 1999). Também foi produzida nessa levedura a defensina dimérica SPE10 de sementes de *Pachyrhizus erosus*, contudo, a produtividade não foi discutida, apenas a atividade biológica (Song *et al.*, 2005). Da mesma forma, a defensina de tomate TPP3 foi expressa em *P. pastoris* e estudos de cristalografia foram realizados após a sua purificação (Lay *et al.*, 2012). No mesmo sentido, a defensina isolada de *Nicotiana megalosiphon*, NmDef02, foi expressa em *P. pastoris* e foi ativa contra fungos fitopatogênicos com uma de IC₅₀ variando de 1-4 μ M (Portieles *et al.*, 2010). Outra abordagem metodológica que utilizou *P. pastoris* para expressão de defensina vegetal foi realizada por Chen *et al.*, 2004, onde o gene da defensina de *Vigna radiata*, VrD1, foi clonado no plasmídeo pPIC9K. O autor discute que a levedura metilotrófica foi utilizada pelas vantagens do sistema como a possibilidade de secreção da proteína de interesse para o meio de cultura, a produção da proteína ocorrer após indução e múltiplas cópias do gene de interesse podem ser integradas ao genoma da levedura provocando um aumento no nível de expressão (Chen *et al.*, 2004). Ainda, outros fatores relacionados a otimização da produção de proteína em *P. pastoris* podem ser citados por influenciarem o nível de expressão. A modificação da seqüência gênica para adequar os códons aos preferências da levedura é uma aspecto que contribui enormemente com o aumento significativo no nível de expressão da proteína desejada. Controle das quantidades de indutor, principalmente quando se utiliza metanol, pois a toxicidade deste pode reduzir a quantidade de proteínas recuperadas após a expressão. Eficiente aeração do sistema para que a levedura não entre no processo fermentativo, controle da atividade proteolítica que

naturalmente é apresentada na cultura deste organismo. Controle do pH e temperatura, da biomassa (Potvin *et al.*, 2012). Em relação a expressão de rDRR230a e rSD2, a produtividade foi comparável com a produtividade de 3 mg/l da defensina VrD1 também produzida em *P. pastoris* utilizando vetores e linhagens celulares diferentes (Chen *et al.*, 2004). Adequação no processo produtivo é necessário para aumentar a produtividade das duas proteínas recombinantes expressas neste trabalho, entretanto, com a quantidade obtida foi possível realizar a avaliação da atividade das moléculas. Um alternativa interessante para buscar aumento da produtividade das defensinas rDRR230a e rSD2 seria a otimização dos códons para os preferenciais da levedura aliada a produção em fermentadores com as adições de indutor, aeração e pH estritamente controladas ao longo do processo.

A defensina vegetal de ervilha DRR230a foi previamente estudada por Lai *et al.* (2002). Em seu estudo foi caracterizado o padrão do transcrito do gene da defensina em diversos órgãos da planta de ervilha, realizado o isolamento do gene e a expressão em planta modelo para avaliação da sua atividade biológica. A partir do trabalho foi possível verificar o envolvimento da DRR230a nos mecanismos de defesa vegetal, pois foi detectada a presença do seu transcrito constitutivamente nas folhas jovens e maduras, tendrilas, caule, raiz, radícula e parte aérea da plântula, flores e vagens. Ainda, após a infiltração das folhas de ervilha com fitopatógenos, a bactéria *Pseudomonas syringae* e o fungo *Ascochyta pinodes*, houve a estimulação da produção do transcrito de DRR230a, reforçando que além da defesa vegetal constitutiva a defensina está envolvida também com a resposta hipersensitiva. Após expressão em tabaco a DRR230a na concentração de 25 µg/µl foi capaz de inibir o desenvolvimento de hifas dos fungos *F. oxysporum* (≈ 60%), *Ascochyta pinodes* (≈ 56%), *Trichoderma reesei* (≈ 71%), *Fusarium solani* (≈ 51%), dentre outros. Conjuntamente, esses resultados demonstraram o potencial da defensina DRR230a para a utilização em programas de melhoramento vegetal, o que foi confirmado pela expressão da proteína em canola conferindo resistência a *Leptosphaeria maculans* (Wang *et al.*, 1999). Neste estudo, os resultados encontrados para *C. gossypii var cephalosporioides* e *F. solani* sp. glycine são compatíveis com os previamente demonstrados por Lai *et al.* (2002), entretanto, a proteína aqui testada foi proveniente de um sistema heterólogo de expressão e a molécula recombinante resultante possui uma cauda de histidina na sua região C-terminal. Contudo, o resultado de inibição de desenvolvimento de hifas de *F. solani* sp. glycine demonstrou que a rDRR23a foi capaz de inibir mais de 50% apenas na concentração duas vezes maior a encontrada por Lai *et al.* (2002). Isso indica que as modificações (6xHIS, quatro aminoácidos na N-terminal a mais, GLU ALA GLU PHE) inerentes a expressão heteróloga podem ter provocado esta redução de atividade observada o que já foi previamente observado para PsD1 (Cabral *et al.*, 2003) e

PDC1 (Kant *et al.*, 2009). Entretanto, o autor discute que a alta atividade antifúngica da DRR230a pode estar também associada as moléculas das plantas de tabaco agindo sinergisticamente com a defensina, necessitando-se de testes com a proteína pura para determinação da sua atividade. Neste trabalho é demonstrada a atividade antifúngica da defensina rDRR230a. Em comparação com as defensinas isoladas de *Heliophila coronopifolia*, Hc-AFP1 e Hc-AFP3 (de Beer & Vivier, 2011), a rDRR230a exibiu atividade similar, pois acima de 25ng/μl que foi possível observar a inibição de 50% no crescimento das hifas de *F. solani* e não foi observada hiperramificação das hifas.

Em relação à defensina de girassol SD2, prévios estudos demonstraram a possibilidade de expressão desse gene em levedura (Sotchenkov *et al.*, 2005). A defensina selvagem e de fusão a enzima liquenase foram produzidas em *P. pastoris* e foi mostrado que, tanto a primeira, como a segunda foram capazes de inibir o desenvolvimento do fungo *Fusarium culmorum* em ensaios de avaliação em meio sólido. Ainda, foi possível observar o efeito de hiperramificação de hifas provocado pela proteína selvagem e em fusão. Similarmente, a defensina produzida neste trabalho, rSD2, provocou um efeito de hiperramificação ao fungo fitopatogênico pertencente ao mesmo gênero do estudo anterior, *F. solani* sp. glycine. Aqui foi possível verificar que este efeito ocorreu na concentração de 25 ng/μl, mas a metodologia de análise de atividade utilizada por Sotchenkov *et al.* (2005) não permitiu definir a concentração da proteína, uma vez que o ensaio ocorreu com o uso de leveduras expressando a defensina crescendo concomitantemente ao fungo desafiado. Ainda, confirmando a hipótese levantada por Urgandarin *et al.*, (2000) e rSD2 possui atividade antifúngica podendo endogenamente estar envolvida com os processos de defesa vegetal que impedem que fungos ataquem a inflorescência dessa planta. Mesmo sendo menos ativa do que a defensina rDRR230a, a rSD2 foi capaz de inibir 40% do desenvolvimento das hifas de *F. solani* sp glycine, ainda causando hiperramificação conforme as defensinas Hc-AFP1 e Hc-AFP3 (de Beer e Vivier, 2011). Games *et al.*, 2008, purificou a defensina PvD1 de sementes de feijão *P. vulgaris* (cv. Pérola), caracterizou molecularmente e avaliou a atividade antifúngica da proteína purificada. A atividade contra o fungo fitopatogênico *F. solani* observada foi discreta, para atingir a maior inibição observada no trabalho (≈ 25%) foi necessária a adição de 100 ng/μl. Este resultado em comparação com a inibição de 40% observada neste trabalho para rSD2 contra *F. solani* demonstra que esta é uma proteína com uma atividade antifúngica considerável, pois a inibição observada ocorreu na concentração de 50 ng/μl, metade da observada para PvD1 e que não atingiu a mesma inibição.

Comparativamente, a defensina recombinante rDRR230a foi mais ativa do que a rSD2 para aos fungos avaliados, entretanto, cada uma aparentemente agindo de maneira diferente, como no caso do fungo *F. solani* sp glycine, já que a segunda provocou hiperramificação das hifas. Ainda, estes resultados são similares com os encontrados para defensinas vegetais de outras espécies, por exemplo, defensinas isoladas de *Nigella sativa* L. uma planta endêmica do Uzbequistão (Ns-D1 e Ns-D2) foram ativas contra os fungos fitopatogênicos como *F. oxysporum*, *F. graminearum* e *F. culmorum* provocando inibição de 50% nas concentrações de 9.5 ng/μl e 5.3 ng/μl, 6.9 ng/μl e 6.9 ng/μl para as duas últimas espécies, respectivamente (Roghozhin *et al.*, 2011). Resultado semelhante a estes foram observados para rDRR230a contra *C. gossypii* var cephalosporioides. No mesmo sentido, Kant *et al.* (2009) demonstrou que a PDC1 expressa em *P. pastoris* com 6xHIS na região N-terminal inibiu o desenvolvimento de hifas de *F. graminearum* em ≈50% na concentração de 5 ng/μl. Aditivamente, demonstrou que a ausência de 6xHis na região N-terminal da proteína permite que haja uma inibição ≈40% maior do que a proteína contendo as 6xHIS na mesma concentração (5ng/μl). Novamente, resultados similares foram observados apenas para rDRR230a contra o fungo causador da ramulose do algodoeiro (*C. gossypii* var cephalosporioides). Da mesma forma, extratos de folhas de tomate expressando a defensina de pimenta *cdefl* foram capazes de inibir o desenvolvimento de hifas dos fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium* sp. e *Curvularia* sp. (Zainal *et al.*, 2009).

