

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Evolução *in vitro* e seleção de variantes Cry para o controle da
broca-gigante da cana-de-açúcar**

Kilvia Inês Chaves Craveiro

Brasília – DF

2009

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Evolução *in vitro* e seleção de variantes Cry para o controle da
broca-gigante da cana-de-açúcar**

Kilvia Inês Chaves Craveiro

Orientação: Dr^a. Maria Fátima Grossi de Sá

Co-orientação: Dr^a. Maria Cristina Mattar da Silva

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Molecular do
Departamento de Biologia
Celular da Universidade de
Brasília como requisito para
obtenção do grau de doutor
em Biologia Molecular.

Brasília – DF

2009

**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**

Evolução *in vitro* e seleção de variantes Cry para o controle da broca-gigante da cana-de-açúcar

Kilvia Inês Chaves Craveiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de doutor em Biologia Molecular.

Aprovado pela Banca Examinadora:

Dr^a. Marília Santos Silva – Embrapa Cerrados

Dr. Octávio Luiz Franco – Universidade Católica de Brasília

Dr. Osmundo Brilhante Oliveira Neto – Unieuro

Dr. Renato de Azevedo Moreira – Universidade Federal do Ceará

Dr. Rodrigo da Rocha Fragoso – Embrapa Cerrados

Dr^a. Maria Cristina Mattar da Silva – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr^a. Maria Fátima Grossi de Sá – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Brasília, 09 de dezembro de 2009

A Deus, consagro
Aos meus pais, Renato Craveiro e Elaine Chaves de Souza,
Aos meus irmãos, Ricardo Kildare e George Kilmer,
À minha cunhada, Karina Loureiro,
A todos os meus familiares, dedico

Agradecimentos

As relações humanas são simplesmente inestimáveis e imprescindíveis no transcurso do existir. As pessoas dominam o fluxo do conhecimento, dos valores, dos sentimentos e das atitudes, no que implica sua constante transformação e evolução, frente aos desafios. Os lugares são dotados de beleza, a natureza de energia, mas as pessoas... As pessoas cristalizam a beleza, a energia e o dinamismo consciente, que aliados a supremacia do Divino, atribuem significado aos momentos e ao aprendizado. E, por isto, eu sou uma eterna admiradora e aprendiz das pessoas. A todas elas, sempre, muito obrigada. São tantas as pessoas que me enchem de alegria e, a cada instante colore o meu caminho, que precisarei fragmentar este momento para contemplar os últimos anos.

Família...

Aos meus pais, que com amor, carinho, compreensão e amizade sempre me deram força e incentivo para buscar meus ideais. São exemplos de vida que nortearam o meu ser e formaram a minha pessoa. Vocês, que ensinaram a mim e meus irmãos, Ricardo e George, a construir uma célula familiar indivisível, alicerçada em nobres valores intangíveis.

Aos meus tios de Fortaleza, Cleomilde e Ernane, Laíse e Hélio, Edna e Gerardo, pela presença constante em minha vida, pelas divertidas horas em família, pela torcida e carinho.

Aos meus tios e primos de Brasília, Eneida e Rubens, Kátia e Mona, Zileni, Fábio e Verônica pela acolhida, amparo, carinho, atenção e pelos aniversários!

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen...

À Dra. Maria Fátima Grossi de Sá. Seu exemplo e visão são realmente enriquecedores. A oportunidade que disponibiliza, o pragmatismo que ensina, o permanente otimismo, o fascínio pela ciência e pelo trabalho, a determinação, força e firmeza, a abrangência do conhecimento científico, são algumas das características com as quais pude conviver durante este tempo. Suas sugestões e experiência foram sempre valiosas. Agradeço ainda a tolerância, o incentivo e carinho dispensados a mim durante este trabalho.

À Dra. Maria Cristina Mattar, pela constante presença e total disponibilidade. Sua orientação e sugestões sempre indispensáveis, o conhecimento científico, a presteza nas correções. Por acreditar em mim e continuamente me estimular, seja na tese, seja no trabalho. A paciência no ensino, a educação e gentileza em qualquer momento, o compromisso com todos no lab, e pelo carinho e atenção que me foram tão preciosos, muito obrigada.

Ao meu querido amigo Edilson. As palavras para você nunca serão suficientes. A parceria, atenção, carinho, apoio, compromisso, altruísmo, bom-humor, confiança, determinação, perseverança são qualidades que se destacam. Sua presença ao meu lado até o fim é algo que jamais esquecerei. A nossa convivência me deixará saudades. Como digo sempre, as atitudes mostram realmente o ser humano. E saiba, te admiro muito. Pelo tudo e pelo sempre, minha gratidão sincera, estou às ordens no que precisar e quando não precisar também.

À minha amada amiga Marília. Existem algumas pessoas que se passarmos uma vida inteira sem conhecer, ficará faltando algo no final. Você, inquestionavelmente, faz parte deste grupo. Desfrutar da sua amizade, carinho e força, do seu vasto conhecimento científico, das suas experiências, sabedoria, solidariedade e habilidades foram um deleite para mim. Saber que a Teca tem uma mãe com coração tão grande e abençoada por Deus me deixa muito feliz. Muito obrigada amiga.

Ao querido amigo Osmy, pela confiança depositada em mim em nosso primeiro encontro no lab, a disponibilidade na acolhida, o bom-humor e alegria natos, os papos diversos, as dicas de leitura, o carinho e experiência compartilhada. Seu apoio, estímulo, generosidade foram muito importantes para mim. Constatar, mais uma vez, a certeza das amizades verdadeiras que se sustentam independente do tempo e da distância é enaltecedor.

Ao querido amigo Claudinho Picanço. O seu convite ano após ano, nossos papos à distância, o incentivo e confiança, a amizade e carinho me guiaram até aqui. Os nossos encontros e diálogos no pátio da Bioq (Pici), no lab em Sampa e aqui em Bsb sempre ficarão na lembrança.

Aos amigos e colegas do lab que estiveram comigo durante esta jornada e a tornaram divertida e produtiva: Thales, Edson, Liziane, Railene, Mariana, Fernanda, Rodrigo, Isabela, Simoni, Antônio, Paula, Gustavo, Hudson, Rafinha, Maíra, Luciane, Sineide, Janaína, Fabíola, Charles, Cleiton, Heli, Brenner, Patrícia, Djair, Érico, Aulus, Paulo Henrique, Priscila, Poliene, Léo, Carol, Dijair, Roberta, Fernando, Vanessa, Erich, Firmino, Fábio, Wagner, Herbert, César, Norma e Marise.

À Lecir, pelo apoio e palavras doces, simpatia e colaboração que torna tudo no lab mais fácil.

Ao estimado Wagner Lucena, pelas análises com modelagem. Seu esforço, dicas e sugestões enriqueceram o meu trabalho.

Universidade de Brasília – UnB...

Aos coordenador da Pós-Graduação, Prof. Renato Resende, pelo apoio, incentivo e orientação sempre que necessária.

A todos os professores do Departamento de Biologia Celular pelas disciplinas, sugestões e discussões científicas. Em especial, a Profa. Andréa Maranhão, pela sua atenção, sua experiência com fagos, bem como por suas criteriosas sugestões, sempre que lhe recorri. Sou grata ainda pelo material cedido no momento em que solicitado. Sua disposição em ensinar e entusiasmo com o trabalho são modelos que ficam.

A Ana Hilda (secretaria da Pós-Grad) pela torcida, ajuda, carinho e apoio durante todos estes anos.

Embrapa Transferência de Tecnologia...

Ao Dr. José Roberto Rodrigues Peres. A gratuidade nas ações é algo que sempre me emociona. Não tenho como lhe agradecer a total confiança, incentivo, generosidade, atenção e carinho direcionados a mim. A amizade que sempre me ofertou é outro presente. O seu entendimento tácito da situação, o desejo sincero de vitória e apoio incondicional me confortaram em várias situações, obrigadíssima. Como lhe digo sempre, ainda bem que a Embrapa pode contar com sua experiência, inteligência e discernimento.

Ao Dr. Ronaldo Pereira. Pelo interesse, apoio e confiança depositados no meu propósito.

Aos Drs. Amauri Buso, Luiz Carlos Balbino, Filipe Teixeira e Ana Lúcia Atrasas. Meu sincero reconhecimento pelo apoio de vocês, consideração, tolerância e estímulo em todos os momentos. Garanto que não esquecerei isto.

Aos meus queridos amigos Jairo Dolvim e Roberto Carvalho. Meus parceiros inseparáveis no SNT, que felicidade a minha em poder dispor destas companhias de trabalho! A experiência, conhecimento e exemplo de vocês traduzem porque os bons ventos me trouxeram aqui. Aliados a isto, o bom-humor, as brincadeiras e reflexões de todos os dias tornando todos os meus desafios uma simples questão de paciência, planejamento e dedicação.

Às amigas Amália, Rosângela e Lígia. Sabe, a compreensão e colaboração de vocês em todos estes momentos foram fundamentais para me dar a tranquilidade necessária em saber que tudo sempre seria resolvido com muito êxito. Valeu meninas.

No SNT, posso dizer que simplesmente tive o apoio e torcida de todos desde o início. Um lugar de trabalho que se parece com uma grande família. Encantador assim.

Aos amigos de longa data...

Keline, Belinha, Nana, Raquel. Amadas amigas, sem o apoio de vocês, teria sido bem complicado. A união, cumplicidade, diversão, apoio, torcida, bate-papos, fé, lealdade, reflexões, são apenas algumas características que qualificam o nosso relacionamento. Não precisamos de motivo, apenas de tempo. E quando o tempo não existe, simplesmente o inventamos.

Marcinha, Candinha, Aline, Fran, Dani, Tito, Antonino, John, Mylle, Kaká, Rê. Vocês são para sempre, basta dizer isto. Andrézinho, pelo motivo elementar de que temos uma história, de muitos encontros e poesias.

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram na execução deste trabalho.

A Deus.

Onipotente, onipresente e onisciente, por me explicar o sentido dos momentos e pela realização deste objetivo. Por providenciar meu encontro com todas estas pessoas ao longo da vida.

Caminhos do Coração

(Pessoa = Pessoas)

*Há muito tempo que eu saí de casa, há muito tempo que eu caí na estrada,
Há muito tempo que eu estou na vida, foi assim que eu quis e assim eu sou feliz,
Principalmente por poder voltar a todos os lugares onde já cheguei,
Pois lá deixei um prato de comida, um abraço amigo, um canto pra dormir e sonhar,
E aprendi que se depende sempre de tanta muita diferente gente,
Toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias de outras tantas pessoas,
E é tão bonito quando a gente entende que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá,
É tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho por mais que pense estar,
É tão bonito quando a gente pisa firme nessas linhas que estão nas palmas de nossas mãos,
É tão bonito quando a gente vai à vida nos caminhos onde bate bem mais forte o coração.*

Gonzaguinha

Índice

	Página
Índice de Figuras	xii
Índice de Tabelas	xiii
Abreviaturas	Xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
1. Introdução	
1.1 Cana-de-açúcar	1
1.2 <i>Telchin licus licus</i> (Lepidóptera: Castniidae) – Broca-gigante	5
1.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
1.3.1 <u>δ-endotoxinas</u>	9
1.3.2 <u>Estrutura das δ-endotoxinas</u>	10
1.3.3 <u>Modo de Ação</u>	14
1.3.4 <u>Aplicação de <i>Bacillus thuringiensis</i></u>	18
1.4 Evolução molecular dirigida <i>in vitro</i>	22
1.4.1 <u>DNA shuffling</u>	23
1.4.2 <u>Phage display</u>	25
1.4.2.1 <u>Estrutura do fago filamentoso</u>	26
1.4.2.2 <u>Ciclo de vida</u>	27
1.4.2.3 <u>Construção e varredura da biblioteca apresentada em fagos</u>	28
1.4.2.4 <u>Procedimento de seleção</u>	29
2. Justificativa	31
3. Objetivo Geral	32
3.1 Objetivos específicos	32
4. Materiais	33
4.1 Linhagens bacterianas	33
4.2 Fagomídio	33
4.3 Fago auxiliar	33