Aditivamente, a rDRR230 foi testada contra bactérias Gram negativas e positivas. Foi demonstrado que a defensina recombinante inibiu o crescimento de forma significativa das bactérias das seguintes espécies: *Proteus* sp., *Salmonella* sp. e *B. thunriensis* não sendo observado qualquer efeito contra a bactéria *E. coli* na concentração testada. A inibição pronunciada foi observada na concentração de 128 ng/μl. Este resultado demonstra a alta atividade antibacteriana dessa defensina, em comparação com a Sesquina testada também contra *Proteus vulgaris* e que inibiu 50% do crescimento da bactéria na concentração 3,8 vezes maior do que rDRR230a e que contra espécies Gram positivas como *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis* a concentração provocando a mesma inibição do crescimento de *B. thunriensis* foi de 64 ng/μl, 10 vezes menor que o observado para aquelas espécies. A defensina rDRR230a aparentemente também foi mais potente que WCBAFP contra *P. vulgaris* que inibiu 50% do crescimento bacteriano com a concentração de 68 μM, contra *B. megaterium* e *B. subtilis* foi necessária a concentração de 102 e 101μM, respectivamente (Carvalho e Gomes, 2009). De acordo com a literatura e os resultados aqui apresentados, a defensina de ervilha rDRR230a aparentemente é um peptídeo antimicrobiano, apesar de serem

necessários mais estudos para caracterização da atividade contra células tumorais, efeito anti-HIV, dentre outros, mas foi observado no LIMPP que essa molécula foi capaz de causar mortalidade em larvas de nematoides e controlar o desenvolvimento do fungo causador da ferrugem asiática da soja (dados não publicados).

Neste trabalho não foram realizados experimentos para avaliação do possível mecanismo de ação das defensinas recombinantes. Todavia, algumas inferências relativas a este tema podem ser feitas levando-se em consideração o efeito observado para rDRR230a que não causou hiperramificação das hifas e rSD2 que provocou. Vários relatos na literatura discutem os possíveis mecanismos de ação das defensinas vegetais. Basicamente, há um mecanismo particular para cada defensina em questão, mas geralmente um receptor na membrana aproxima o peptídeo acumulando-o na membrana do organismo alvo e provocando um série de respostas em cadeia que finalmente provocam ruptura da membrana. O resultado final normalmente é o dano a membrana dos fungos ou bactérias, mas os mecanismos necessários para atingir o efeito biológico são bastante variados conforme a molécula estudada.

Foi demonstrado anteriormente que a defensina de sementes de rabanete Rs-AFP2 interage com o esfingolípido glicosilceramida componente da membrana e parede celular de fungos suscetíveis a defensina, entretanto não interage com o lipídeo humano, exibindo o caráter seletivo da molécula. Também já foram publicados estudos mostrando que muitos fungos fitopatogênicos possuem esse lipídeo nas suas estruturas celulares. Ainda, foi exibido que a interação da Rs-AFP2 com o lipídeo ocasiona permeabilização celular e influxo de íons Ca tendo como efeito a inibição do crescimento fúngico. Neste caso específico foi avaliado que a permeabilização celular não é causada pela formação de poros na membrana, mas sim pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e apoptose (Thevissen *et al.*, 2012). Similarmente, Melo *et al.*, 2011, demonstrou que a defensina PvD1 provocou permeabilização da membrana dos fungos testados, pois houve coloração do núcleo celular com SYTOX GREEN que não difunde pela membrana a não ser que exista algum dano na mesma, geração de ROS e interferência na atividade da H⁺ATPase, que é um indicativo que ocorrerá morte celular. Estas alterações fisiológicas foram observadas tanto para leveduras como para fungos filamentosos. De uma maneira geral, os estudos mostram que a composição da membrana fúngica é essencial para que a defensina vegetal possa causar seu efeito biológico. No caso do gênero *Fusarium*, glicosilceramidas são os principais glicolípidos neutros compondo a membrana. Para várias defensinas foi demonstrado que a ausência deste lipídeo permite ao fungo resistir aos efeitos das moléculas (Dm-AMP1, HsAFP1 e Rs-AFP2) indicando que tais lipídeos são possivelmente o sítio inicial de ligação das defensinas. Ainda, a defensina de sementes de ervilha PsD1 também interagem com membranas artificiais compostas por

glicosilceramidas e se liga a ciclina F no núcleo celular do fungo *Neurospora crassa*. Nesse sentido, provavelmente a rDRR230a também possui um sítio de interação específico na membrana fúngica, assim como a rSD2, provocando a permeabilização da membrana do organismo-alvo. Como rDRR230a ainda possui atividade antibacteriana, controversamente a rSD2, é possível que algum componente da parede celular ou membrana bacteriana compartilhe características físico-químicas com o possível receptor na membrana fúngica. Como glicosilceramida é um lipídeo neutro e a composição das membranas bacterianas possuem majoritariamente lipídeos carregados negativamente, são necessários estudos adicionais para avaliar esta intrigante atividade microbiana da defensina rDRR230a. Ainda, é importante estender as avaliações de atividade biológica das moléculas estudadas, uma vez que as proteínas e peptídeos antimicrobianos atuam com essa função, mas possuem várias outras atividades não relacionadas aos mecanismos de defesa vegetal, se enquadrando no conceito de promiscuidade funcional peptídica (Franco, 2011), por exemplo no caso dos resultados obtidos para rDRR23a que possui atividade antifúngica e antibacteriana contra bactérias patogênicas e entopatógenicas, assim como nematicida (dados não publicados).

Conjuntamente, estes resultados demonstram o potencial das defensinas vegetais para o controle de fungos fitopatogênicos sendo expressas em plantas de interesse agrônomico, inclusive já foi demonstrado que a expressão de defensinas em batata (Gao *et al.*, 2000; Portieles *et al.*, 2010) conferiu resistência aos fungos *Verticillium dahliae* e *Phytophthora infestans*, respectivamente, e em algodão resistência à *Fusarium* e *Verticillium* conforme teste da empresa australiana Hexima Ltd (Kaur *et al.*, 2011). Ainda, a expressão de Rs-AFP2 em plantas de trigo permitiu que plantas geneticamente modificadas, em condições de campo, controlassem o desenvolvimento dos fungos *Fusarium graminearum* e *Rizoctonia cerealis*. Aditivamente, a mesma proteína expressa em arroz conferiu resistência a importantes patógenos como *Magnaporthe oryzae* e *Rizoctonia solani*, e em tomate conferiu ao fungo *Alternaria solani* (Li *et al.*, 2011).

Conclusão e Perspectivas

Os resultados relativos a validação da atividade inibitórias das proteínas recombinantes AIC3, AIA11 e AIG4 e avaliação da atividade antimicrobiana das defensinas vegetais rDRR230a e rSD2 demonstrou que ambos os sistemas utilizados para a produção das proteínas de interesse foram eficientes para expressão das moléculas ativas. Os inibidores recombinantes foram produzidas nas plantas de *A. thaliana* em um nível condizente com os dados disponíveis na literatura para outras proteínas e foi possível validar a atividade das moléculas de interesse. Os dados mostrados neste trabalho corroboram com os anteriormente demonstrados (Del Sarto, 2007), mas a potência observada neste estudo foi maior, não invalidando os dados anteriores, pois, a abordagem utilizando uma mistura de plantas permitiu a triagem inicial indicando atividade biológica. Ainda, este trabalho gera uma nova perspectiva para o controle do bicudo do algodoeiro, por exemplo utilizando os inibidores em combinação com outras moléculas como toxinas Bt, inibidores de proteases, dentre outros, pois, poderá ser conferida à plantas de algodão resistência ao inseto. Adicionalmente, a extensão da caracterização inibitória contra outros organismos permitirá a discussão sobre os aspectos relacionados ao desenvolvimento da atividade aqui observada por ser proveniente de uma técnica mutacional direcionada para a enzima alvo e extratos das plantas aqui analisadas poderão ser incorporados em dieta artificial do bicudo do algodoeiro para avaliação do efeito tóxico *in vivo*.

Foi possível demonstrar a expressão das defensinas vegetais DRR230a de ervilha e SD2 de girassol em *P. pastoris*. As defensinas recombinantes mesmo possuindo cauda de histidina e EA na região N-terminal foram ativas contra os fungos fitopatogênicos *C. gossypii* var *cephalosporioides* e *F. solani* sp *glycine*. Ainda, a proteína rDRR230a foi capaz de inibir completamente a germinação de esporos dos dois fungos testados nas concentrações utilizadas e de reduzir o crescimento de importantes bactérias patogênicas pertencentes aos gêneros *Proteus* e *Salmonella*. Estes resultados demonstram o potencial dessas moléculas recombinantes para a utilização em plantas transgênicas, assim como, no caso de rDRR230a, a possibilidade de utilização no controle de patógenos humanos. A caracterização contra outros fungos de importância agrônômica e não alvos poderá ser realizada a partir da obtenção das defensinas vegetais por meio do método aqui apresentado. Estudos sobre os possíveis mecanismos de ação poderão conduzir para a identificação do tipo de interação das moléculas estudadas com a membrana dos organismos testados e esclarecer seu envolvimento na formação de poros de membranas, de permeabilização com passagem de íons essenciais, interação com alvos nucleares ou citoplasmáticos gerando respostas específicas. Ainda as

proteínas recombinantes poderão ser utilizadas para estudo da sua estrutura tridimensional por RMN, em ensaios com membranas artificiais para contribuir com o desenvolvimento de estratégias mais efetivas para o controle de fungos fitopatogênicos na agricultura nacional.

Referências Bibliográficas

- Abe, J.I., *et al.*, & Svensson, B. 1993. Arginine is essential for the α -amylase inhibitory activity of the α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. *Biochem. J.* 293, 151-155.
- Abe, K., *et al.*, 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., *et al.*, 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.
- Almeida M.S., *et al.*, 2002. Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. *J Mol Biol* 315:749–757.
- 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., *et al.*, 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.
- Balls, A.K., *et al.*, 1942. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem.*, 19, 951-961.
- Barbas *et al.* 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 88, 7978-82.
- Barbas III, *et al.*, 2001. Selection from Antibody Libraries. *In: Phage Display a Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, p. 10.1-10.20.
- Beekwilder, J., *et al.*, 1999. A phagemid vector using the E. coli phage shock promoter facilitates phage display of toxic proteins. *Gene*, 228, 23–31.
- Bellettini, S., *et al.*, 1998. Diferentes inseticidas do controle do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis*-Boheman 1843. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17, p.133.
- Bernfeld, P. 1955. Amylase alpha and beta. *Methods Enzymol.*, 1:149-58.
- Berrocal-Lobo, M., *et al.*, 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., *et al.*, 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 α -amylase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) have sequence homologies with wheat δ -purothionins. *FEBS Lett.* 279, 101-104.

- Bloch, C. Jr., *et al.*, and Thornton, J. M. 1998. ¹H NMR structure of an antifungal γ -thionin protein SI α 1: similarity to scorpion toxins. *Proteins*, 32:334-349.
- Bompard-Gilles, C., *et al.*, and Payan, F. 1996. Substrate mimicry in the active centre of a mammalian α -amylase: structural analysis of an enzyme inhibitor complex. *Structure*, 4: 1441-1452.
- Botella, M.A., *et al.*, 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.
- 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.
- Broekaert, W. F., *et al.*, and R. W. Osborn. 1997. Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16:297–323.
- Broekaert, W. F., *et al.*, 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., *et al.*, 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., *et al.*, 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., *et al.*, 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., *et al.*, and Broekaert, W.F. 1992. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides form *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.*, 267:2228-2233.
- Campos, F.A.P., *et al.*, 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., *et al.*, 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.
- Carvalho, A. de O., Gomes, V. M. 2009. Plant defensins—Prospects for the biological functions and biotechnological Properties. *Peptides* 30, 1007–1020.
- Cassetari Neto, D.; *et al.*, 2001. In Controle de fungos na parte aérea do algodão no Mato Grosso III Congresso Brasileiro de Algodão, Campo Grande.
- 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., *et al.*, 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, nº1, pp. 76-82.
- Ceci, L.R., *et al.*, 2003. Selection by phage display of a variant mustard trypsin inhibitor toxic against aphids. *The Plant Journal*, 33, 557–566.

- Cereghino, J. L. and Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology, Reviews* 24 , 45-66.
- Chen et al. 2004. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2256-2261.
- Chen, Y., et al., and Busch, S.J. 2002. Phage Display of Functional Human TNF- α 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.
- Chrispeels, M.J. and Kitamura, K. 1996. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed α -amylase inhibitor of common bean. *Entomol. Exp. Appl.*, 79, 309-315.
- Christeller, J.T., et al., 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., et al., 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.
- Colgrave, M.L. and Craik, D.J. 2004. Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. *Biochemistry*, 43, 5965-5975.
- Cornet B., et al., 1995. Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure*; 3: 435-48.
- Craik, D. J. et al., 1999. Plant cyclotides: a unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J. Mol. Biol.*, 294, 1327-1336.
- Daly, N.L. et al., 2009. Discovery, structure and biological activities of cyclotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61, 918-930.
- Dangl, J.L., et al., and Richberg, M.H. 1996. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, 8:1793-1807.
- Del Sarto, R. P. 2007. Variantes de Inibidores de α -amilases selecionados por *Phage Display* com atividade para α -amilases do Bicudo do Algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Coleptera: Curculionidae). Universidade de Brasília. 73 p.
- Dayler, C.S.A., et al., and Grossi de Sa, M.F. 2005. Identification of a novel bean α -amylase inhibitor with chitinolytic activity. *FEBS Letters*, 579(25):5616-2560.
- de Beer and Vivier. 2011. Four plant defensins from an indigenous South African Brassicaceae species display divergent activities against two test pathogens despite high
- Desjobert C., et al., 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., et al., and Grossi-de-Sá, M.F. 2005. Molecular cloning and expression of an α -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., et al., and Lamb, C.J. 1994. Early events in the activation of plant defense response. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32, 479-501.

- Douliez, J.P. *et al.*, 2001. Disulfide bond assignment, lipid transfer activity and secondary structure of a 7-kDa plant lipid transfer protein, LTP2. *Eur. J. Biochem.*, 268, 1400-1403.
- E. O. Mello *et al.*, 2011. Antifungal Activity of PvD1 Defensin. *Curr Microbiol.* 62:1209–1217.
- El Zoeiby, 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., *et al.*, 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. and Raven, P.H. 1964. Butterflies and plants: a study in co-evolution. *Evolution*, 1:18.755.
- Rogozhin, E. A. *et al.*, 2011. Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 131e137.
- Faye L. and Gomord V. 2004. Post translational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr. Opin Plant Biol*;7.2.:171–81.
- Feitelson, J.S. *et al.*, 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond, *BioTechnology* 10, 271–275.
- Feng, G.H., *et al.*, and Reeck, G.R. 1996. α -Amylase inhibitors from wheat: a sequences and patterns of inhibition of insect and human α -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., *et al.*, 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., *et al.*, and Grossi de Sa, M.F. 2005. Characterization of two *Acanthoscelides obtectus* α -amylases and their inactivation by wheat inhibitors. *J Agricultural Food Chemistry*, v. 53, n. 5, p. 1585-1590.
- Franco, O.L., *et al.*, 2002. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. *Eur. J. Biochem.*, 269: 397-412.
- Franco, O.L., *et al.*, and Grossi de Sa, M.F. 2000. Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.* 267 (8), 1466-1473.
- Franco, O.L., *et al.*, and Grossi-de-Sa, M.F. 2004. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Phytochemistry* 65, 81-89.
- Freitas, T. M. Q. *et al.*, Dano devido à podridão vermelha da raiz na cultura da soja. *Ciência Rural*, v. 34, n. p. 991-996. 2004.
- Potvin, G. *et al.*, 2012. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal* 64, 91– 105.
- Gallo, D., *et al.*, 1988. Manual de Entomologia Agrícola. 2ª edição, Ed. Agronômica Ceres, São Paulo, 649 p.
- Gallo, D., *et al.*, 2002. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, 920p.

- Games, *et al.* 2008. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides* 29, 2090–2100.
- Gao, A., *et al.*, 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat Biotechnol.* 18: 1307–1310.
- Garcia-Casado, G.L., *et al.*, and Salcedo, G. 1994. Rye inhibitors of animal α -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., *et al.*, and Garcia-Olmedo, F. 1991. Site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli* of WMAI-1, a wheat monomeric inhibitor of insect α -amylase. *Plant Mol. Biol.* 17, 1005-1011.
- Garcia-Olmedo, F., *et al.*, 1995. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol* 3: 72–74.
- Garcia-Olmedo, F., *et al.*, and Carbonero, P. 1992. Trypsin/ α -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., *et al.*, 1992. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance, in: *Biotechnology in Agriculture n° 7: Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*, CAB International, pp. 155–181.
- Giddings, G., *et al.*, 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol*;18.11.:1151–5.
- Gomes, A.D., *et al.* and 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., *et al.* and Chrispeels, M.J. 1997a. Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor that inhibits the α -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*) α -amilase 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.
- Wang, H. H. *et al.*. 2011. *Food Chemistry* 128 ,1066–1071.
- H.R. Waterham, M.E. Digan, P.J. Koutz, S.V. Lair, J.M. Cregg. 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter, *Gene* 186, 37–44.
- 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., *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., and Boulter, D. 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance a critical review. *Crop Protection* 18, 177-191.
- Iamamoto, M. M. *et al.* In Controle químico de ramulose no algodoeiro, III Congresso Brasileiro de Algodão, Campo Grande-MS. , 2001; EMBRAPA/CNPA-CPAO, U., Ed. Campo Grande-MS. , 2001; pp 625- 626.
- Ignacimuthu S. and Prakash, S. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea with α -amylase inhibitor gene for insect resistance. *J. Biosc.* 31(3), 339-345
- Invitrogen, Pichia Fermentation Process Guidelines , available online: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pichiaferm_prot.pdf, acessado em 01/09/2011.
- Ishimoto, M. and Kitamura, K. 1989. Growth inhibitory effects of an α -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 α -amylase inhibitor in the common bean. *Plant Physiology*, 11: 393-401.
- Ishimoto, M., *et al.*, 1996. Bruchis resistance of transgenic azuki bean expressing seeds α -amylase inhibitor of the common bean. *Entomol. Exp. Appl.* 79:309-315.
- Iulek, J., *et al.* and Grossi de Sá , M.F. 2000. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereale* (Rye). *Inter. J. Biochem. Cell Physiol.* 32, 1195-1204.
- Ahn, J. *et al.* 2007. Translation elongation factor 1- α gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter, *Appl. Genet. Mol. Biotechnol.* 74, 601–608.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 45-66.
- de Almeida, J.R.M. *et al.* 2005. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene .PGK1. from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Yeast* 22, 725–737.
- Kaur, J. *et al.* 2011. Can plant defensins be used to engineer durable commercially useful fungal resistance in crop plants? *Fungal biology reviews* 25, 128-135.
- Jegou, S. *et al.* 2000. Purification and structural characterization of LTP1 polypeptides from beer. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5023-5029.
- Jennings, C. *et al.* 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., *et al.* 1998. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science* 131,1–11.
- K. Thevissen *et al.* 2012. RsAFP2 affects *C. albicans* cell wall and septin. *Molecular Microbiology* . 1:15. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08017.x
- Kanzaki, H. *et al.* 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., *et al.* and Yamaguchi, H. 1996. Complete sequence, subunit structure and complexes with pancreatic α -amylase of an α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney beans. *J. Biochem.*, 120: 177-183.
- Kay, R., *et al.* 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. *et al.* 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.
- Kluh, I. *et al.* 2005. Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of alpha-amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*, 66(1):31-9.
- Kobayashi, Y. *et al.* 1991. The cysteine stabilised α -helix: a common structural motif of ion channel blocking neurotoxic peptides. *Biopolymers*; 31:1213–20.
- Koike M. *et al.* 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. and 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.
- Koukiekoulo, R. *et al.* and Santimone, M. 2001. Mechanism of porcine pancreatic α -amylase. Inhibition of amylose and maltopentaose hydrolysis by α -, β - and χ -cyclodextrins. *Eur. J. Biochem.* 268, 841-848.
- Koukiekoulo, R. *et al.* and Santimone, M. 1999. Mechanism of porcine pancreatic α -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., *et al.* and Mosbach, K. 1997. Selection of a cyclic nonapeptide inhibitor to α -chymotrypsin using a phage display peptide library. vol. 3, n° 3, 149-159.
- L.R. Farias *et al.* 2007. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87 , 255–260.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lai, F.M. *et al.* 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. *et al.* 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.
- Lay, F.T. and Anderson, M.A. 2005. Defensins-components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 6, 85-101.
- Levina, A.M. and Weiss, G.A. 2005. Optimizing the affinity and specificity of proteins with molecular display. *Mol. BioSyst.*, 2006, 2, 49–57
- Li, Z. *et al.* 2011. *Funct. Integr. Genomics*. 11:63–70.
- Liu, D. *et al.* 1994. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1888-1892.
- Loo, B. van. *et al.* and Janssen, D.B. 2004. Directed Evolution of Epoxide Hydrolase from *A. radiobacter* toward Higher Enantioselectivity by Error-Prone PCR and DNA Shuffling. *Chemistry & Biology*, 11: 981–990.
- Lowman, H.B. *et al.* and Wells, J.A. 1991. Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry*, 30:10832–10838.