4.4	Larvas de Broca gigante	33
4.5	Oligonucleotídeos iniciadores	34
4.6	Meios de cultura	35
4.7	Soluções e tampões	36
4.8	Reagentes, enzimas e demais produtos	37
5.	Metodologia	38
5.1	Extração dos intestinos de larvas de broca-gigante	38
5.2	Extração das BBMV's (vesículas de membranas associadas à borda em escovadura da membrana do intestino)	38
5.3	Obtenção do gene <i>cry1la12synth</i>	39
5.4	Digestão do vetor pBluescript e isolamento do gene <i>cry1ia12synth</i>	39
5.5	DNA <i>shuffling</i>	39
5.5.1	Fragmentação do gene <i>cry1la12synth</i> com DNaseI	39
5.5.2	Recombinação dos fragmentos por PCR (Reação de cadeia da Polimerase)	40
5.6	Subclonagem do gene <i>cry1la12synth</i> e dos variantes de <i>cry1la12synth</i> no fagomídeo pComb 3X	41
5.7	Phage display	41
5.7.1	Transformação de células <i>E. coli</i> XL1-Blue, por eletroporação e construção da biblioteca combinatória	42
5.7.2	Preparação e cultivo dos fagos	43
5.7.3	Procedimento de seleção dos variantes do gene <i>cry1la12synth</i> (biopanning)	43
5.8	PCR de colônia	44
5.9	Expressão das variantes em sistema de fago	45
5.10	Análise da expressão das variantes do gene <i>cry1la12synth</i> utilizando imunodeteção (Dot blot)	45
5.11	Análise da expressão das variantes do gene <i>cry1la12synth</i> utilizando ensaio de imunodeteção por Elisa	46
5.12	Bioensaios	47
5.13	Seqüenciamento do DNA	47
5.14	Modelagem molecular	48

6.	Resultados	50
6.1	Extração das BBMV's	50
6.2	Aplicação e obtenção do gene <i>cry1la12synth</i>	50
6.3	Fragmentação do gene <i>cry1la12synth</i> e recombinação por DNA <i>Shuffling</i>	51
6.4	Construção da biblioteca de variantes do gene <i>cry1la12synth</i>	52
6.5	<i>Phage display</i>	53
6.6	PCR de colônia	54
6.7	Análise da expressão das variantes do gene <i>cry1la12synth</i> utilizando <i>Dot blot</i> e Elisa	55
6.8	Bioensaio	55
6.9	Sequenciamento do DNA	56
6.10	Modelagem molecular	57
7.	Discussão	60
8.	Conclusões	68
9.	Perspectivas	69
10.	Referências bibliográficas	70
11.	Anexo	83
11.1	Variant Cry1Ia toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer	

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Ciclo biológico do inseto <i>Telchin licus licus</i>	5
Figura 2. Estrutura terciária das proteínas Cry	11
Figura 3. Esquema da estrutura primária das proteínas Cry	13
Figura 4. Modelo de ação de formação do poro para toxinas Cry	17
Figura 5. Mecanismo de ação de transdução do sinal para toxinas Cry	18
Figura 6. Técnica de DNA <i>shuffling</i> utilizando um único gene como substrato	23
Figura 7. Representação esquemática do bacteriófago M13	27
Figura 8. Representação esquemática dos ciclos de seleção da técnica de <i>Phage display</i>	30
Figura 9. Digestão do vetor pBluescript com enzimas <i>NotI</i> e <i>Sall</i> .	50
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose, mostrando as etapas da técnica de <i>DNA shuffling</i> utilizada para obter a recombinação do gene <i>cry1la12synth</i> .	51
Figura 11. Análise do sistema de ligação entre fagomídeo e o gene recombinante em gel de eletroforese usando agarose.	52
Figura 12. Representação esquemática do cassete de expressão da construção do fagomídeo pComb3X- <i>cry1la12synth</i> , para expressão da proteína <i>Cry1la12synth</i> apresentada na superfície do fago filamentosso M13.	53
Figura 13. Representação gráfica da seleção indicando o resultado do monitoramento do número de colônias retiradas após cada round de seleção.	54
Figura 14. Análise em gel de agarose dos produtos do PCR de colônias variantes do gene <i>cry1la12synth</i> obtidos na seleção.	54
Figura 15. Dot Blot do produto da expressão das variantes <i>cry1la12synth</i> identificadas por PCR de colônias.	55
Figura 16. Representação gráfica do bioensaio realizado com 4 variantes da toxina <i>Cry1la12synth</i> expressas em fagos de fusão, na presença de larvas neonatas de <i>T.l.licus</i> .	56
Figura 17. Modelo teórico da estrutura terciária de <i>Cry1la12synth</i> e suas variantes.	59

Índice de Tabelas

Página

Tabela 1.	Seqüência e aplicação dos oligonucleotídeos iniciadores sintéticos	34
Tabela 2.	Mutações pontuais presentes em variantes de Cry1Ia12synth.	57

Abreviaturas

aa	aminoácidos
Amp	Ampicilina
BSA	Albumina sérica bovina
Bt	Bacillus thuringiensis
Cb	Carbenicilina
cm ²	Centímetros quadrados
C-terminal	Região carboxi terminal de uma proteína
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotideo trifosfato
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
g	Gramas
<i>g</i>	Unidade de força centrífuga
h	Horas
His	Histidina
Ig	Imunoglobulina
Kb	Quilobase – 10 ³ pares de bases
Km	Canamicina
L	Litro
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LBagar	Meio de cultura Luria-Bertani sólido
LBamp	Meio de cultura Luria-Bertani com ampicilina
M	Molar
mA	Miliampere
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
N-terminal	Região amino-terminal de uma proteína
óligos	Oligonucleotídeos
p/v	Peso volume
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
pM	Picomoles
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
rpm	Rotações por minuto
Tc	Tetraciclina
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
U	Unidade
ufc	Unidade formadora de colônia
v	Volume
v/v	Volume/volume

μF	MicroFaraday
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

Resumo

A cultura da cana-de-açúcar desde sempre reteve destacada relevância para a economia brasileira decorrente dos produtos que gera e pela demanda premente da utilização de biocombustíveis renováveis na matriz energética atual. Todavia, inúmeras doenças e pragas persistem e precisam ser continuamente estudadas de forma a se obter variedades geneticamente melhoradas e resistentes. O potencial biotecnológico das δ -endotoxinas produzidas em inclusões cristalinas provenientes de bactérias formadoras de esporos, a exemplo do *Bacillus thuringiensis*, é amplamente estabelecido. Nesta assertiva, buscou-se construir uma biblioteca de variantes do gene *cry11a12synth* e selecionar variantes codificadoras de toxina Cry11a12synth com atividade entomotóxica diferenciada contra larvas de broca gigante (*Telchin licus licus*) da cana-de-açúcar, por meio da estratégia de utilização combinada das técnicas de DNA shuffling (evolução molecular *in vitro*) e Phage display (apresentação em superfície de fagos). Novas toxinas foram selecionadas por varredura de moléculas afins das proteínas presentes nas vesículas de membrana do intestino médio de larvas de *T.l.licus*. Centenas de variantes foram analisadas e 30 delas foram escolhidas para serem expressas em fagos e avaliadas por bioensaios de atividade entomotóxica. Os resultados mostraram que 4 variantes apresentaram atividade entomotóxica específica aumentada em mais de 2 vezes quando comparadas a toxina original. Os genes codantes destas proteínas mutantes foram seqüenciados e as proteínas correspondentes tiveram a estrutura simulada por meio de técnicas de modelagem molecular por homologia, para estudar possíveis implicações das mutações sobre a atividade tóxica. Os estudos moleculares revelaram pequenas variações no contato e distância entre alguns átomos das proteínas mutantes em relação à proteína original. No entanto, tais modificações foram insuficientes para determinar a causa da atividade diferenciada entre mutantes e original, indicando a necessidade de estudos adicionais de interação entre a proteína Cry e o receptor. Portanto, os resultados obtidos validam a estratégia utilizada e disponibilizam novas moléculas candidatas ao controle desta praga em futuros eventos de geração de cana-de-açúcar geneticamente modificada.

Abstract

Sugarcane crop has always been important for the Brazilian economy due to its subproducts and the imminent demand in its use as a source of renewable biofuels. However, many diseases and insect-pests persist and need to be continuously investigated to result in the development of genetically improved varieties. The biotechnological potential of δ -endotoxins produced in crystalline inclusions from *Bacillus thuringiensis* spore-forming bacteria is widely established. In this context, we built a library of *cry11a12synth* variant genes coding Cry11a12synth toxin with improved entomotoxic activity against sugarcane giant borer (*Telchin licus licus*), through the combined use of DNA shuffling and phage display techniques. Novel toxins were selected by screening for binding protein present within brush border membrane vesicles from *T. l. licus* midgut. Hundreds of variant toxins were analyzed and 30 were chosen to be expressed in phages and evaluated by bioassays of entomotóxica activity. The results showed that 4 variant toxins had specific entomotoxic activity increased by more than two times compared to original toxin. The genes coding these mutant proteins were sequenced and the structures of the corresponding proteins were solved by homology molecular modeling, to evaluate possible implications of mutations on the entomotoxic activity. The molecular studies revealed minor variations in relation to the contact and distance among certain atoms within the mutant proteins as compared to the original one. Nevertheless, these variations were insufficient to determine the cause of the differential activities among mutants and original protein, indicating the need additional studies of interactions between Cry protein and receptor. Therefore, the results validate the strategy used and provide novel candidate molecules to control this pest in transforming events of genetically modified sugarcane.

1. Introdução

1.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae (Gramineae) e sua origem geográfica é atribuída ao Sudoeste Asiático, Java, Nova Guiné e também à Índia. Inicialmente, a espécie cultivada foi a *Saccharum officinarum* L. e com o passar do tempo, cultivares desta espécie sofreram problemas de doenças e de adaptação ecológica, e foram substituídas pelos híbridos interespecíficos do gênero *Saccharum* (Daniel & Roach, 1987).

No Brasil, o cultivo de cana-de-açúcar parece ser anterior à época do descobrimento, porém seu desenvolvimento é conseqüente à criação de engenhos e plantações com mudas trazidas pelos portugueses. Em fins do século XVI, mais de uma centena de engenhos, provenientes dos Estados de Pernambuco e Bahia cultivavam a cana, de sorte que o Brasil, até 1650, foi líder da produção mundial de açúcar, com grande penetração no mercado europeu (Mozambani *et al.*, 2006).

A cana-de-açúcar se caracteriza pelo desenvolvimento em forma de touceira. A parte aérea é formada por colmos, folhas, inflorescências e frutos; e a subterrânea, é constituída por raízes e rizomas. Os rizomas são constituídos por nós (nós), internós (entrenós) e gemas, as quais são responsáveis pela formação dos perfilhos na touceira. As novas touceiras da soca ou da ressoca se originam dos rizomas que rebrotarão após a colheita. O colmo é formado por nós bem definidos e entrenós distintos, fica acima do solo, e sustenta as folhas e panículas (Mozambani *et al.*, 2006).

Os colmos da cana são processados para produzir açúcar e etanol. O sistema de extração utilizado no Brasil consiste, quase que exclusivamente, da moagem, a qual separa o caldo, contendo a sacarose, da fibra que representa o bagaço. Para a produção de açúcar, o caldo é limpo, concentrado e cristalizado, através de decantação e filtro prensa, sobrando um resíduo, a torta de filtro. Parte dos açúcares não cristalizados e impurezas (melaço) são separados. O mel em mistura com o caldo, em concentração adequada, serve de insumos para fermentação por leveduras. O vinho resultante é destilado, produzindo álcool (hidratado - vendido direto nas bombas, ou

anidro - para mistura na gasolina) e deixando como resíduo a vinhaça (Macedo *et al.*, 2005).

Toda a energia elétrica, mecânica e térmica para o processamento é suprida por um sistema de co-geração, que utiliza somente o bagaço como fonte energética, o que implica num processo auto-suficiente, em alguns casos, com produção de excedentes de energia. Os processos industriais geram como resíduos a vinhaça, a torta de filtro e as cinzas da caldeira de bagaço. Estes resíduos são totalmente revertidos para a lavoura, a vinhaça na forma líquida, como fertirrigação e a torta transportada em caminhões, como adubo (Macedo *et al.*, 2005).

Como a maioria das poáceas, a cana-de-açúcar é uma planta C4, reconhecidas por formar compostos orgânicos com quatro carbonos (Baret *et al.*, 1999). Apresenta ainda elevada taxa fotossintética e de eficiência na utilização e resgate de CO₂ da atmosfera (Segato *et al.*, 2006).

A cana-de-açúcar é adaptada às condições de alta luminosidade, temperaturas elevadas, porém sua cultura necessita de grandes quantidades de água para suprir suas necessidades hídricas, visto que 30% do seu peso é composto de matéria seca e 70% por água, na dependência do estágio fenológico. As raízes, através de seus pêlos absorventes, são responsáveis pela maior parte da absorção de água, seguida pelas folhas. O orvalho da madrugada e os chuviscos, não chegam a atingir o solo, são absorvidos por suas folhas (Segato *et al.*, 2006).

O ciclo da cana plantada pela primeira vez, ou seja, oriunda de muda e que irá receber o primeiro corte, recebe o nome de ciclo da cana-planta. O plantio pode ser feito em dois períodos. No primeiro período, a cana é plantada de setembro a novembro, no início da estação chuvosa e quente, nestas condições, a cana-de-açúcar apresenta ciclo de duração média de 12 meses, denominada popularmente de 'cana-de-ano'. No segundo período, o plantio é realizado no espaço de janeiro a início de abril, no meio da estação chuvosa e quente e em direção ao outono. Nestas circunstâncias, passa em repouso a primeira estação de inverno, sendo cortada na segunda estação de inverno. Apresenta, então, ciclo variável de 14 a 21 meses, conforme a data do plantio e a época de maturação da variedade utilizada, obtendo a denominação de 'cana-de-ano e meio' (Segato *et al.*, 2006).