- Mehrabadi, M. *et al.* 2012. Inhibitory activity of proteinaceous α -amylase inhibitors from Triticale seeds against Eurygaster integriceps salivary α -amylases: Interaction of the inhibitors and the insect digestive enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 102, 220–228.
- Mahmoud K. 2007. Recombinant protein production: strategic technology and a vital research tool. *Res J Cell Mol Biol.* 1.1.:9-22
- Marcus, J.P. *et al.* 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. and Lauda, C.M. 1975. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α -amilase, from kidney bean, *Phaseolus vulgaris*, *Journal of Biological Chemistry*, 250,(20): 8030-8037.
- Mason, H.S. *et al.* 2002. Edible plant vaccines: application for prophylactic and molecular medicine. *Trends Mol Med*;8.7.:324–9.
- McCafferty, J. *et al.* and Chiswell, D. J. 1990. *Nature* 348, 552–554.
- 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. *et al.* 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., *et al.* and 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., *et al.* and Ary, M.B. 1999. α -Amylase from cowpea seeds. *Prot. Pept. Lett.* 6, 387-392.
- Mendez, E. *et al.* 1990. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, g-hordothionin, from barley endosperm. *Eur J Biochem*; 194:533–9.
- Monnerat, R.G. *et al.* 2000. Criação massal do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* em laboratório. *Comunicado Técnico*, nº 46, p. 14.
- Morton, R.L. *et al.* and 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. *et al.* and 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. *et al.* and Yamaguchi, H. 1997. Structural characterization of an α -amylase inhibitor from a wild common bean (*Phaseolus vulgaris*): insight into the common structural features of leguminous α -amylase inhibitors. *J. Biochem.*, 121: 350-354.
- Nishizawa, K. *et al.* 2006. Assessment of the importance of α -amylase inhibitor-2 in bruchid resistance of wild common bean. *Theor. Appl. Genet.* DOI 10.1007/s00122-006-0476-y.

- Cós, O. *et al.* 2006. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review, *Microb, Cell Fact* 5,17.
- O.L. Franco. 2011. Peptide promiscuity: An evolutionary concept for plant defense. *FEBS Letters* 585, 995–1000.
- Oard, S. *et al.* 2007. Is there a difference in metal ionbased inhibition between members of thionin family: molecular dynamics simulation study? *Biophys. Chem.*, 130, 65-75.
- O'Donnell, M.D. *et al.* and 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. *et al.* 1994. *Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops*. Elsevier, Amsterdam. 590–594.
- Oliveira-Neto, O.B. *et al.* 2003. Molecular Cloning of α -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. *et al.* and 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. *et al.* and 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. *et al.* and Desseaux, V. 2003. On the mechanism of α -amylase: Acarbose and cyclodextrin inhibition of barley amylase isozymes. *FEBS J.* 270, 3871-3879.
- Padovan, L. *et al.* and Tossi A. 2010. Structural Aspects of Plant Antimicrobial Peptides. *Current Protein and Peptide Science*, 2010, 11, 210-219.
- Patel, S.U. *et al.* and Thornton, J.M. 1998. Structural Studies of *Impatiens balsamina* Antimicrobial Protein (Ib-AMP1). *Biochemistry*, 37: 983-990.
- Pellegrini, P. B. and 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.
- Pelegri, P. B., *et al.* and Grossi-de-Sa, M.F. 2011. Antibacterial Peptides from Plants: What They Are and How They Probably Work. *Biochemistry Research International*, Vol. 2011, 1-9, doi:10.1155/2011/250349.
- Pennell, R.I. and Lamb, C., 1997. Programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 9(7):1157-1168.
- Pereira, R. A. *et al.* 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.
- Portieles, R. *et al.* 2010. NmDef02, a novel antimicrobial gene isolated from *Nicotiana megalosiphon* confers high-level pathogen resistance under greenhouse and field conditions. *Plant Biotechnol.J.* 8, 678-690.
- Prescott, V.E. *et al.* 2005. Transgenic expression of bean alpha-amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicity. *J Agric Food Chem.*53(23)-9023-30.
- Desai, P. N. *et al.* 2010. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances* 28. 427–435.

- Pusztai, A. *et al.* 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. *et al.* 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.
- Dias, S. C. *et al.* 2010. Investigation of insecticidal activity of rye a-amylase inhibitor gene expressed in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) toward cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98,. 39–44.
- Sales, M.P. *et al.* and Xavier-Filho, J. 2000. Do legumes storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? *Plant Physiol.*, 124:515-522.
- Sambrook, J. *et al.* and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sarmah, B.K. *et al.* 2004. Transgenic chickpea seeds expressing high levels of a bean α -amylase inhibitor, *Mol. Breed.* Vol. 14, n° 1, 73-82 .
- Segura, A. *et al.* 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.
- Segura, A. *et al.* 1999. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 12, 16-23.
- Selitrennikoff, C.P. 2001. Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no.7, p. 2883-2894.
- Seon, J.H. *et al.* 2002. A unique strategy for recovering recombinant proteins from molecular farming: affinity capture on engineered oilbodies. *Plant Biotechnol J.*;4:95-101.
- Shade, R.E. *et al.* 1994. Transgenic pea seeds expressing the α -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. *et al.* 1995. Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.), *Plant Physiol.* 107, 1233–1239.
- Silva, C.P. *et al.* 2001. Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α -amylases in response to different diets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 41–50.
- Silva, C.P. *et al.* 1999. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 355–366.
- Silva, M.C.M. da *et al.* and Neshich, G. 2000. Analysis of structural and physico-chemical parameters involved in the specificity of binding between α -amylases and their inhibitors. *Protein Eng.* Vol. 13, n° 3, 167-177.

- Silva, M.C.M. *et al.* and Grossi de Sa, M.F. 2004. Mutants of common bean α -amylase inhibitor-2 as an approach to investigate binding specificity to α -amylases. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 3, p. 201-208.
- Soumillion, P. *et al.* 1994. Selection of beta-lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. *J. Mol. Biol.*, 237: 415-422.
- Stec, B. *et al.* 2004. Proposal for molecular mechanism of thionins deduced from physico-chemical studies of plant toxins. *J. Pept. Res.*, 64, 210-224.
- Stemmer, W. P. C. 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature (London)* 370, 389-391.
- Stintzi, A. *et al.* and Fritig, B., 1993. Plant "pathogenesis-related" proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75: 687-706.
- Streatfield, S.J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnol J* 2007;5.1.:2-15.
- Strobl, S. *et al.* and Glockshuber, R. 1998. A novel strategy for inhibition of α -amylases: yellow meal worm α -amylase in complex with the Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. *Structure* 6, 911-921.
- Suzuki, K. *et al.* 1993. Growth inhibitory effect of an α -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. *et al.* 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. *et al.* 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. *et al.* 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, 7:573-588.
- Thomma, B.P. *et al.* 2002. Plant defensins. *Planta* 216:193-202.
- Twyman, R.M. *et al.* 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol*; 21.12.:570-8.
- Valência, A. *et al.* and Chrispeels, M.J. 2000. α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochem.Mol. Biol.* 30, 207-213.
- Varner, J.E., and Lin, L.S., 1989. Plant cell wall architecture. *Cell*, 56:231-239
- Veen, B.A. van der *et al.* 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. *et al.* 2002. Phage display selects for amylases with improved low pH starch-binding. *J Biotechnol.* 2002 Jun 13;96(1):103-18.
- Vilchez, S. *et al.* 2004. Display of biologically functional insecticidal toxin on the surface of λ phage. *American Society for Microbiology*. vol. 70, no11, pp. 6587-6594.

- Volpicella, M. *et al.* 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. *et al.* and Weissman, J.S. 2002. Directed Evolution of Substrate-Optimized GroEL/S Chaperonins. *Cell*, 111: 1027–1039.
- Wong, J.H. and Ng, T.B. 2005. Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. *Peptides*; 26:1120–6.
- Wong, J.H. and Ng, T.B. 2005. Vulgarinin, a broad-spectrum antifungal peptide from haricot beans (*Phaseolus vulgaris*). *IJBCB*; 37:1626–32.
- Wang, Y. *et al.* 1999. Constitutive expression of pea defense gene DRR206 confers resistance to blackleg (*Leptosphaerium maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*), *Mol. Plant Microbe Interact.* 2, 410-418.b.
- Yamagata, H. *et al.* and Iwasaki, T. 1998. Rice bifunctional α -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 α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney bean. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57: 297-302.
- Ye X.Y. and Ng T.B. 2001. Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-kda protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. *Biochem Biophys Res Commun*;285:424–9.
- Ye X.Y. and Ng T.B. 2002. A new antifungal peptide from rice beans. *J Peptide Res*; 60:81–7.
- Young, N.M. *et al.* and Chrispeels, M.J. 1999. Post-translational processing of two α -amylase inhibitors and an arcelin from the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *FEBS Lett.*, 446: 203-206.
- Young, N.M. *et al.* and 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.
- Yuan, L. *et al.* and Keenan, R. 2005. Laboratory-Directed Protein Evolution. *Microb. and Mol. Biol. Reviews*, 373–392.
- Zhang, J.-H. *et al.* and 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.
- Zhang, X.C. *et al.* 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.

Anexo I. Documento de submissão de patente AIs



Espaço reservado para protocolo

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa**

1.2 Qualificação: EMPRESA PÚBLICA 1.3 CNPJ/CPF: **00.348.003/0001-10**

1.4 Endereço completo: **PqEB Parque Estação Biológica - Edifício Sede - Final W3 Norte - Plano Piloto - Brasília DF**

1.5 CEP: **70770-901** 1.6 Telefone: **(61) 3448.4545** 1.7 Fax: **(61) 3348.4158**

1.8 E-Mail: **chefeaii@embrapa.br**

continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

3. Título da Invenção, Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição (54):

MUTANTES DE INIBIDORES DE ALFA AMILASES ISOLADOS DE Phaseolus vulgaris COM PROPRIEDADES DE CONTROLAR INSETOS-PRAGA, COMPOSIÇÕES CONTENDO TAIS MUTANTES E MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS

continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido nº _____ Data de Depósito: _____

5. Prioridade: interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

Assino aqui se o(s) mesmo(s) requerer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: **Maria Fátima Grossi de Sá**

6.2 Qualificação: **Biomédica**

6.3 CPF: **151364691-53**

6.4 Endereço completo: **Pq Estação Biológica W5 Final, Asa Norte, Brasília/DF**

6.5 CEP: **70770-917** 6.6 Telefone: **(61) 3448-4902** 6.7 Fax: **(61) 3340-3624**

6.8 E-mail: **fatimasa@conaragon.embrapa.br**

continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74):

9.1 Nome: Luciana Harumi Morimoto Figueiredo

9.2 CNPJ/CPF: 216.532.048-85

9.3 APUCAB

9.4 Endereço completo: Parque Estação Biológica – PqEB – Edifício Sede – S/N - Asa Norte – Plano Piloto – Brasília- DF

9.5 CEP: 70770-901

9.6 Telefone: (61) 3448.4545

9.7 Fax: (61) 3347.4158

9.8 E-mail: luciana.Figueiredo@embrapa.br

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados)(se houver):

Listagem de sequências em arquivo eletrônico: 02 nº de CDs ou DVDs (original e cópia)

Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: 01 fls.

Listagem de sequências em formato impresso: 07 fls.

Declaração de acordo com artigo 10 da Resolução INPI Nº 228/09: 01 fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número das folhas):
(Deverá ser indicado o nº. total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento (2019GR000137)	01 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório Descritivo	56 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	01 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	06 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	07 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. De contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	01 fls.
<input type="checkbox"/>	11.9 Outros que são aqueles definidos no campo 11 (especificar): Nosso Número: 00.000.2.2.10.0307437.0 (01fl), Autorização de inventor (04fls)				05 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 86 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Brasília-DF, 29 de abril de 2011

Local e Data



Assinatura e Carimbo

Luciana Harumi Morimoto Figueiredo
Supervisora de Gestão Tecnológica
Assessoria de Inovação Tecnológica

ANEXO _ INVENTOR 2/4:

1. Nome: Maria Cristina Mattar da Silva
2. Qualificação: Bióloga
3. CPF: 025884468-09
4. Endereço: AOS 2 Bloco A, Ap 403, Octogonal, Brasília/DF
5. CEP: 70660-021
6. Telefone: 61-33615883
7. Email: cristina@cenargen.embrapa.br

ANEXO _ INVENTOR 3/4:

1. Nome: Rafael Perseguini Del Sarto
2. Qualificação: Biólogo
3. CPF: 930.988.471-15
4. Endereço: Q. E19, Casa 29, Brazlândia-DF
5. CEP: 70000-000
6. Telefone: 61-3391-1515
7. Email: rafaelpds83@gmail.com

ANEXO _ INVENTOR 4/4:

1. Nome: Thales Lima Rocha
2. Qualificação: Biólogo
3. CPF: 103.240.458-24
4. Endereço: Pq Estação Biológica W5 Final norte, Asa Norte, Brasília-DF
5. CEP: 70770-917
6. Telefone: 61-24484705
7. Email: thales@cenargen.embrapa.br

Brasília, 29 de abril de 2011.



Luciana Harumi Morimoto-Figueiredo

Luciana Harumi Morimoto-Figueiredo
Supervisora de Gestão Tecnológica
Assessoria de Inovação Tecnológica

Biological activity of pea defensin Drr230a towards Phytopathogenic Fungi

Rafael Perseghini Del Sarto^{1,2*}, Ariane Ferreira Lacerda^{1*}, Thiago de Jesus Costa¹; Marília Santos Silva³; Cláudia Vieira Godoy⁴; Thales Lima Rocha¹; Maria Fátima Grossi de Sá^{1§}.

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica W5 Norte, Brasília, DF, Brazil

²Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, L2 Norte, Brasília, Brazil

³Embrapa Cerrados, BR-020 Km 18, Planaltina, DF, Brazil

⁴Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass- Distrito de Warta

*These authors contributed equally to this work

§Corresponding author

Email addresses:

MFGS: fatimasa@cenargen.embrapa.br

Abstract

Background

Plant defensins are basic, small (45-54 amino acids, ≈ 5 kDa), cysteine-rich-peptide folded in cysteine stabilized $\alpha\beta$ motif ($Cs\alpha\beta$). These proteins have a broad range of biological activity including antifungal and antimicrobial activity. Many plant defensins were produced in heterologous system contributing to high yield necessary to biological activity characterization. Example as the *PsD1* from pea seeds, *AX2* from sugar beet, *PpDfn1* from peach (*Prunus persica*) and *SPE10* from *Pachyrrhizus erosus* seeds produced in *Pichia pastoris*. Thus, the pea defensin Drr230a was expressed in *P. pastoris* and its biological activity assayed against phytopathogenic fungi from cotton and soybean.

Results

To evaluate the biological activity of Drr230, the gene was subcloned into pPICZ α A® (Invitrogen Co.) and expressed in yeast *P. pastoris*. The recombinant protein (rDrr230a) was purified using Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) in Ni-Sepharose. The purified rDrr230a was active against hyphal and spores fungal that infect cotton and soybean. Yet our preliminary results show its antimicrobial activity.

Conclusions

Our data show expression of rDrr230a in *P. pastoris*, purification in IMAC and evaluation of its antifungal activity. These results, reveal the potentiality of rDrr230a to be used in plant genetic engineering in a breeding program to control fungi that infect cotton and soybean.

Background

Many factors involve losses of crop production in the world. These are related to biotic and abiotic events. Among these are challenges by enormous gamma of pest and pathogens feeding and development in plants (1). To circumvent these attacks defense factors are

produced as carbohydrate, polyanions, and several defense-related proteins such as chitinases, β -1,3-glucanases, lectins, α - and β -thionins, inhibitors of digestive enzymes, and defensins (2).

Plant defensins, as well as from invertebrates and vertebrate animals, are basic, small (45-54 amino acids, \approx 5 kDa), cysteine-rich-peptide with characteristic fold adopted comprising antiparallel β sheet and one α -helix maintained by disulfide bridges into one compact structure. This motif is called cysteine stabilized $\alpha\beta$ motif (Cs $\alpha\beta$) (3,4,5). This tertiary structure is encountered too in scorpion toxin, insect and mammalian β -defensin (6,7). These proteins have a broad range of biological activity. It can be involved on inhibition of digestive enzymes, as α -amylases (2) and protease (8), antimicrobial activity (9,10,11), inhibition of protein synthesis (12,13), blocking ionic channel (14) and affecting of cell cycle by DNA binding (15).

Many transgenic plants are protected by expression of antimicrobial peptides, including plant defensins (16,17). Protective effect to *Fusarium oxysporum* f.sp. *matthiolae* was showed by constitutive expression of Thi2.7 in *Arabidopsis thaliana*. Yet, tomato plants were resistant when the Thi2.7 was expressed no more being susceptible to *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* and *Ralstonia solanacearum* bacteria (18). In this accordance, other plant defensins were introduced in plants causing pathogen resistance (19,20). One study showed that DRR230a was responsible to resistance in *Brassica napus* against *Leptosphaeria maculans* (21), *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum* (22). Therefore, was showed that extract from tobacco plants expressing the same was defensin was able to inhibit the growth of important phytopathogenic fungi (23).

Antifungal activity of plant defensins produced in heterologous system is recurrent in the literature. It contribute to high yield necessary to characterization of biological activity of many protein obtained in low quantities from natural sources. Example as the PsD1 from pea seeds produced in *Pichia pastoris* with the same antifungal activity of purified protein (24). Yet, AX2 from sugar beet (25), PpDfn1 from peach (*Prunus persica*) (26) and SPE10 from *Pachyrrhizus erosus* seeds (27) were too produced in yeast *P. pastoris* being active against fungi.

In present study the plant defensin from pea DRR230a was produced in *Pichia pastoris* and tested against phytopathogenic fungi as soybean rust and root-knot nematode *Meloidogyne incognita*.

Results

Subcloning of DRR230a to expression in *Pichia pastoris* and Transformation of *Pichia pastoris* cells

To evaluation of biological activity of the DRR230a, the gene was introduced into pPICZ α A plasmid, under control of pAOX1 promoter inducible with methanol. The gene insertion in open reading frame of α -mating factor signal peptide was confirmed by automated sequence of nucleotide (Data not show). Yet, was inserted one polyhistine tag (6x His) in the 3' end of the gene that help purification of recombinant protein (Figure 1a). Colonies of *P. pastoris* strain X-33 transformed with expression plasmid were assayed in plates with increased concentration of zeocin selecting several clones with high resistance (Figure 2b, c). The clones selected were assayed in pilot expression to choice these that overexpress the recombinant protein.

Expression of DRR230a in *Pichia pastoris* and Purification by Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)

Initially, clones zeocin high resistance were grow in pilot scale and induced by methanol addition in final concentration of 1%. After analyses of expression, one was choice to carried out the expression in large volume and the results of expression is showed in figure

2a,b. The clone selected to large-scale expression was grown in BMG medium at OD₆₀₀ of 20. Then, the cells collected were induced in BMM medium with 1% of methanol. After 48 hours of expression, the expression medium was renewed to maintain normal growth of yeast. Aliquots were collected at each hour of expression. Since 24 hours of induction the rDrr230a was produced keeping at 96 hours. Samples of rDrr230a were separated on TRICINE-SDS-PAGE (Figure 2a) and western blot using 6xHis tag as epitope showing the band of \approx 6 kDa (Figure 2b).