A importância da cana-de-açúcar pode ser atribuída à sua múltipla utilização, pois além de produzir açúcar, álcool anidro e aguardente, tem os subprodutos bagaço, vinhaça e torta de filtro de grande importância socioeconômica na geração de energia,

produção de ração animal, produtos aglomerados, fertilizantes, entre outras (Carvalho, 1993). Outra característica interessante da produção da cana trata-se do sistema produtivo ter sido concebido e desenvolvido (variedades, práticas agrícolas) para não depender de irrigação, através da escolha de variedades selecionadas e reciclo de todos os subprodutos para o campo (Macedo, 2005).

O Brasil conta com uma posição privilegiada para atender às necessidades de maiores exportações tanto de açúcar quanto de álcool anidro para fins combustíveis, pois possui duas regiões produtoras, nordeste e centro-sul, com safras alternadas, podendo manter sua presença no mercado mundial ao longo de todo o ano. Conseqüentemente, o Brasil lidera a lista dos 80 países produtores, garantindo 25% da produção mundial. No país, são cultivados aproximadamente 7,7 milhões de hectares e estima-se que a produção para esta safra atinja um montante de 629 milhões de toneladas de cana, que serão utilizadas como matéria-prima na produção de cerca de 36,7 milhões de toneladas de açúcar e na faixa de 27,96 bilhões de litros de álcool (Conab, set-2009).

Embora a produtividade média brasileira da cana-de-açúcar tenha apresentado um significativo aumento de 50% nos últimos 20 anos, estudos indicam que muito ainda pode ser melhorado, principalmente no que se refere ao controle de pragas e doenças. Apesar dos avanços tecnológicos, a cultura da cana ainda enfrenta uma série de problemas fitossanitários. Predadores como o bicudo da cana-de-açúcar (*Sphenophorus levis*), *Migdolus* (*Migdolus fryanus*), formigas cortadeiras (*Atta* spp. e *Acromyrmex* spp.), cigarrinha da raiz (*Mahanarva fimbriolata*), broca da cana (*Diatraea sacharalis*), broca gigante (*Telchin licus licus*), entre outras pragas de solo, anualmente causam grandes prejuízos a cultura canavieira.

Por ser uma cultura semiperene, de ciclo anual e de propagação vegetativa quando a lavoura é plantada com determinada variedade, a reforma do canavial é feita apenas após 4 a 5 anos de utilização comercial. O que implica como única alternativa economicamente viável para auxiliar o controle de doenças, o uso de variedades geneticamente resistentes às principais pragas da cultura (Arrigoni, 2005).

Entre as pragas que mais afetam a produtividade da cana-de-açúcar, a broca gigante, *Telchin licus licus* (Lepidoptera: Castniidae) é um dos principais problemas entomológicos da cultura em algumas áreas das regiões Norte e Nordeste do Brasil, especialmente nos estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Pará e Amapá. Segundo os dados fornecidos pelos técnicos da Asplana (Associação

dos Fornecedores de Cana) e do Sindaçúcar (Sindicato da Indústria do Açúcar e do Alcool), o inseto-praga causou uma redução superior a 10% na safra de 2003 no estado de Alagoas (Sindaçúcar, 2003), contribuindo para perdas da ordem de milhões de dólares. Situação semelhante ocorre em vários outros países da América do Sul e da América Central, entre os quais estão as Guianas, Bolívia, Colômbia, Panamá e Trinidad-Tobago (Mendonça *et al.*, 1996).

Informações adicionais relatam a ocorrência da broca gigante em Limeira e Iracemápolis municípios de São Paulo, indicando a entrada do inseto-praga na principal região produtora do país. A dimensão da área plantada de cana no Estado supera os 4 milhões de hectares, o que torna a situação mais preocupante, pois os prejuízos podem chegar a R\$ 400 milhões por safra (Santos *et al.*, 2010; Agrolink, 2007).

1.2 *Telchin licus licus* (Lepidóptera: Castniidae) – Broca-gigante da cana

A broca gigante *Telchin licus licus* Drury, 1773 é um dos mais importantes insetos-praga da cultura da cana-de-açúcar, incidindo em vários países do Continente Americano e na região Nordeste do Brasil.

Para o completo desenvolvimento deste inseto são necessários, aproximadamente, 177 dias, dispostos nas fases de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). A fase de incubação, ou seja, quando o ovo ainda não eclodiu leva em torno de 10 dias. O período de desenvolvimento larval dura, em média, 110 dias, em condições favoráveis, as larvas passam por 5 ínstars. O estágio de crisálida (pupa) abrange 45 dias e o adulto apresenta 12 dias de longevidade (Mendonça, 1982).

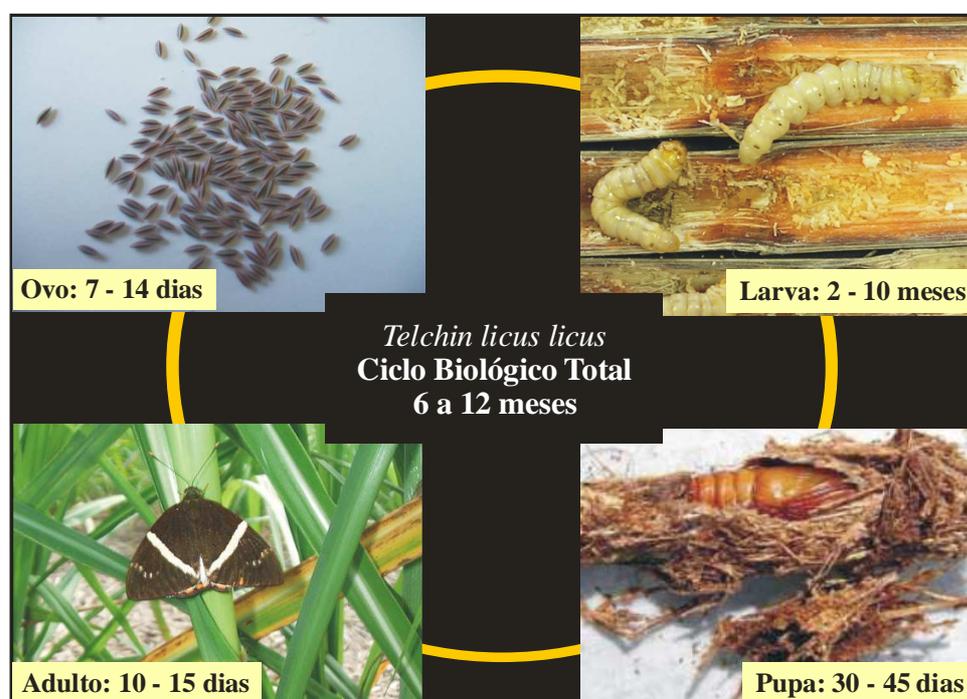


Figura 1. Ciclo biológico do inseto *Telchin licus licus*

Os ovos da broca gigante são alongados, com formato de sementes, medindo cerca de 4 mm de comprimento e 2 mm de largura no centro, com as extremidades pontiagudas, bastante semelhantes a minúsculas carambolas. São depositados soltos entre as canas da touceira, rentes ao solo e, principalmente dentro de pequenas aberturas no solo, próximo à base do colmo. Em média, são encontrados de 3 a 4 ovos por touceira, contudo, em zonas de grande concentração de adultos, foram encontrados até 27 ovos, em apenas um orifício entre o solo e o colmo da cana (Mendonça, 1982).

As larvas medem cerca de 5 mm quando eclodem e podem chegar a medir até 9cm, após completo desenvolvimento. Apresentam coloração branco marfim, com algumas manchas pardas no pronoto e espinarete bastante nítido abaixo da mandíbula. O corpo tem largura decrescente, ou seja, mais grosso na parte anterior e mais delgada na posterior. As pequenas lagartas, após eclosão, penetram entre o solo e o colmo da cana, abrindo a perfuração na base do colo da planta. No interior do solo, constroem uma galeria de baixo para cima, no interior do colmo, destruindo totalmente, durante seu desenvolvimento, os primeiros 2 ou 3 entrenós basais. Algumas vezes, nos casos mais graves, as galerias podem atingir até 1 m de comprimento. Geralmente, cada colmo da cana é atingido por uma broca, no entanto, uma única broca pode perfurar mais de um colmo, no decorrer do seu período larval (Mendonça *et al.*, 1996).

A pupa ou crisálida apresenta coloração castanha escura e mede aproximadamente 4 cm de comprimento. Fica escondida no interior do colmo, coberta por um casulo de fibras da cana (Mendonça, 1982).

O adulto de *T.l. licus* é uma mariposa grande, com predominância da cor castanho escura, com reflexos metálicos e furta-cores bastante característicos, em cada uma das asas anteriores possui uma faixa branca transversal e nas asas posteriores, uma faixa branca em diagonal, divididas em 2 porções desiguais, com alargamento migrando para a margem interna. Os adultos se deslocam em vôos curtos e lentos pelas entrelinhas da cana-de-açúcar, com alcance de vôos inferiores a 500 m. A corte nupcial ocorre no primeiro período do dia, quando os machos atraídos pelo feromônio da fêmea iniciam a cópula, permanecendo pousados nas folhas mais baixas da cana, em locais sombreados, por um período superior a duas horas. As posturas são feitas nas horas quentes do dia, com a fêmea depositando os ovos em locais protegidos no solo (Mendonça *et al.*, 1996).

Fatores como a prática da irrigação por aspersão, gotejamento ou pivô central, além das condições climáticas do Nordeste são apropriados para a vida da broca-gigante. Durante o plantio de verão (setembro até meados de janeiro), o inseto-praga encontra as melhores condições para se desenvolver, devido à umidade do solo, alcançada por práticas de irrigação e condições de temperatura e luminosidade elevadas. A larva do *T.l. licus* se desenvolve no interior do colmo da cana e sobrevive de uma safra para outra, causando danos significativos à produção. Por apresentar hábito endofítico, os métodos de controle (químico, mecânico-cultural e biológico) não têm sido eficientes no controle desta praga, além de causar problemas ambientais. A

catação manual de lagartas e pupas, aliados a captura de adultos com rede entomológica se constitui na única forma de controle razoavelmente satisfatória, porém apresenta baixa rentabilidade. A busca de novas alternativas para o controle dessa praga é de extrema importância e tem sido colocada como uma forte demanda para a cultura da cana-de-açúcar (Risco, 2003).

Os prejuízos decorrentes da broca gigante consistem do mau desenvolvimento ou a morte das plantas atacadas, sistema radicular parcialmente destruído e pouco ramificado, atrofia de entrenós, quebra do colmo na região da galeria por agentes mecânicos e redução do teor de sacarose. Além desses, o principal prejuízo é causado pela ação de agentes patológicos, como o *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*, que penetram pelo orifício ou são arrastados juntamente com a lagarta, ocasionando, respectivamente, a podridão-de-fusarium e a podridão-vermelha, responsáveis pela inversão e perda de sacarose no colmo (Planalsucar, 1977).

Os inseticidas biológicos, utilizados há mais de 50 anos, são uma alternativa para o controle mais seletivo de insetos nocivos. Esta prática inclui, principalmente, o emprego de microrganismos como o *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Mais recentemente, plantas transgênicas resistentes a insetos, desenvolvidas pela integração, nos seus genomas, de genes de resistência provenientes desses microrganismos, constituem-se em mais uma alternativa com grande potencial de proteção contra as perdas causadas por insetos-praga (Betz *et al.*, 2000; Gitahy, *et al.*, 2007).

1.3 *Bacillus thuringiensis*

Bactérias entomopatogênicas Gram positivas têm sido alvos de considerável atenção, visto serem utilizadas no controle de insetos-praga na agricultura e insetos-vetores em doenças humanas (De Maagd *et al.*, 2003). Membros do gênero *Bacillus* são amplamente utilizados como fonte de enzimas industriais, bioquímica fina, antibióticos e inseticidas (Agaisse & Lereclus, 1995). Após a descoberta do *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), há pouco mais de um século, inúmeros estudos envolvendo esta bactéria são realizados no mundo inteiro, devido ao seu destacado potencial inseticida e efeito inócuo aos mamíferos.

Pela sistemática, a bactéria *Bt* pode ser classificada como pertencente a Classe: Firmibacteria, Ordem: Eubacteriales, Família: Bacillaceae, Gênero: *Bacillus*, Espécie: *B. thuringiensis* (Whiteley & Schnepf, 1986). Dentro do gênero *Bacillus*, *B. thuringiensis*,

juntamente com *B. mycoides*, *B. sudomycoides*, *B. anthracis* e *B. weihenstephanensis* constituem o grupo do *B. cereus* (Rasko *et al.*, 2005).