The crude extract of rDrr230a was submitted to purification using IMAC. The flow through, washed and eluted fractions were analysed by monitoring of OD_{280nm} (data not show), TRICINE-SDS-PAGE and western blot showing the correspondent band of rDrr230a (Figure 3a and 3b). Quantification of rDrr230a was done by 2D-Quant method (Amersham) and productivity of recombinant protein after purification was \approx 5 mg per liter.

Antifungal Bioassay

The antifungal bioassay of rDrr230a was carried out in two ways to analyse the potential of protein in inhibition of hyphal growth and spore germination. The microplate assay of hyphal germination was conducted against two important phytopathogenic fungi, *Fusarium solani* sp. glycine and *Colletotricum gossypii* var. cephalosporioides that attack soybean and cotton plants, respectively. After assay using concentration of 0,2 at 60 ng/ μ l of rDrr230a in BDA broth, was determined different susceptibility of *F. solani* sp glycine and *C. gossypii* var.cephalosporioides to recombinant protein, in similar concentration (\approx 35 ng/ μ l) the hyphal growth of first fungi was 58% and in the second fungi the growth was abolished (Figure 4 a and 4b). The IC₅₀ determined were \approx 50 ng/ μ l and \approx 5,5 ng/ μ l, respectively.

In inhibition spore germination, the same fungi were tested including soybean rust *Phakopsora pachyrhizi*. In chase of *F. solani* sp glycine (Figure 5a, 5b and 5e) and *C. gossypii* var. cephalosporioides (Figure 5a, 5c and 5f) 25 ng/ μ l was able to inhibit totally germination of spores, however, the same effect against soybean rust only was reached using 10 μ g/ μ l (Figure 5a, 5d and 5g). Together, these results show the potential of rDrr230a in the control of phytopathogenic fungi. Yet, the recombinant protein was active against other soybean fungi *Macrophomina phaseolamina* (data not show).

Discussion

The aim of this work was express the Drr230a in yeast *Pichia pastoris* and evaluate its biological activity against phytopathogenic fungi from cotton and soybean. The *P. pastoris* system was able to product the rDrr230a from pea (figure 2) of active manner as showed by biological assay in vitro against *Fusarium solani* sp glycine, *Colletotricum gossypii* var. cephalosporioides and *Phakopsora pachyrhizi* (figure 3 and 4). This system was used to product other plant defensins as corn defensin (PDC1) (28), dimeric plant defensin (SPE10) (27), seed pea defensin (PsD1) (24), sugar beet defensin (AX2) (25), and others. Both were bioactive against its susceptible microorganisms as fungi, bacteria or others targets. The analysis of biological activity of rDrr230a was assayed by inhibition of hyphal growth and spore germination showing detrimental effect compared with controls. The antifungal effect of Drr230a was firstly reported by extract leafs from transgenic tobacco plants where was active against *F. solani* with any variation in bioassay (Lai *et al.*, 2002). Here, was show the effectiveness of rDrr230a against *F. solani* sp. glycine was \approx 50 ng/ μ l of IC₅₀ determined in a similar assay and 25 ng/ μ l inhibit completely its spore germination. Still, the rDrr230a was able too control growth of important fungi from cotton (*C. gossypii* var cephalosporioides) and soybean (*Phakopsora pachyrhizi*- soybean rust). Additionally, antibacterial assays show antimicrobial activity of rDrr230a against Gram-negative and Gram-positive bacteria in low-

concentration (Unpublished data). Interestingly, the activity of rDrr230a was maintained with four amino acid residues in N-terminal, EAEF, and His-tag in C-terminal. Kant (2009) showed the minor effect of his-tag in activity of corn defensin (PDC1). However, the activity of Psd1 from pea against *Aspergillus niger* was abolished presence of four residues (EAEA) at N-terminal (24). Apparently, its not occur with rDrr230a. Together, these results show the bifunctionality of rDrr230a as antifungal and antimicrobial peptide and the potential of protein as biotechnological tool as well as in plant engineering and bacteria control program. The evidence to explain it is the transcriptional induction of *Drr230a* gene in mature foliar tissues and young pods by bacterial and fungal phytopathogens (23) Experiments to elucidate the structure of recombinant protein will be necessary to explain this characteristic.

Conclusions

In this report was showed the expression and purification of pea defensin (Drr230a) in *P. pastoris*. Naturally, this protein is can not obtained in high concentration to evaluation of biological activity, thus recombinant expression enables production necessary to characterization. The protein recombinant produced was effective against fungi phytopathogenics from cotton and soybean, yet preliminary dates show the bifunctionality of rDrr23a inhibiting both fungi and bacteria.

Methods

Subcloning of DRR230a to expression in *Pichia pastoris*

Plasmidial DNA with Drr230a gene (genbank accession AF525685) was used as template for PCR using primers DRR230a01For (5'gccgaattcaacacatgtgagaac3') DRR230a02Rev (5'tgggcgccgctcaatgatgatgatgatggcagtttttagtacaccaacagcgaaagtcac 3') to insertion of enzyme restriction sites *EcoRI* and *NotI* in 5' and 3' regions, respectively. Yet, in 3' region was added one sequence to coding six histidines (6xHIS) to aim the purification of recombinant protein on immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The PCR was performed for 30 cycles, as follow: 94 °C, 30 s, 58 °C, 30 s, 72 °C, 30s. The amplified fragment was separated and purified by agarose gel and subcloned into the pGEM-T easy[®] and replicated in *Escherichia coli*, X11-Blue strain. Then, the gene was subcloned into *EcoRI* and *NotI* sites of the expression vector pPICZ α A[®] (Invitrogen Co.) in frame to the α -factor secretion signal, at downstream of the alcohol oxidase I promoter. Thereafter, the construction was sequenced using automated ABI sequencer (Perkim-Elmer).

Transformation of *Pichia pastoris* cells

After the subcloning, the constructed expression plasmid, pPICZ α A-Drr230a, was used to transformer *Pichia pastoris* competent cells, strain X-33, using 20 μ g of *SacI* linearized DNA by electroporation (in accordance to manufacturer). Clones were selected on YPD plates containing zeocin (100 μ g/ml) and PCR analyses. Then, clones were growth in plates with improved zeocin concentration (500 μ g/ml) to select those with two insertion in yeast genome (29). These clones were used in expression experiments.

Expression of DRR230a in *Pichia pastoris* and Purification by Immobilized metal affinity chromatografy (IMAC)

One clone was inoculated in 2 ml of YPD broth (1% yeast extract; 2% dextrose; 2% peptone) and growed over night, at 28 °C, 200 rpm. After, was diluted in 200 ml of BMG

(1,34 % de YNB, 1% de glycerol, 4×10^{-5} % Biotin, 100mM potassium fosfate buffer, pH 6,0) and incubated at 24 hours to reach OD_{600nm} 20. Thus, the culture was centrifuged at 1500 g, per 5 min, the cell were diluted in the same volume of BMM broth (1,34 % de YNB, 1% methanol, 4×10^{-5} % Biotin, 100mM potassium fosfate buffer, pH 6,0) and incubated per 48 hours at 28 °C, 200 rpm. The crude culture was centrifuged and the supernatant was analyzed in SDS-Tricine-PAGE (30).

The recombinant peptide was diluted in binding buffer (100 mM sodium fosfate buffer, pH 7.2; 500 mM NaCl) and applied to His Trap FF (GE helthcare) column (1.6x 2.5 cm, 5 ml) preequilibrated with binding buffer. The column was washed with binding buffer with imidazole at low concentration (20 mM). Finally, the samples were eluted at 1 ml/min with binding buffer added with imidazole (500 mM). The fractions were analyzed in SDS-Tricine-PAGE 14%. The fraction containing the recombinant protein was dialyzed, dried and dissolved in water milli-Q. Yet, protein preparation was submitted to sequencing by Edman's degradation.

Antifungal Bioassay

The antifungal bioassay of rDRR23a against *Fusarium solani* sp glycine isolated from Soybean, *Colletotricum gossypii* var. cephalosporioides isolated from cotton plants, *Macrophomina phaseolina* and *Phakpsora pakhirizi* (soybean rust) was done.

Antifungal assays were done in two ways. First, microplate assay for measuring hyphal growth and inhibition of spore germination assay were done (I) (31). In microplate assay, 10 μ l of $\approx 10^4$ spore solutions was added to 80 μ l of PDB and rDrr230a solution was added in different concentration to a final volume of 100 μ l in wells of a 96-well sterile microtitre plate. Water and hydrogen peroxide were use as negative and positive control to fungal growth. The plate was incubated at 28 oC in the dark for 48 hours and optical density was measured by microtiter reader (BIORAD) at 600 nm. Second, in inhibition of spore germination (II), 5 μ l of spore solution containing $\approx 10^4$ spores was added to 15 μ l of rDrr230a solution in different concentrations and incubated at 28 oC for 12 hours. Water and hydrogen peroxide were use as negative and positive control to fungal spore germination. Spore germination was analyzed by account in Newbouer chamber and photographed in Optical Microscopy. All assays were done in triplicate.

Authors' contributions

Please see sample text in the instructions for authors.

Acknowledgements

We thank Dr. Richard Forbet (National Research Council Canada, Plant Biotechnology Institute) for providing *DRR230A* gene used in this work and Dr. to provide fungi used in bioassays. This work was supported by CNPQ, CAPES and Embrapa Genetics Resources.

References

1. Carlini CR and Grossi-de-Sa MF. **Plant toxic proteins with insecticidal properties: A review on their potentialities as bioinsecticides.** *Toxicon* 2002, **40**: 1515-1539.
2. Pelegrini PB, Farias LR, Saude ACM, Bloch Jr C, Silva LP, Oliveira AS, Gomes CEM, Sales MP, Franco OL. **A Novel Antimicrobial Peptide from *Crotalaria pallida* Seeds With Activity Against Human And Phytopathogens.** *Current Microbiology* 2009, **59**:400-404.
3. **Carvalho AO and Gomes VM.** Plant defensins- Prospects for the biological functions and biotechnological properties. **Peptides** 2009, 30:**1007–1020**.
4. Thomma BPHJ, Cammue BPA, Thevissen K. **Plant defensins.** *Planta* 2002, **216**:193–202.
5. Broekaert WF, Cammue BPA, De Bolle MFC, Thevissen K, De Samblanx GW, Osborn RW. **Antimicrobial peptides from plants.** *Crit Rev Plant Sci* 1997,**16**:297–323.
6. Aerts AM, François IEJA, Cammue BPA and Thevissen K. **The mode of antifungal action of plant, insect and human Defensins.** *Cell. Mol. Life Sci.* 2008, **65**:2069 – 2079.
7. thevissen 2008.
8. Melo FR, Rigden DJ, Franco OL, Mello LV, Ary MB, Grossi-de-Sa, MF, Bloch C, Jr. **Inhibition of trypsin by cowpea thionin: characterization, molecular modeling and docking.** *Proteins* 2002, **48**:311–319.

9. Zélicourt A, Letousey P, Thoiron S, Campion C, Simoneau P, Elmorjani K, et al. **Ha-DEF1, a sun flower defensin, induces cell death in Orobanche parasitic plants.** *Planta* 2007, **226**:591–600.
10. Wong JH, Ng TB. **Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase.** *Peptides* 2005, **26**:1120–6.
11. Ye XY, Ng TB. **Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-kda protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **285**:424–9.
12. Mendez E, Rocher A, Calero M, Girbes T, Citores L, Soriano F. **Primary structure of ω -hordothionin, a member of a novel family of thionins from barley endosperm, and its inhibition of protein synthesis in eukaryotic and prokaryotic cell-free systems.** *Eur J Biochem* 1996, **239**:67–73.
13. Mendez E, Moreno A, Colilla F, Pelaez F, Limas GG, Mendez R, et al. **Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, g-hordothionin, from barley endosperm.** *Eur J Biochem* 1990, **194**:533–9.
14. Spelbrink RG, Dilmac N, Allen A, Smith TJ, Shah DM, Hockerman GH. **Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins.** *Plant Physiol* 2004, **135**:2055–67.
15. Lobo DS, Pereira IB, et al. **"Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle."** *Biochemistry* 2007 **46**(4): 987-96.

16. Anuradha TS, Divya K, *et al.* **Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens.** *Plant Cell Reports* 2008, **27**(11):1777-1786.
17. Kovalskaya N and Hammond RW. **Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snakin-1 and defensin recombinant proteins.** *Protein Expression and Purification* 2009, **63**(1): 12-17.
18. Chan YL, Prasad V, *et al.* **Transgenic tomato plants expressing an Arabidopsis thionin (Thi2.1) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack.** *Planta* 2005,**221**(3): 386-93.
19. Zhu YJ, Agbayani R, *et al.* **Ectopic expression of *Dahlia merckii* defensin DmAMP1 improves papaya resistance to *Phytophthora palmivora* by reducing pathogen vigor.** *Planta* 2007, **226**(1): 87-97.
20. Gao AG, Hakimi SM, *et al.* **Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide.** *Nature Biotechnology* 2000, **18**(12): 1307-1310.
21. Wang Y, Nowak G, *et al.* **Constitutive Expression of Pea Defense Gene DRR206 Confers Resistance to Blackleg (*Leptosphaeria maculans*) Disease in Transgenic Canola (*Brassica napus*).** *Mol Plant Microbe Interact* 1999, **12**: 410-418.
22. Wang YP and Fristensky B. **Transgenic canola lines expressing pea defense gene DRR206 have resistance to aggressive blackleg isolates and to *Rhizoctonia solani*.** *Molecular Breeding* 2001, **8**(3): 263-271.
23. Lai FM, DeLong C, *et al.* **Analysis of the DRR230 family of pea defensins: gene expression pattern and evidence of broad host-range antifungal activity.** *Plant Science* 2002, **163**(4):855-864.
24. Cabral KMS, Almeida MS, Valente AP, Almeida FCL, Kurtenbach E. **Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd1) in *Pichia pastoris*:**

- overcoming the inefficiency of the STE13 protease.** Protein Expression and Purification 2003, USA, **31:(1)**115-122.
25. Kristensen AK, Brunstedt J, *et al.* **Processing, disulfide pattern, and biological activity of a sugar beet defensin, AX2, expressed in Pichia pastoris.** Protein Expression and Purification 1999, **16(3)**: 377-387.
26. Wisniewski ME, Bassett CL, *et al.* **Characterization of a defensin in bark and fruit tissues of peach and antimicrobial activity of a recombinant defensin in the yeast, Pichia pastoris.** Physiologia Plantarum 2003, **119(4)**: 563-572.
27. Song XM, Wang J *et al.* **cDNA cloning, functional expression and antifungal activities of a dimeric plant defensin SPE10 from Pachyrrhizus erosus seeds.** Plant Molecular Biology 2005, **57(1)**: 13-20.
28. Kant P, Liu W, Peter PK. **PDC1, a corn defensin peptide expressed in Escherichia coli and Pichia pastoris inhibits growth of Fusarium graminearum.** Peptides 2009, **30**:1593–1599
29. Vassileva A, Chugh DA *et al.* **Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast Pichia pastoris.** Protein Expression and Purification 2001, **21(1)**: 71-80.
30. Schagger H and Von Jagow G. **Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.** Anal Biochem 1987, **166(2)**: 368-79.
31. Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Vanderleyden J. **An automated quantitative assay for fungal growth inhibition.** FEMS Microbiol Lett 1990, **69**:55–60.

Figures

Figure 1: a) Map of Plasmid to expression recombinant defensin in methylotrophic yeast. The defensin gene was cloned into pPICZaA vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). This have AOX1 promoter that allows the methanol-inducible expression of the recombinant protein in *P. pastoris*, its secretion using the mating a-factor signal peptide from *Saccharomyces cerevisiae* and confer zeocin resistance. **b and c) Analysis of yeasts zeocin resistant.** In the plates, several clones were cultured after transformation with plasmid expression that confer resistance to zeocin antibiotic. The concentration used in the plates of YPD was 500 µg/ml.

Figure 2: SDS-TRICINE-PAGE (a) and Western Blot (b) of expression of rDrr230a in *Pichia pastoris*. The production of rDrr230a occur at 24 hours after induction continuously at 96 hours. See blue protein ladder (Lane 1). *P. pastoris*- X-33 cells expression rDrr230a 24 h (Lane 2), 48 h (Lane 3), 72 h (Lane 4) and 96 h (Lane 5) after induction. *P. pastoris*- X-33 cells untransformed 24 h (Lane 6), 48 h (Lane 7), 72 h (Lane 8) and 96 h (Lane 9) after induction. In Western Blot (b) the rDrr230a was detected by monoclonal antibody Anti-His. The arrow indicate the correspondent band of rDrr230a.

Figure 3: SDS-TRICINE-PAGE (a) and Western Blot (b) of purification of rDrr230a expressed in *Pichia pastoris*. The rDrr230a was purified by Immobilized Affinity Chromathography (IMAC) in Ni-Sepharose. See Blue Protein Ladder (lane 1). Crude Extract (lane 2). rDrr230a purified (lanes 3). In Western Blot (b) the rDrr230a was detected by monoclonal antibody Anti-His. The arrow indicates the band of rDrr230a.

Figure 4: Effect of rDrr230a on hyphal development of *Fusarium solani* sp. glycine (a) and *Colletotricum gossypii* var. cephalosporioides (b). The spores of fungus were incubated in presence and absence of rDrr230a in different concentrations. The data are mean ± SD ($n=3$).

Figure 5: Inhibition of spore germination of phytopathogenic fungi. Effect of rDrr230a on spore germination of *Fusarium solani* sp. glycine (a, b, e), *Colletotricum gossypii* var. cephalosporioides (a, c, f) and *Phakopsora pachyrhizi* (a, d, g). Spores of fungus were incubated in presence and absence of rDrr230a in different concentrations. The data in (a) are mean ± SD ($n=3$).

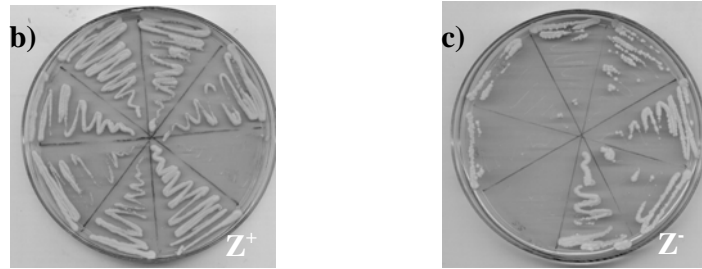
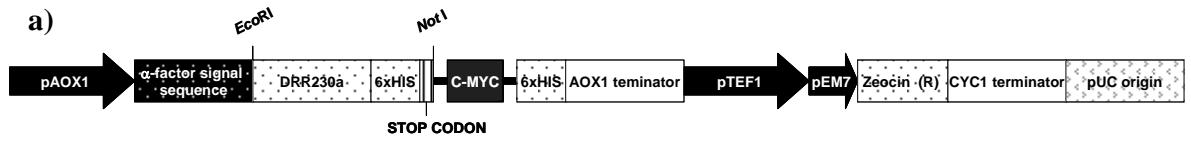