B. thuringiensis é uma bactéria formadora de esporos que produz inclusões cristalinas compostas de proteínas conhecidas como δ -endotoxinas (Schnepf *et al.*, 1998; Soberón *et al.*, 2007). A primeira descrição sobre *Bt* foi feita pelo biólogo S. Ishiwata, no Japão, em 1902. Na época, esta bactéria que causava a doença no bicho-da-seda foi denominada de *Bacillus sotto*. No entanto, a descrição que havia sido feita por Ishiwata era muito breve e incompleta e, por esta razão, em 1915, ela foi novamente descrita por Berliner, que a nominou de *Bacillus thuringiensis*, em homenagem à província de Thuringia, na Alemanha, onde foi encontrado o primeiro inseto infectado (Milner, 1994).

A ecologia do *Bt* permanece pouco clara, esta bactéria ubíqua é encontrada no solo, em grãos armazenados, teias de aranha, restos de insetos, superfície de plantas e, provavelmente, seja melhor descrita como um patógeno oportunista. Um inseto morto proverá nutrientes suficientes, para permitir a germinação do esporo dormente. (De Maagd *et al.*, 2001).

Embora cepas de *Bt* tenham sido isoladas de muitos ambientes, a maioria dos habitats naturais pode envolver interações com larvas de insetos. Todavia, como as ocorrências epizoóticas são reduzidas, existem poucas chances de que a principal fonte de toxinas e esporos provenha de insetos colonizados. Existe a proposição, de que esta bactéria, possa ter uma sutil relação simbiótica, possivelmente com plantas, para justificar a produção de toxinas altamente específicas e eficientes (Aronson & Shai, 2001).

Vários fatores de virulência são produzidos por *Bt*, além das proteínas cristal, incluindo toxinas protéicas inseticidas secretadas como α -exotoxinas, β -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases. O próprio esporo contribui para a patogenicidade, por sinergismo com a proteína cristal. Todos estes fatores podem ter uma função na patogênese do inseto sob condições naturais, ajudando a bactéria no desenvolvimento da morte ou enfermidade da larva do inseto, mas a contribuição exata de cada fator é desconhecida (De Maagd *et al.*, 2001).

1.3.1 δ-endotoxinas

As δ-endotoxinas compreendem duas famílias multigênicas, cry (cristal) e cyt (citolisina). Proteínas Cry são especificamente tóxicas para as diferentes ordens de insetos, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Díptera e Homoptera, ou Nematóides. Em contraste, toxinas Cyt são ativas contra insetos dípteros (Soberón *et al.*; 2007, Bravo *et al.*, 2007).

Existem centenas de subespécies de *Bt* que, em sua maioria, produzem, durante a esporulação, uma ou mais inclusões paraesporais (cristais), cada qual compreendendo entre uma e cinco prototoxinas relacionadas, com massa molecular variando entre 25 e 140 kDa (Aronson & Shai, 2001; Bernhard *et al.*, 1997). Milhares de estirpes são mantidas em coleções no mundo inteiro, e existe uma vastidão de combinações de genes na mesma estirpe, embora certas combinações pareçam ser mais comuns que outras. Todavia, toxinas Cry possuem um espectro de atividade inseticida definido, normalmente, restrito a poucas espécies, dentro de uma ordem de insetos em particular (De Maagd *et al.*, 2001).

As várias proteínas inseticidas são sintetizadas durante a fase estacionária e são acumuladas na célula mãe como corpos de inclusão cristalina, por isso são denominadas Cry. As inclusões cristalinas respondem por até 25% do peso seco das células esporuladas. A quantidade de proteínas cristais produzidas por uma cultura de *Bt*, em condições de laboratório (em torno de 0,5 mg de proteína /mL) e, o tamanho dos cristais, indicam que cada célula deve sintetizar de 1.10^6 a 2.10^6 moléculas de δ-endotoxinas, durante a fase estacionária, para formar um cristal. Esta é uma produção massiva de proteína e, presumivelmente, ocupa uma vasta proporção da maquinaria celular. Não obstante, a esporulação e mudanças fisiológicas associadas procedem em paralelo com a produção de δ-endotoxinas (Agaisse & Lereclus, 1995).

A formação dos cristais envolve o acúmulo de toxinas protéicas. Um método que reproduza este acúmulo de proteína consiste em expressar o gene correspondente de um promotor forte em uma célula que não esteja se dividindo, para evitar a diluição da proteína pela divisão celular. Este é, efetivamente, o caso do *Bt*, onde inclusões de proteínas Cry são formadas em culturas na fase estacionária (Agaisse & Lereclus, 1995).

Na tentativa de sistematizar uma nomenclatura genética para toxinas Cry, Hofte & Whiteley (1989), propuseram uma classificação baseada nas similaridades

estruturais e no espectro de ação inseticida das proteínas codificadas. Consoante esta classificação, as proteínas inseticidas foram divididas em 4 classes e várias subclasses. As 4 classes consistiam em genes *cry I* que codificavam proteínas tóxicas contra lepidópteros, genes *cry II* específicos contra lepidópteros e dípteros, genes *cry III* específicos contra coleópteros, genes *cry IV* específicos contra dípteros e *cyt* (associada a *cry IV*), que por não apresentar homologia com as demais classes ou atividade específica, foi reconhecida como uma classe a mais.

No entanto, com o decorrer do tempo, surgiram muitas incongruências referentes a este sistema. A descoberta de novas proteínas, a tentativa de acomodar genes que eram altamente homólogos a grupos já existentes, diferentes atividades inseticidas ou genes com dupla especificidade para mais de uma ordem de insetos geraram a necessidade de revisar a nomenclatura para as toxinas Cry (Crickmore *et al.*, 1998).

Então, Crickmore e colaboradores (1998) propuseram classificação baseada apenas na identidade da seqüência de aminoácidos. Segundo a nova nomenclatura, os números romanos foram substituídos por números arábicos e os parênteses foram extintos. Até o momento, mais de 350 genes *cry* foram sequenciados e classificados em 59 grupos de proteínas Cry, com diferentes subgrupos (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).

1.3.2 Estrutura das δ -endotoxinas

O estudo da estrutura tridimensional das toxinas Cry demonstrou que estas proteínas são constituídas de 3 domínios estruturais (Figura 2) e tem contribuído para elucidar seu mecanismo funcional, além de explicar diferenças na especificidade destas toxinas (Bravo, 1997).

Até o momento, oito estruturas de proteínas Cry foram resolvidas por cristalografia de raios-X, Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995), Cry1Ac (Li *et al.*, 2001), Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001), Cry3Aa (Li *et al.*, 1991), Cry3Ba (Galitsky *et al.*, 2001), Cry4Aa (Boonserm *et al.*, 2006), Cry4Ba (Boonserm *et al.*, 2005) e Cry8Ea1 (Guo *et al.*, 2009). Estas toxinas mostram consideráveis diferenças em suas seqüências de aminoácidos e especificidade ao inseto, porém apresentam elevada similaridade em seus três domínios estruturais (Pigott & Ellar, 2007).

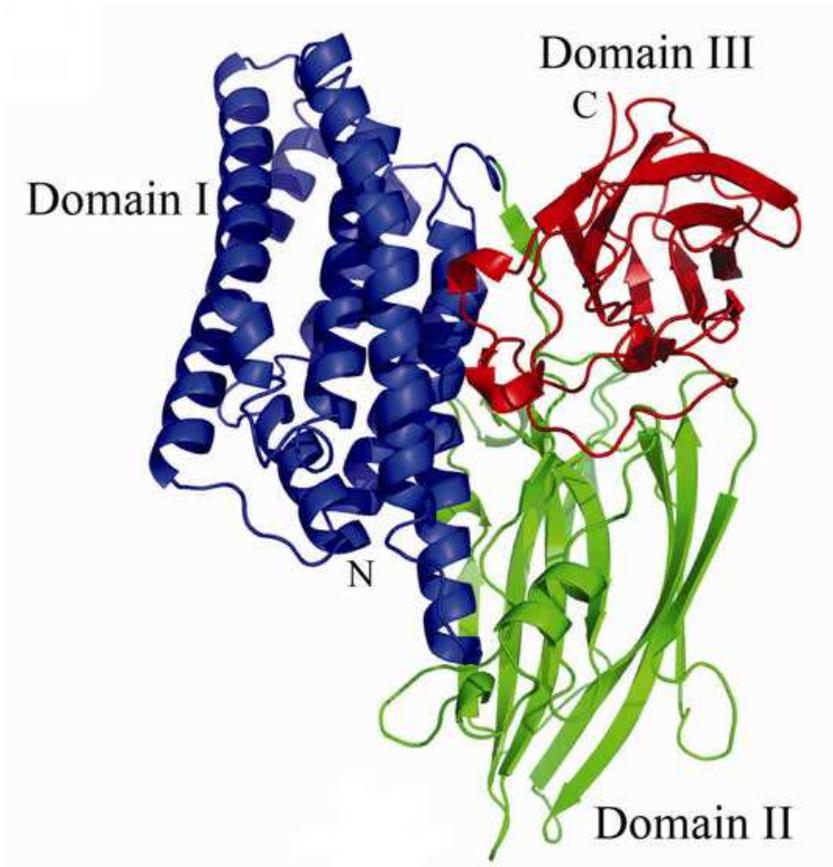


Figura 2. Estrutura terciária das proteínas Cry. Toxina Cry8Ea1 com domínio I em azul, domínio II em verde e domínio III em vermelho. N representa a porção amino terminal da molécula e C a porção carbóxi terminal (Guo *et al.*, 2009)

O domínio I está constituído por sete α -hélices, onde uma α -hélice central (α -5) é completamente circundada pelas outras 6 hélices anfipáticas e está implicado na formação do poro. O domínio II consiste de 3 folhas β antiparalelas compartilhando topologia similar à conformação de chave grega, formando um β -prisma. Este domínio exerce importante papel na especificidade do inseto-alvo, pela interação da toxina com o receptor. O domínio III é formado por duas folhas β antiparalelas constituindo um β -sanduíche numa formação tipo dobradas *jellyroll*. Ele está envolvido na ligação ao receptor e, paralelamente, também parece contribuir para a formação do poro (De Maagd *et al.*, 2003).

O alinhamento das seqüências de aminoácidos das toxinas Cry revelou a presença de 5 blocos de seqüências conservadas, localizados nas regiões internas das proteínas e na região de contato entre os domínios (De Maagd *et al.*, 2001). A análise destes blocos demonstra que as toxinas Cry são encontradas, geralmente, nos tamanhos de 130-140 kDa ou aproximadamente a 70 kDa. A similaridade de seqüência de alguns membros da família Cry é muito baixo, no entanto a presença de alguns ou de todos os 5 blocos indica a importância destas regiões para alguns aspectos

funcionais ou de estabilidade destas toxinas. Os blocos conservados estão presentes na porção N-terminal de toxinas maiores, enquanto que a porção C-terminal muitas vezes não é encontrada em toxinas menores (Pigott & Ellar, 2007). A comparação das seqüências com mais de 1000 resíduos, da porção C-terminal, sugere a presença de 3 blocos adicionais (6, 7 e 8), que estariam fora do cerne ativo tóxico (Schnepf *et al.*, 1998).

O bloco conservado 1 está constituído pela α -hélice central (α -5) do domínio I, o bloco 2 consiste da região de interface entre os domínios I e II, o bloco 3 está formado pela região de ligação entre os domínios II e III, o bloco 4 está composto pela folha- β central do domínio III e o bloco 5 representa o final do domínio III (De Maagd *et al.*, 2001).