Figure 1

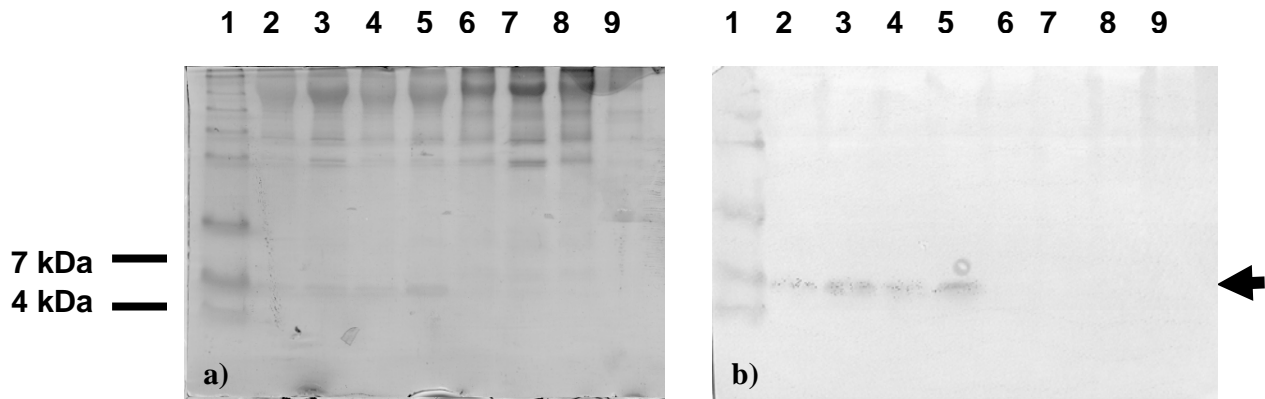


Figure 2

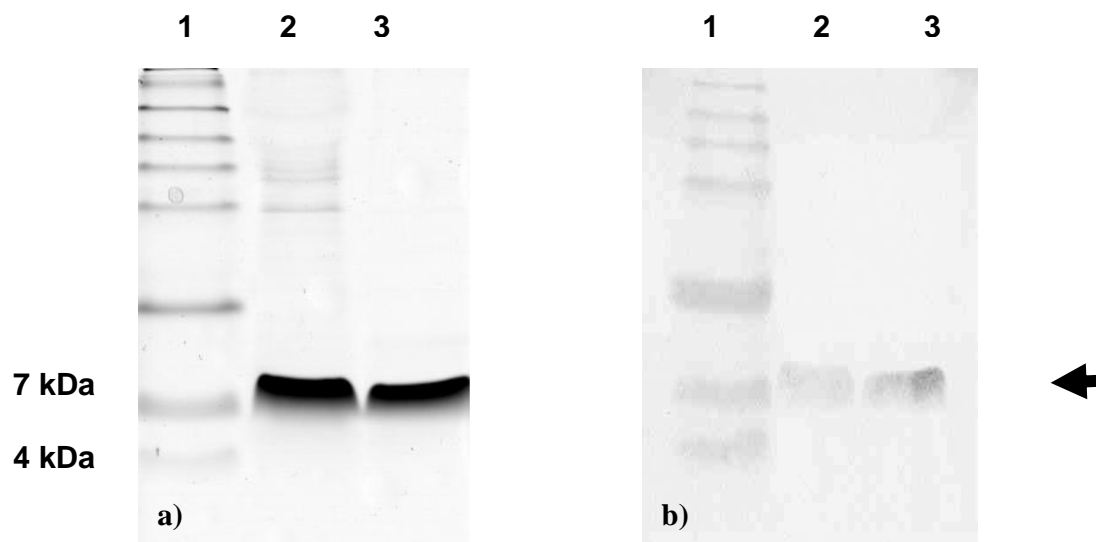


Figure 3

Fusarium solani sp. glycine

Colletotricum gossypii var cephalosporioides

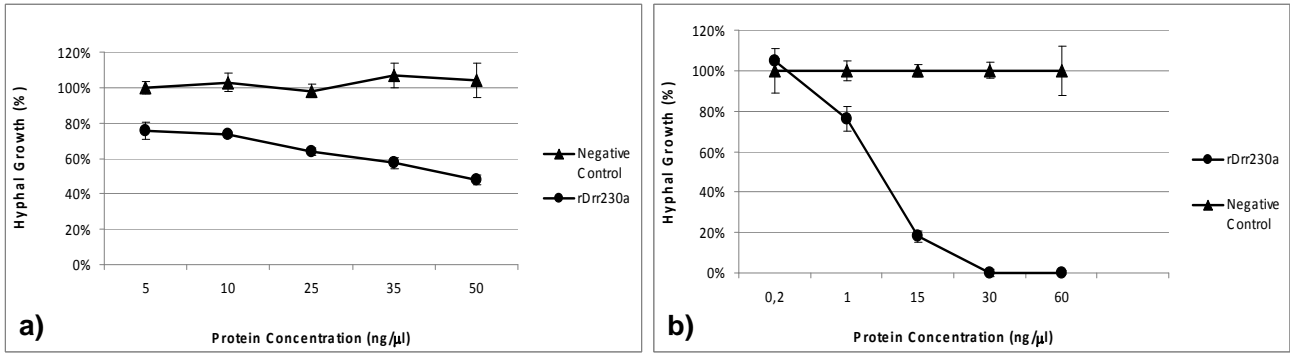


Figure 4

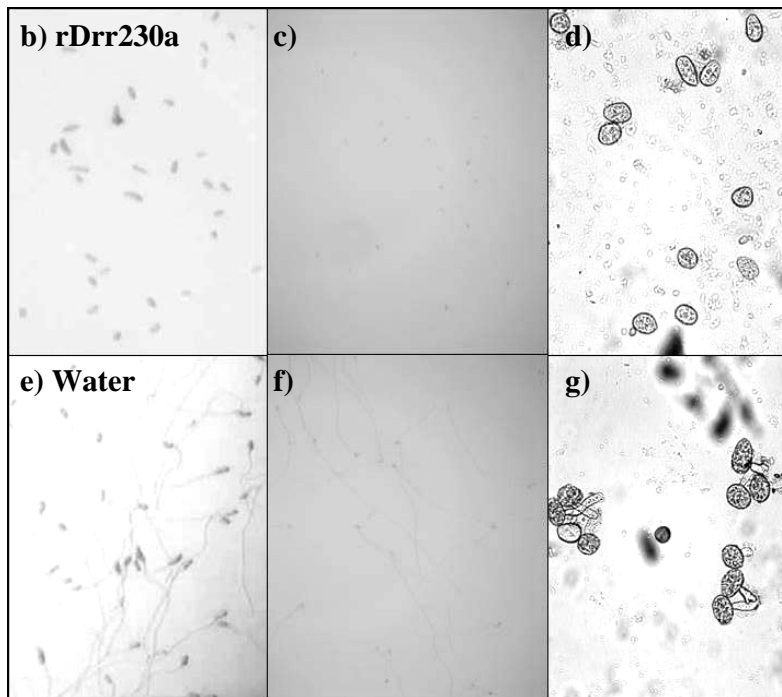
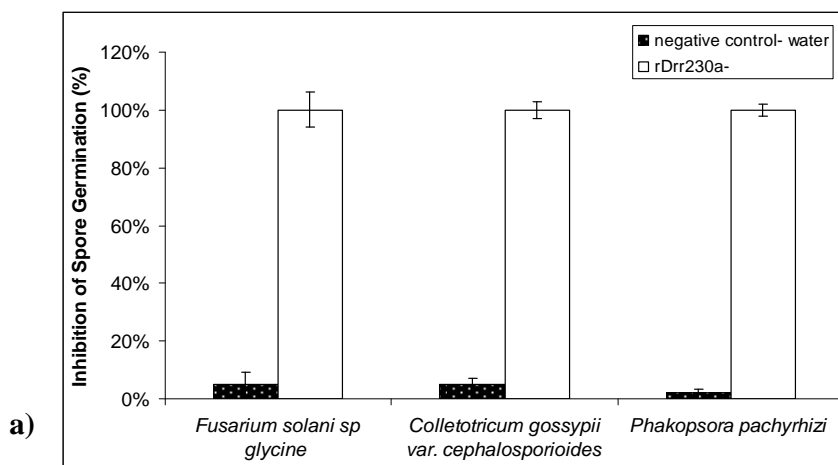


Figure 5

ANEXO III

1. BARBOSA PELEGRINI, PATRÍCIA; **DEL SARTO, RAFAEL PERSEGHINI**; SILVA, OSMAR NASCIMENTO; FRANCO, OCTÁVIO LUIZ; Grossi-de-Sa, M.F. . Antibacterial Peptides from Plants: What They Are and How They Probably Work. *Biochemistry Research International* ^{JCR}, v. 2011, p. 1-9, 2011.
2. MARRA, B. M.; SOUZA, DJAIR S.L.; AGUIAR, JOÃO N.; FIRMINO, ALEXANDRE A.P.; **SARTO, RAFAEL P.D.**; SILVA, FRANCINE B.; ALMEIDA, CHARLES D.S.; CARES, JUVENIL E.; CONTINHO, MARISE V.; MARTINS-DE-SA, CEZAR; FRANCO, O. L.; Grossi-de-Sa, M.F. Protective effects of a cysteine proteinase propeptide expressed in transgenic soybean roots. *Peptides (New York)* ^{JCR}, v. 30, p. 825-831, 2009.
3. CAMPOS, M. A.; SILVA, M. S.; MAGALHÃES, C. P.; RIBEIRO, S. G.; **SARTO, R. P. DEL**; VIEIRA, E. A.; Grossi-de-Sa, M.F. Expression in Escherichia coli, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from Solanum nigrum. *Microbial Cell Factories* ^{JCR}, v. 7, p. 7, 2008.
4. MONTEIRO, A C S; OLIVEIRA NETO, O B; **DEL-SARTO, R. P.**; MAGALHÃES, M T Q; LIMA, J. N.; LACERDA, A. F.; OLIVEIRA, R. S.; SCHARFSTEIN, J.; SILVA, M C M.; VALENCIA, J. W. A.; VALENCIA-JIMENEZ, A.; Grossi-de-Sa, M.F. A recombinant form of chagasin from Trypanosoma cruzi: inhibitory activity on insect cysteine proteinases.. *Pest Management Science* ^{JCR}, v. 64, p. 755-760, 2008.
5. SILVA, F. B.; MONTEIRO, A C S; **DEL-SARTO, R. P.**; MARRA, B. M.; FIGUEIRA, E. L. Z.; FRANCO, O. L.; OLIVEIRA, G. G.; ROCHA, T L; SILVA, M. C. M.; Grossi-de-Sa, M.F. Proregion of Acanthoscelides obtectus cysteine proteinase: a novel peptide with enhanced selectivity toward endogenous enzymes. *Peptides (New York)* ^{JCR}, v. 28, p. 1292-1298, 2007.