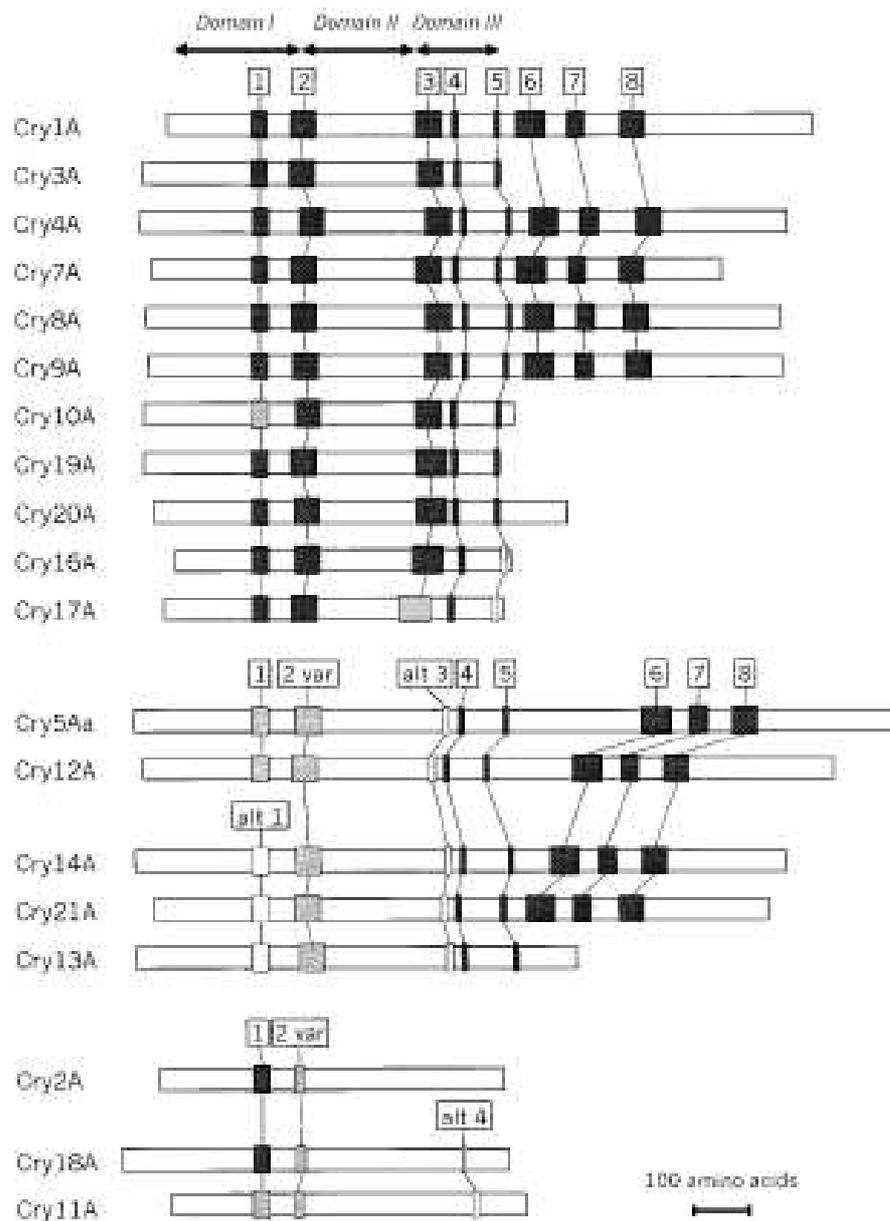


Figura 3. Esquema da estrutura primária das proteínas Cry. Os quadrados em preto, cinza e branco indicam alto, moderado e baixo grau de homologia, respectivamente, da seqüência consenso em cada bloco conservado (Schnepf *et al.*, 1998)

A figura 3 mostra a distribuição dos blocos nos vários grupos de famílias das proteínas Cry, organizados conforme a identidade e homologia das seqüências de aminoácidos. Os blocos conservados são distribuídos, de forma consistente, em razão de suas similaridades em 3 grupos de toxinas Cry.

O primeiro grupo se caracteriza pelas proteínas que apresentam os 5 blocos, ou seja, Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry 16, Cry 17, Cry19 e Cry 20. O segundo grupo está composto pelas proteínas Cry5, Cry12, Cry13, Cry14 e Cry 21 onde se verifica homologia entre os blocos 1, 2, 4 e 5, com ressalva para o bloco 1 que

apresenta maior variabilidade neste grupo de seqüências do que no primeiro. As proteínas do segundo grupo também possuem uma variante no bloco 2 e são destituídas do bloco 3. Para ambos os grupos apresentados, quando a proteína possui a região C-terminal, os blocos 6, 7 e 8 estão invariavelmente presentes. O terceiro grupo está formado pelas proteínas Cry2, Cry11 e Cry18, que apresentam o bloco 1 e uma variante truncada do bloco 2, mas carece de homologia convincente com os outros blocos conservados. As outras proteínas Cry6, Cry15, Cry22, Cyt1 e Cyt2 não apresentam homologias de seqüências dos blocos conservados nos 3 grupos analisados (Schnepf *et al.*, 1998).

1.3.3 Modo de ação

O mecanismo de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis* envolve a solubilização do cristal no intestino médio de insetos suscetíveis, o processamento proteolítico da protoxina por proteases do intestino, a ligação da toxina aos receptores do intestino e inserção da mesma na membrana apical para favorecer a formação de poros e canais de íons.

Os cristais são compostos de protoxinas. Para que estas protoxinas se tornem ativas se faz necessário que os cristais sejam ingeridos pelas larvas de insetos suscetíveis, uma vez que sua solubilização é resultado do ambiente altamente alcalino proveniente do intestino da maioria dos insetos, principalmente de lepidópteros (Gilliland *et al.*, 2002). Alterações na extensão da solubilização algumas vezes explicam diferenças no grau de toxicidade entre proteínas Cry.

Na seqüência, as protoxinas devem ser proteoliticamente convertidas em toxinas ativas pelas proteases exógenas e endógenas do intestino médio dos insetos, ocasionando a perda das porções N-terminal e C-terminal da proteína, para liberar um monômero, de aproximadamente 60-70 kDa, conhecido como fragmento tóxico (Grochulski *et al.*, 1995). Variações no processamento da toxina pelas diferentes proteases existentes no intestino médio das larvas demonstram a seletividade do Bt, observada em algumas espécies de inseto. Um exemplo da notável capacidade das proteínas cristal inseticidas de *Bt* foi evidenciada pela subespécie aizawai IC1, na qual a toxina ativa Cry1Ab pode ser específica para lepidópteros, quando a protoxina correspondente é clivada por proteases de espécies lepidópteras ou, específica para dípteros, quando a toxina ativada por lepidópteros é adicionalmente processada com

proteases de dípteros. Esta variação na especificidade é determinada pelos aminoácidos da posição 524 a 595 da extensão C-terminal da toxina. Enquanto os aminoácidos posicionados entre 524 e 558 são importantes para a toxicidade dos dípteros, os aminoácidos localizados entre 558 e 595 são críticos para a toxicidade dos lepidópteros (Rukmini, *et al.*, 2000).

A composição das proteases dentro de uma dada cepa pode variar em função da idade larval. Incubação da toxina Cry1C com o suco gástrico de larvas do primeiro e segundo ínstaes de *Spodoptera littoralis* manteve parte da toxina Cry1C intacta, enquanto a toxina foi completamente degradada quando incubada com proteases intestinais de larvas do quinto ínstar. O efeito diferenciado de inibidores de proteases obtidos de variados ínstaes larvais é indicativo de que o perfil de proteases do suco gástrico é modificado com a idade larval (Keller *et al.*, 1995).

As tripsinas e quimiotripsinas representam a vasta maioria da atividade das endopeptidases no fluido luminal do intestino médio das larvas. Em complementação, enzimas com atividades tipo termolisina e elastase também foram relatadas. A tripsina presente nos insetos se assemelha à tripsina encontrada em mamíferos na especificidade ao substrato, sensibilidade a inibidores e seqüência de aminoácidos. Todavia, elas diferem essencialmente no pH alcalino ótimo e em sua habilidade de solubilizar os cristais da toxina. As atividades das exopeptidases presentes no intestino médio dos insetos são restritas, basicamente, às aminopeptidases e carboxipeptidases, membros da família de enzimas metalopeptidases (Daí & Gill, 1993).

A toxina ativa é ligada a receptores específicos, presentes na região apical da membrana das células do intestino médio do inseto. A ligação é um processo de 2 etapas, envolvendo um passo reversível e outro irreversível. O passo reversível, de baixa afinidade, abrange a interação entre a toxina e seu sítio de união reversível, porém individualmente, não é capaz de responder pela toxicidade. O passo irreversível, de alta afinidade, envolve a união a receptores específicos e a inserção da toxina na região apical da membrana, esta etapa parece estar mais associada com a toxicidade (Cooper *et al.*, 1998). Relatos de que moléculas truncadas de Cry1Ab, contendo apenas os domínios II e III, poderiam se ligar, apenas reversivelmente, a receptores do intestino médio, sustentam a teoria de que a ligação irreversível requer a inserção do domínio I (Schnepf *et al.*, 1998).

A membrana peritrófica do intestino dos insetos age como uma barreira para microorganismos. A proteção natural que ela confere deriva de seu conteúdo de quitina

que forma longas cadeias interconectadas arranjadas em múltiplas camadas. Adicionalmente, proteínas de ligação a quitina altamente glicosiladas complementam os outros componentes estruturais importantes que constituem a membrana. As membranas peritróficas de espécies de lepidópteros não apenas diferem em composição bioquímica, mas também em aparência física. Uma vertente de pesquisa considerou que a presença desta membrana, intacta, poderia ser capaz de interferir no grau de eficácia da toxicidade das δ -endotoxinas. Estudos sobre a função da membrana peritrófica para explicar a baixa suscetibilidade de algumas espécies de insetos lepidópteros não suscetíveis a toxinas Cry foram realizados com calcofluor. Calcofluor é um agente clareador, que se liga naturalmente à quitina, portanto excelente competidor, e atua no rompimento ou dissolução da membrana peritrófica. Por meio de bioensaios com toxina adicionada de calcofluor, foi demonstrado que não houve aumento da eficácia da toxina Cry (Cry1Ac e Cry1Ca). Apesar das evidências de rompimento da membrana peritrófica pelo agente calcofluor, foi constatado que a toxina se liga a fragmentos da membrana, glicoproteínas que são liberadas da malha de quitina, enquanto apenas poucas toxinas se ligam ao intestino médio para formar poros e provocar qualquer efeito tóxico. A maioria das toxinas que se ligam especificamente ou inespecificamente a glicoproteínas da membrana peritrófica são clivadas por proteases associadas à membrana e tornam-se inativas, sendo excretadas (Rees *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos de histopatologia e mecanismos de ação foram realizados com lepidópteros e, portanto, para toxinas Cry1A foram descritos pelo menos 4 tipos de receptores em insetos distintos: uma proteína tipo-caderina (CADR), uma aminopeptidase-N (APN) ancorada no glicosilfosfatidil-inositol (GPI), uma fosfatase alcalina (ALP) ancorada no glicosilfosfatidil-inositol (GPI) e um glicoconjugado de 270 kDa (revisado em Soberon *et al.*, 2007).

Duas diferentes hipóteses foram propostas para explicar o modo de ação destas toxinas, um modelo de formação do poro e outro de transdução de sinal. Para ambos os modelos, o primeiro passo é similar, ou seja, os cristais são ingeridos pelas larvas e solubilizados em protoxinas no intestino. Estas protoxinas são clivadas por proteases do intestino médio resultando em toxinas ativas de cerca de 60 kDa e três domínios, que incluem a hélice α -1 na porção amino-terminal. A toxina ativada se liga ao receptor caderina que está localizado nas microvilosidades das células intestinais (Bravo & Soberon, 2008).

O modelo de formação do poro propõe que esta interação com o receptor caderina provoca uma mudança conformacional que facilita a clivagem proteolítica da hélice α -1 por proteases da membrana, resultando na oligomerização da toxina (Figura 4). O oligômero da toxina se liga a receptores secundários, que consistem de proteínas ancoradas a membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol, tais como aminopeptidase N em *Manduca sexta* ou fosfatase alcalina em *Heliothis virescens*. No passo final, o oligômero da toxina insere-se na membrana, formando poros e subseqüentemente causando o extravasamento/rompimento das células, provocando a morte da larva (Bravo & Soberon, 2008).

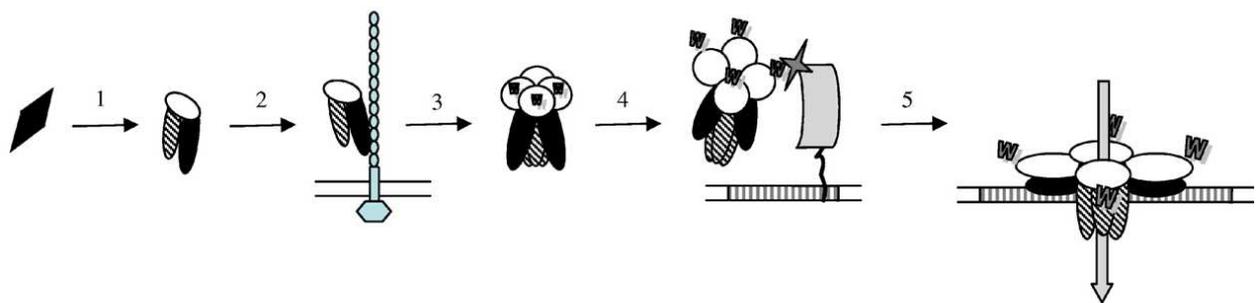


Figura 4. Modelo de ação de formação do poro para toxinas Cry. **1** - Solubilização do cristal e ativação da toxina. **2** - Ligação da toxina Cry monomérica ao receptor primário do tipo caderina, provocando mudança conformacional e clivagem da primeira alfa hélice. **3** - Formação do oligômero (estrutura conhecida como pré-poro). **4** - Ligação do oligômero ao receptor secundário do tipo aminopeptidase ou fosfatase alcalina. **5** - Inserção do oligômero na membrana celular e formação do poro (Bravo *et al.*, 2007).

Em contrapartida, o modelo de transdução de sinal (Figura 5) afirma que a ligação da toxina monomérica ao receptor caderina ativa uma via de sinalização que envolve a estimulação da proteína G e de adenil ciclase (AC), aumentando os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que por sua vez ativa a proteína quinase A (PKA) (Zhang *et al.*, 2006). A ativação do caminho de sinalização AC/PKA causa uma desestabilização nos canais de íons e citoesqueleto da membrana celular, que afeta a integridade funcional e estrutural da célula e resulta na lise celular (Pigott & Ellar, 2007).

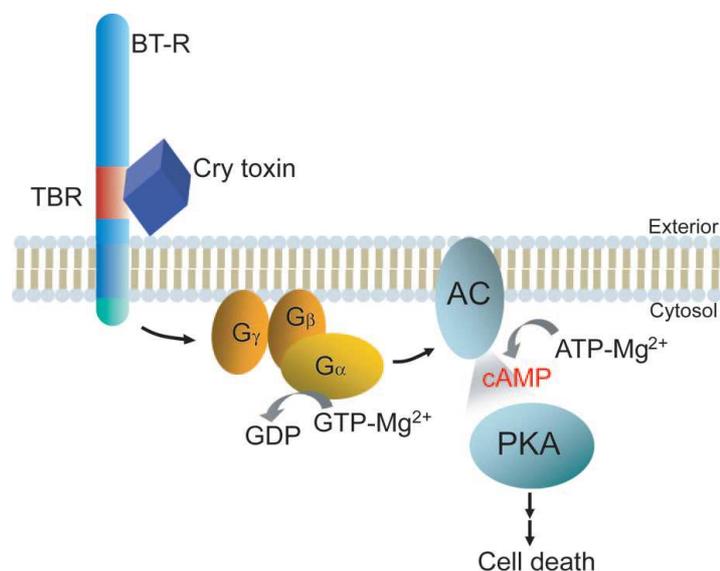


Figura 5. Mecanismo de ação de transdução de sinal para toxinas Cry (Zhang *et al.*, 2006).

Experimentos de proteção osmótica sugerem que, as toxinas Cry induzem a formação de poros pequenos e não específicos com um diâmetro de 0,5 a 1 nm na membrana de células suscetíveis, resultando num influxo de íons acompanhado de água (Hofte & Whiteley, 1989).

As células epiteliais morrem por inativação do sistema que mantém o gradiente de pH e por citólise osmótica. As toxinas Cry aumentam a permeabilidade das microvilosidades apicais a cátions, ânions, água e moléculas de maior tamanho. Isto causa um colapso na diferença de potencial e, portanto, perda de força motriz que dirige a entrada de aminoácidos ao interior celular, assim como a redistribuição dos cátions entre o lúmen e o citoplasma. O efeito mais devastador desse processo é a alcalinização do citoplasma que interfere no metabolismo celular normal e tem como consequência final, a destruição do epitélio intestinal (Wolfersberger, 1992).

1.3.4 Aplicação de *Bacillus thuringiensis*

Existem mais de 350 seqüências de genes *cry* descritos (De Maagd *et al.*, 2001). Nesta geração de plantas-*Bt* algumas delas apresentam múltiplos genes *cry*, que conferem às plantas um maior espectro de proteção contra diferentes insetos-praga, reduzindo a probabilidade das mesmas desenvolverem resistência (Pardo-López *et al.*, 2009).

A utilização dos genes *cry* contribuíram para a otimização da expressão gênica em plantas transgênicas (Roh *et al.*, 2007). Em decorrência disto, houve um aumento

substancial no número de países que adotaram culturas transgênicas que saltou de 3 em 1996, primeiro ano de comercialização, para 25 países em 2008. No que implica em mais de 160 milhões de hectares plantados em 2008 com culturas transgênicas. As características predominantes nas lavouras transgênicas consistem da tolerância a herbicidas, a resistência a insetos e o emprego de genes combinados (James, 2008).

No mundo, as culturas que mais se utilizam de transgenia são a soja, o milho e o algodão. No Brasil, em 2009, a CTNBio aprovou a solicitação de várias empresas multinacionais para liberação comercial de culturas como milho e algodão. A Du Pont e Dow Agrosience requisitaram a liberação comercial do milho transgênico, contendo os eventos TC 1507 e NK 603 (constituído dos genes *cp4-epsps*, *cry1F* e *Pat*) que conferem tolerância a herbicidas e resistência a insetos. A Monsanto solicitou deferimento para o milho contendo o evento MON89034 (combinando os genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*), que confere resistência a insetos; para o milho contendo os eventos MON810 e NK603 (gene *cryIAb*), que conferem resistência a insetos e tolerância a herbicidas; e para o algodão contendo os eventos MON 531 x MON 1445 (genes *cry1Ac*, *nptII*, *aad*), que conferem resistência a insetos e tolerância ao glifosato. A Syngenta demandou pela liberação do milho geneticamente modificado, contendo os eventos Bt11 x GA21 (genes *cry1A(b)*, *pat*, *mepsps*), para resistência a insetos e tolerância a herbicida (CTNBio, 2009).

Dados recentes (van Frankenhuyzen, 2009) comprovam a abrangente inserção destas toxinas em diferentes táxons e denotam o específico espectro de atividade destas proteínas. Todavia, a despeito do crescente aumento na lista de genes *cry* identificados, e dentre as informações disponíveis na literatura que foram compiladas, foi constatado que a maioria (91%) das toxinas foi testada contra um número limitado de espécies (10 ou menos) e cerca de 28% das toxinas catalogadas até então ainda não foram testadas, além do que espécies e toxinas testadas não estão igualmente distribuídas entre as ordens de insetos e famílias de proteínas. Entre as 3 maiores ordens de insetos, os lepidópteros, efetivamente, foram os mais testados, onde 59 holotipos de toxinas foram experimentados contra 71 espécies, num total de 1182 bioensaios. A espécie *P. xylostella* foi a mais utilizada nestes bioensaios (9,8% deles), seguida da *S. exigua* (8,7%) e *H. virescens* (6,4%). O gênero *Telchin* sequer é mencionado. As famílias de toxinas Cry1, Cry2 e Cry9 respondem por 96,2% dos bioensaios com lepidópteros, sendo que apenas Cry1 corresponde a 80%. Portanto, é

evidente a necessidade de se estudar outras espécies, tanto quanto testar o maior número de toxinas possíveis para cada espécie ou vice-versa.

Estruch e colaboradores (1997) expuseram dados indicando que plantas geneticamente transformadas com genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac* de *Bt*, nas suas formas nativas ou truncadas, apresentam um grau de proteção não totalmente satisfatório contra *Manduca sexta* no tabaco, *Heliothis virescens* e *Helicoverpa zea* no tomate e *Phthorimaea operculella* na batata (Peferoen *et al.*, 1997). Estes trabalhos demonstraram que os genes codificadores das proteínas inseticidas de *Bt* podem ser expressos em plantas, mas o nível de proteínas ativas nas plantas transformadas, quando utilizados os genes nativos, é relativamente baixo, com algumas exceções (Warren *et al.*, 1992), o que geralmente não é suficiente para uma proteção adequada.

Em virtude dessas observações, esforços têm sido concentrados no aumento da expressão dos genes de *Bt* em plantas, na seleção de novas variantes de *Bt* mais ativas e/ou na modificação das seqüências dos genes *cry* de maneira a aumentar a produção de toxinas no interior das plantas. As seqüências de genes *cry* de *Bt* apresentam um alto conteúdo de bases adenina/timina (A/T) quando comparados a genes de plantas, que tendem a ter um alto conteúdo de bases guanina/citosina (G/C) (Roh *et al.*, 2007). Como consequência, os códons preferenciais dos genes de *Bt* são ineficientes em plantas, determinando a não tradução ou uma meia-vida do mRNA muito curta, o que leva à expressão reduzida destes genes. A substituição de nucleotídeos na seqüência codificadora por meio da síntese química ou da utilização de formas truncadas auxilia a correta leitura para tradução em plantas. Porém, deve-se adequar as modificações a cada espécie vegetal a ser transformada, tendo o cuidado de que a síntese (parcial ou total) gere a mesma proteína do gene nativo (Estruch *et al.*, 1997; De Maagd *et al.*, 1999).

Uma série de fatores corrobora para a disseminação das lavouras geneticamente modificadas (GM), entre eles, se destacam a segurança alimentar humana e animal, a capacidade de produzir alimentos mais acessíveis (menores preços) contribuindo para o alívio da fome e da pobreza, a conservação da biodiversidade, a mitigação das mudanças climáticas pela redução da emissão de gases de efeito estufa e a geração de benefícios econômicos sustentáveis (James, 2008).

Portanto, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas expressando proteínas inseticidas são altamente relevantes no contexto atual, visto que representam

uma alternativa promissora ao melhoramento convencional por contribuírem na segurança alimentar humana e animal, na capacidade de produzir alimentos mais acessíveis (menores preços) contribuindo para o alívio da fome e da pobreza, na conservação da biodiversidade, na mitigação das mudanças climáticas pela redução da emissão de gases de efeito estufa e na geração de benefícios econômicos sustentáveis (James, 2008). Entre as diferentes classes de proteínas estudadas para o controle de pragas, as proteínas Cry (ou toxinas *Bt*) são uma das mais interessantes devido à especificidade a grupos de insetos, não serem poluente ao meio ambiente, serem inócuas aos mamíferos e vertebrados e não possuírem toxicidade sobre as plantas.

1.4 Evolução molecular dirigida *in vitro*

As complexas estruturas biológicas que a natureza tem evidenciado foram desenhadas por pelo menos um processo, a evolução natural. De fato, complexos sistemas adaptativos foram gerados pelo processo evolucionário. Os cientistas têm utilizado diferentes métodos, como a modelagem molecular, para entender e prever o comportamento destas mesmas moléculas. Embora poderosa, a modelagem molecular opera apenas em relação à estrutura da proteína e não pode prever o efeito das mutações das proteínas ao nível do DNA, mRNA, dobramento da proteína ou interações protéicas com outras moléculas do ambiente (Stemmer, 2002).

A evolução molecular dirigida resultou de estudos de mutagênese sítio-dirigida na tentativa de gerar variantes melhoradas de enzimas. Na mutagênese, são inseridas mutações pontuais, utilizando oligonucleotídeos desenhados, especificamente, para alterar o códon de escolha no gene selvagem, gerando alteração no aminoácido. Na evolução dirigida, diferentemente, ocorre a introdução de mutações pontuais aleatórias no gene que codifica a proteína, seguido da etapa de seleção, a partir de uma população de mutantes que melhor respondam pela característica desejada. Nesse método, o principal não é determinar qual o sítio de mutação, mas sim a escolha de um sistema de seleção que possibilite a identificação de mutantes com característica previamente determinada.

Os métodos para construção de bibliotecas de mutantes podem ser divididos em três categorias. As duas primeiras categorias incluem técnicas que geram diversidade de seqüências na forma de mutações pontuais, inserções ou deleções. Elas podem ser divididas em métodos que inserem modificações randômicas ao longo do gene, como 'error-prone PCR' e técnicas que envolvem incorporação de seqüências sintéticas de DNA randômico dentro de seqüências do gene, por PCR ou clonagem direta, a exemplo da mutagênese baseada em oligonucleotídeos. A terceira categoria compreende as técnicas que não criam diretamente nova diversidade nas seqüências, mas combinam a diversidade existente em novos formatos, pela recombinação de ampla gama de genes similares ou pela combinação de mutações pontuais selecionadas que conduzem a recombinações (Neylon, 2004). Nesta última categoria estão métodos como processo de extensão promovida (StEP) (Zhao *et. al.*, 1998), truncagem interativa para criação de enzimas híbridas (ITCHY) (Ostermeier & Lutz,

2003), *random chimeragenesis on transient template* (RACHITT) e *DNA shuffling* (Stemmer, 1994; Coco *et. al.*, 2001).

1.4.1 DNA shuffling

DNA shuffling é um método de recombinação *in vitro*, a partir de fragmentos de DNA de seqüências homólogas recombinados por PCR (Stemmer, 1994).

A recombinação randômica de seqüências de DNA, conforme sejam provenientes de um único gene ou de múltiplos genes pode introduzir mutações aleatórias numa freqüência relativamente alta, a despeito da diversidade desejada para inúmeras aplicações de evolução *in vitro*, estas mutações podem ter efeitos deletérios ou neutros nas funções das proteínas, portanto, nem sempre são benéficas. Modificações no procedimento básico da técnica descrita por Stemmer deram origem ao método denominado *Family shuffling*, que consiste da recombinação aleatória de dois ou mais genes (Zhao *et. al.*, 1998; Ostermeier & Lutz, 2003; Neylon, 2004). Uma das vantagens do *DNA shuffling* sobre os outros métodos consiste de que nenhuma informação estrutural é requerida para conduzir a evolução da proteína *in vitro* (Harayama, 1998).

A técnica *DNA shuffling* conforme descrito por Stemmer (1994) e Zhao *et al.* (1997) consiste de 4 etapas: (1) isolamento do(s) gene(s) a ser(em) fragmentados, (2) fragmentação enzimática do gene, (3) recombinação dos fragmentos gênicos por termociclagem na presença da enzima Taq DNA polimerase, sem adição de iniciadores e (4) amplificação dos produtos recombinados por PCR convencional (Figura 6).

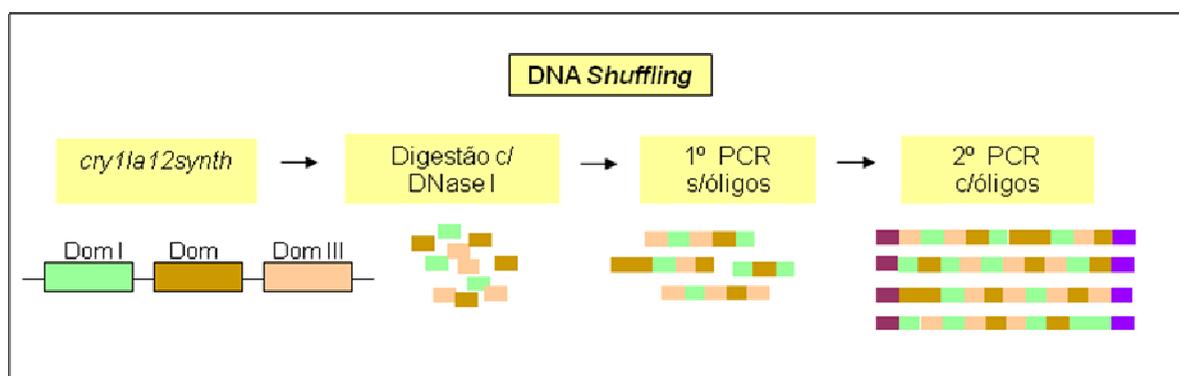


Figura 6. Técnica de *DNA shuffling* utilizando um único gene como substrato. O gene *cry11a12synth* foi digerido com Dnase I e seus fragmentos foram recombinados por PCR. Os oligonucleotídeos específicos utilizados no segundo PCR continham sítios de restrição à enzima *SfiI* para posterior clonagem.

O isolamento do gene a partir de seu plasmídeo de origem pode ser obtido por digestão com enzimas de restrição ou amplificação por PCR. Nesse caso, os oligonucleotídeos iniciadores poderão conter em sua seqüência os sítios de enzimas de restrição que serão utilizadas em futuras subclonagens, visando à seleção das novas moléculas. Na fragmentação do gene, geralmente, é utilizada a enzima DNase I, capaz de gerar, de forma aleatória, fragmentos de tamanhos variados, dependendo das condições (concentração de enzima e tempo) utilizadas na reação. A obtenção de fragmentos de DNA de fita dupla com tamanho entre 10 a 50 pares de bases tem indicado resultados interessantes (Oliveira, 2008). Pode ser considerada também a possibilidade de utilizar outras enzimas de restrições, com o intuito de prever o tamanho dos fragmentos desejados. Posteriormente, os fragmentos gênicos são recombinados aplicando repetidos ciclos de PCR, sem adição de oligonucleotídeos iniciadores. Os fragmentos isolados, quando se anelam, formam 'homoduplexes' (originados de anelamento de seqüências do mesmo gene) ou 'heteroduplexes' (resultado do anelamento de seqüências de genes diferentes) que irão funcionar como 'iniciadores' da reação (revisado em Silva *et al.*, 2003). Por fim, os blocos constituídos por recombinação durante a PCR, são submetidos a novos ciclos de PCR, com a adição de oligonucleotídeos iniciadores específicos, para amplificar e recuperar os genes recombinados com o mesmo tamanho do gene original (Stemmer, 1994). Extensivos estudos revelaram que a fidelidade durante a PCR pode ser otimizada pela enzima DNA polimerase utilizada e pelas condições específicas (Zhao & Arnald, 1997; Lassner & Bedbrock, 2001).

Apesar de amplamente utilizada em aplicações de terapia gênica, na construção de novas vacinas a partir de vírus e plasmídeos, no melhoramento da atividade enzimática de várias moléculas utilizadas no campo farmacêutico, somente na presente década, a evolução molecular dirigida *in vitro*, com aplicação da técnica de DNA *shuffling*, começou a ser utilizada para gerar novas moléculas com potencial para conferir resistência a insetos-praga. A estratégia de recombinação com inserção de mutações favoráveis e remoção de mutações deletérias da população de proteínas mutantes com propriedades melhoradas representa excelente perspectiva para o uso em transgenia visando o desenvolvimento de produtos agrícolas resistentes a pragas de impacto econômico (Patten *et al.*, 1997; Ryu & Nam, 2000; Lassner & Bedbrock 2001).

A expressão de proteínas Bt, com concentrações suficientemente elevadas, para gerar um fenótipo agronomicamente relevante em plantas transgênicas, é uma tarefa árdua. Comumente, é necessário produzir várias centenas de eventos, na tentativa de encontrar o fenótipo apropriado, para o avanço do desenvolvimento do produto (Lassner & Bedbrock, 2001). Neste contexto, a evolução molecular dirigida pode ser utilizada para aumentar a atividade específica da toxina Bt para uma ampla faixa de alvos, além do seu inseto alvo e, portanto, reduzir a aplicação de pesticidas químicos nos campos de plantas transgênicas (Yamamoto, 2002).

Estratégias alternativas para criar bibliotecas de mutantes e selecionar mutantes com características interessantes têm sido amplamente executadas. O sucesso desta estratégia depende do tamanho, qualidade e diversidade das bibliotecas, e, crucialmente, da sensibilidade, eficiência, e poder de discriminação da técnica de varredura ou seleção disponível (Fernandez-Gacio *et al.*, 2003).

Técnicas de seleção *in vitro* são baseadas na ligação física entre a proteína expressa pelo gene e os receptores e, para tanto, um sistema eficiente é a aplicação da técnica de *phage display*. Em princípio, os processos de seleção por *phage display* são mais eficientes por que eles podem manusear bibliotecas (freqüentemente, maiores que 10^7 clones) de alguns milhares de clones (Fernandez-Gacio *et al.*, 2003).

1.4.2 Phage display

A técnica de *phage display* foi pioneiramente introduzida por George Smith, em 1985. Esta técnica teve grande influência nas descobertas feitas no campo da imunologia, biologia celular e farmacologia (Kehoe & Kay, 2005; Willats, 2002).

O *phage display* permite a apresentação de peptídeos e bibliotecas de proteínas na superfície de partículas de fagos, os quais conduzem à seleção de peptídeos e proteínas, incluindo anticorpos (Soltes *et al.*, 2007), com elevada afinidade e especificidade por quase qualquer alvo (Willats, 2002). O procedimento envolve a introdução de seqüências peptídicas exógenas dentro do genoma codificador das proteínas do capsídeo do fago. As proteínas codificadas são apresentadas na superfície do fago como um produto de fusão com uma das proteínas da capa do vírus. Desta forma, em vez de construir diferentes proteínas ou peptídeos individualmente e depois expressar, purificar e analisar cada variante, a biblioteca de *phage display* possibilita encontrar até 10^{10} variantes construídos simultaneamente. Partículas de

fagos suportam condições extremas, tais como baixo pH e temperaturas reduzidas, sem perda da infectividade bacteriana (Arap, 2005).

O conceito simples de *phage display* tem sido refinado e adaptado por constituir a base de uma ampla escala de técnicas usadas nos estudos de interação molecular, produção de anticorpos sintéticos e evolução dirigida (Bernal & Willats, 2004). Apesar de ser uma técnica fácil, barata, rápida de montar e não requeira equipamento especial, a eficiência desta ferramenta consiste em sua habilidade para identificar regiões interativas entre proteínas e outras moléculas sem a necessidade de informações sobre a natureza da interação. Esta vantagem se traduz na conveniência com que tais bibliotecas podem ser selecionadas para ligantes alvo-específicos (Sergeeva *et al.*, 2006).

1.4.2.1 Estrutura do fago filamentososo

Os bacteriófagos filamentosos são um grupo de vírus que contêm como material genético DNA fita simples circular envolto por um longo capsídeo protéico cilíndrico. Os fagos filamentosos M13, f1 e fd são extensivamente estudados e infectam células bacterianas gram negativas que carregam o plasmídeo conjugativo F. Por causa da similaridade entre si e dependência do plasmídeo F para infecção, os fagos M13, f1 e fd são coletivamente referidos como fagos Ff (Webster, 1996).

O genoma inteiro do fago consiste de 11 genes. Um fago viável expressa cerca de 2700 cópias da proteína codificada pelo gene 8 (g8p ou pVIII, uma proteína com 50 resíduos de aminoácidos, conhecida como a proteína majoritária do capsídeo) que recobre o corpo do fago (Figura 7). Na extremidade proximal, estão presentes três a cinco cópias da proteína de adsorção codificada pelo gene 3 (g3p ou pIII, uma proteína com 406 resíduos de aminoácidos e uma das três proteínas minoritárias do capsídeo do fago filamentososo) e cinco cópias da proteína codificada pelo gene 6 (g6p ou pVI, com 112 resíduos de aminoácidos). Na extremidade distal, encontram-se as proteínas codificadas correspondentes aos genes VII (g7p ou pVII, com 33 resíduos de aminoácidos) e IX (g9p ou pIX, com 32 resíduos) (Webster, 2001).

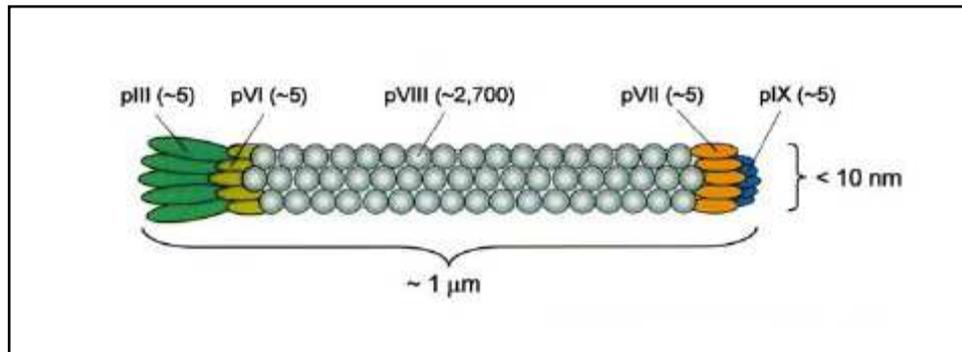


Figura 7. Representação esquemática do bacteriófago M13 (Willats, 2002)

Fagomídios são plasmídios que além da origem de replicação da *E. coli* foram desenhados para conter a origem de replicação derivada de fagos filamentosos, um gene codificador de uma das proteínas do capsídeo viral, apropriados sítios de clonagem e um gene de resistência a antibiótico (Scott and Barbas, 2001). Entretanto, eles são deficientes da estrutura necessária para gerar um fago completo (Fernandez *et al.*, 2008). Fagomídios, por terem duas origens de replicação, podem ser propagados como plasmídios ou, alternativamente, empacotados como fago M13 recombinante com a ajuda do fago auxiliar (helper) (tais como, M13KO7 ou VCSM13), que contém uma origem levemente defectiva de replicação, e fornece todas as proteínas requeridas para gerar um fago completo (Sergeeva *et al.*, 2006).

1.4.2.2 Ciclo de vida

O fago filamentoso não produz um ciclo lítico de infecção em *E. coli*, porém, preferencialmente, induz um estado no qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise. A infecção é iniciada pelo ataque da proteína do gene 3 (g3p) ao *pilus* sexual codificado pelo plasmídeo F da *E. coli*. Apenas o DNA circular fita simples do fago entra na célula bacteriana, onde ele é convertido, pela maquinaria de replicação celular do hospedeiro em forma replicativa (RF), no plasmídeo dupla fita. A forma replicativa, por meio da replicação do círculo rolante, origina o DNA fita simples (ssDNA) que comanda a expressão das proteínas do fago. A progênie do fago é reunida pelo empacotamento do DNA fita simples dentro das proteínas do capsídeo e extrusada pela membrana bacteriana para o meio (Azzazy & Highsmith, 2002).

A escolha de qual proteína do capsídeo viral será utilizada para ser fusionada com a proteína exógena é uma etapa importante, visto que favorece a amplificação do sinal de detecção. A proteína pVIII, por apresentar vasto número de cópias, possibilita a formação de maior quantidade de proteínas de fusão com grande número de pequenas proteínas, que serão apresentadas na superfície do fago. No entanto, estes insertos de DNA devem codificar peptídeos pequenos, de até cinco aminoácidos, inseridos entre a seqüência líder e a porção estrutural de pVIII, devido interferirem na viabilidade do fago e estabilidade das proteínas fusionadas. A proteína pIII, embora representada por apenas cinco cópias, é estruturalmente uma proteína maior que, por sua vez, comporta ligação com um menor número de proteínas, todavia de tamanho maior (Willats, 2002).

As partículas de fago podem incorporar tanto a proteína pIII derivada do fago auxiliar, como a proteína de fusão (polipeptídeo – pIII), codificada pelo fagomídeo. A relação proteína de fusão (polipeptídeo-pIII) : pIII selvagem, pode variar entre 1:9 a 1:1000, dependendo do tipo de fagomídeo, condições de crescimento, natureza do polipeptídeo fusionado a pIII e ao grau de risco de clivagem proteolítica desta proteína de fusão (Azzazy & Highsmith, 2002).

1.4.2.3 Construção e varredura da biblioteca apresentada em fagos

A utilização do fagomídeo na biblioteca apresentada em fagos implica no estudo dos diversos vetores disponíveis para a escolha daquele que agregue características mais interessantes. O fagomídeo pComb3X é um vetor de segunda geração desenhado para contornar problemas, referentes a estabilidade, encontrados no vetor pComb3 original. O vetor pComb 3X possui 2 caudas de peptídeos na porção carboxil da proteína apresentada, a cauda hexa-histidina que facilita a purificação de proteínas em cromatografias de afinidade com metais imobilizados e a cauda de epitopo da hemaglutinina do vírus influenza, que facilita a detecção da proteína pelo uso de anticorpo anti-HA, disponibilizado comercialmente. Outra característica deste vetor reside no fato do códon de terminação (códon âmbar) ser inserido na junção entre a região codante do epitopo da hemaglutinina e o gene III. Isto permite a expressão da proteína solúvel em cepas de bactérias não supressoras sem a excisão do fragmento do gene III (Scott and Barbas III, 2001).

A qualidade da biblioteca é importante para seu desempenho. O controle de qualidade da biblioteca pode ser alcançado pelo zelo com os seguintes parâmetros: (i) número de clones cujo fagomídeo exibe o inserto desejado, (ii) número de clones expressando fagos carregando o inserto desejado, e (iii) número de clones expressando o inserto solúvel. Estes parâmetros podem ser assegurados por uma diversidade de métodos, tais como a varredura por PCR dos clones individuais (para detectar a presença do inserto) e por análise de *Dot blot* (para detectar ambos os fagos, apresentando o inserto e o inserto solúvel, produzidos pela varredura dos clones). Os clones positivos podem ser posteriormente caracterizados pela amplificação do inserto por PCR e seqüenciamento do DNA (Azzazy & Highsmith, 2002).

O número de cópias de proteínas expressas, portanto, depende da proteína do capsídeo viral escolhida para ser fusionada, do vetor usado (fago ou fagomídeo) e, caso o sistema de fagomídeo seja selecionado, a escolha do fago auxiliar. Um refinamento de alguns sistemas de *phage display* envolve a inserção de um códon de terminação âmbar entre as seqüências codantes da proteína do capsídeo e da proteína alvo apresentada. Isto permite que uma forma solúvel (ou seja, fago “desligado”) de uma proteína estranha possa ser produzida, caso o fago seja propagado em apropriada cepa não supressora de bactéria hospedeira. (Willats, 2002).

1.4.2.4 Procedimento de seleção (*biopanning*)

O método de investigação por *phage display* pode ser prontamente modificado pela manipulação das condições de seleção e estringência. As bibliotecas construídas nos fagos são apresentadas ao ligante alvo ou receptores que devem estar imobilizados num suporte sólido. O procedimento de seleção (Figura 8), também denominado *biopanning* consiste de sucessivas etapas de ligação do fago ao ligante imobilizado; lavagem dos fagos que não reconheceram o ligante, portanto, não ficaram retidos no suporte; eluição dos fagos retidos e amplificação por meio de infecção de células *E. coli*.

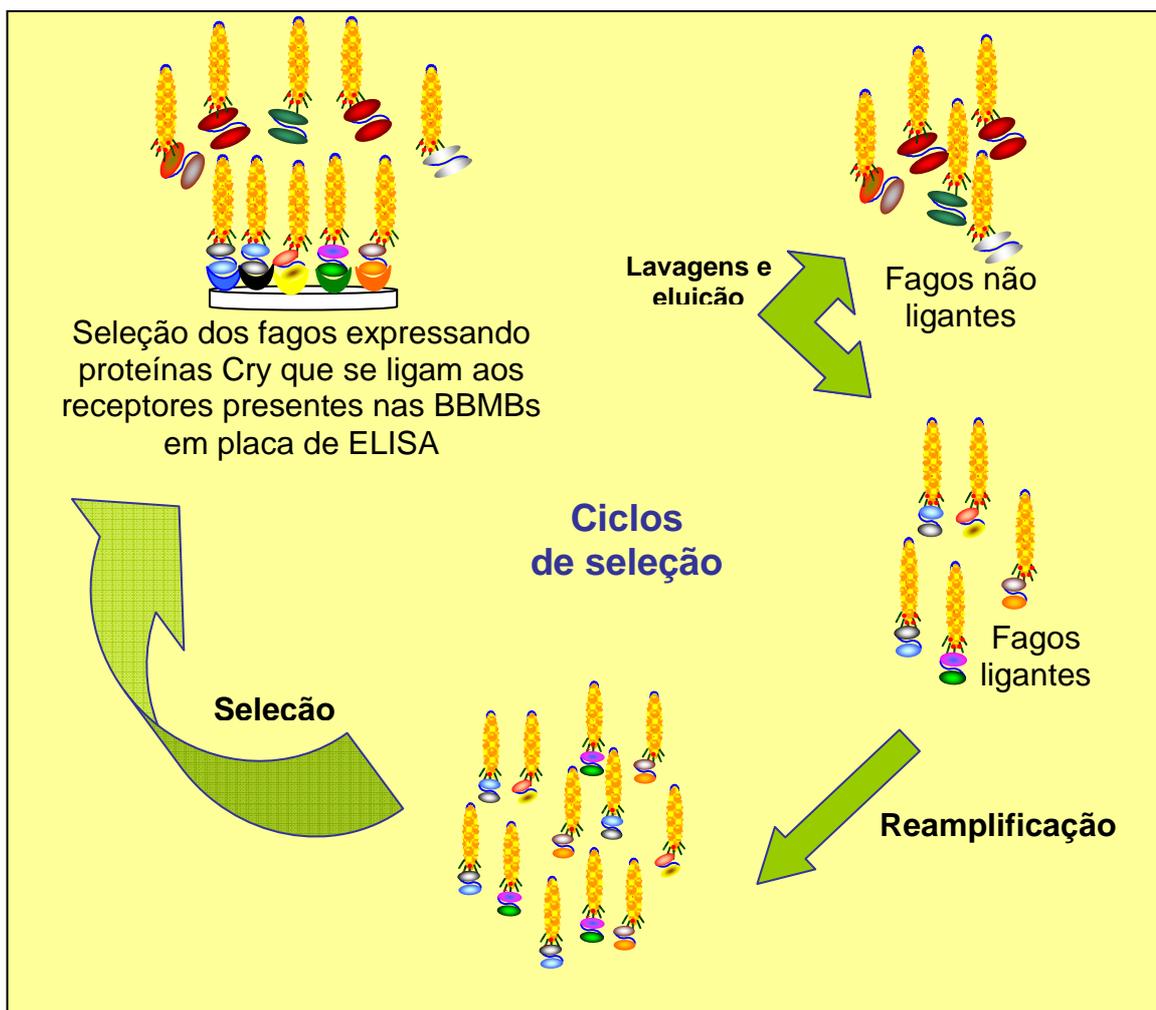


Figura 8. Representação esquemática dos ciclos de seleção da técnica de Phage display (Lima, 2005)

De sorte que, a originalmente bastante diversa população de fagos é crescentemente enriquecida com fagos propensos a ligarem-se ao alvo em questão. Em sua maioria, as diversas bibliotecas de *phage display*, possivelmente, contêm clones com afinidade para algum alvo específico. Alguns podem ser fortes ligantes com baixas especificidades, outros o inverso. Se a lavagem é muito estridente, logo altamente específica, ligantes fracos podem ser perdidos. Caso a lavagem não seja tão estrigente, pode haver preponderância de fortes ligantes com baixa especificidade na população de clones selecionados. *Phage display* é uma técnica altamente flexível cuja seleção pode ser realizada *in vivo* ou *in vitro* (Willats, 2002).

2. Justificativa

Diferentes estratégias biotecnológicas vêm sendo desenvolvidas para auxiliar no controle de insetos-praga, de grande importância para diferentes *commodities* no Brasil. Mesmo sendo estudados e utilizados como biopesticidas há mais de 50 anos e com claras indicações de serem menos impactantes ao meio ambiente do que os agroquímicos e não prejudiciais ao ser humano, os produtos a base de *Bt* nunca ocuparam um lugar de total destaque no mercado de vendas de inseticidas (Betz, 2000). Neste contexto, a busca de novas cepas de *Bt* com alta atividade tóxica e diferentes especificidades a insetos é de extrema importância tanto para a produção de novos biopesticidas como para a utilização destas estirpes como fonte de genes para a geração de plantas geneticamente modificadas, resistentes a insetos. De modo geral, todos os genes para as toxinas Cry descritos estão patenteados, o que dificulta e encarece o programa de melhoramento de plantas devido ao pagamento de taxas tecnológicas. Dessa forma, a estratégia utilizada neste estudo, combinando as técnicas de DNA *shuffling* e *phage display* é vantajosa, pois possibilita a seleção de novas toxinas, que poderão ser utilizadas em programa de melhoramento da cana-de-açúcar, sem a necessidade de pagamentos de taxas tecnológica internacionais.

O estudo visa à produção e seleção de genes, codificadores de proteínas (δ -endotoxinas) tóxicas para a broca-gigante (*T.l.licus*), praga considerada de maior importância para a cultura da cana-de-açúcar, especialmente para a região Nordeste, em virtude dos danos que causa e da dificuldade de seu controle. O trabalho consistiu na aplicação de uma estratégia molecular na prospecção de genes que incluiu a seleção de variantes melhoradas, mais específicas e ativas, através do uso de biblioteca combinatória do gene *cry1a12synth* utilizando as técnicas de DNA *shuffling* e *phage display*. Variantes selecionadas e validadas quanto à capacidade de codificar moléculas ativas, serão posteriormente utilizadas na transformação de cultivares de cana-de-açúcar.

3. Objetivo Geral

Construir uma biblioteca de variantes do gene *cry1la12synth* por meio de recombinação *in vitro* utilizando as técnicas de *DNA shuffling* e *phage display*, bem como selecionar variantes codificadoras de toxina Cry1la12synth com atividade entomotóxica diferenciada contra larvas de broca-gigante.

3.1 Objetivos específicos

- ◆ Obter as BBMVs (*brush border membranes vesicles*) de larvas de *T.l.licus*
- ◆ Recombinar *in vitro* o gene *cry1la12synth* mediante uso da técnica de *DNA Shuffling*
- ◆ Construir biblioteca combinatória de variantes da toxina Cry1la12synth apresentadas na superfície de fagos filamentosos
- ◆ Subclonar a população de variantes do gene *cry1la12synth* em vetor pComb3X
- ◆ Selecionar variantes do gene *cry1la12synth* com afinidade pelos receptores presentes na membrana do intestino das larvas da broca gigante
- ◆ Seqüenciar e analisar as variantes selecionadas
- ◆ Estudar o efeito das mutações na toxicidade das moléculas por meio de modelagem molecular por homologia da proteína Cry1la12synth e suas variantes
- ◆ Expressar as variantes de *cry1la12synth* em sistema heterólogo de fago
- ◆ Avaliar a atividade inseticida das toxinas Cry recombinantes contra larvas de broca gigante em bioensaios

4. Materiais

4.1 Linhagem bacteriana

Foi utilizada a linhagem bacteriana *E. coli* XL-1 Blue para as etapas de transformação, produção de partículas virais, amplificação e seleção de fagomídeos.

4.2 Fagomídio

O fagomídio utilizado foi o pComb3X / f(-) / 4,5kb contendo as seqüências promotoras *plac*, *ori* ColE1, *ori* f1, *Ap^R*. Apresenta um códon âmbar inserido entre sítio de restrição da enzima Sfil na extremidade 3' e a extremidade 5' do gene III, o que permite a expressão de proteína solúvel, em linhagens não supressoras, sem a excisão do fragmento do gene III. Possui uma seqüência codificadora para parte da proteína III de bacteriófagos filamentosos (aminoácidos 230 a 460). Contém ainda uma cauda constituída de seis histidinas, inserida após o sítio de clonagem do gene, para facilitar a purificação em coluna de níquel ou detecção com anticorpo anti-*his tag*. E também, uma região composta de dez resíduos do epitopo da hemaglutinina, inserida após a extremidade 3' da cauda de histidina, para detecção universal com anticorpo anti-HA (Scott & Barbas III, 2001).

O pComb3X foi gentilmente cedido pela Dra. Andréa Maranhão, pesquisadora do Departamento de Biologia Celular/UnB.

4.3 Fago auxiliar

Foi utilizado o bacteriófago VCSM13, derivado do bacteriófago M13. A sua preparação seguiu o protocolo descrito por Barbas (2001).

4.4 Larvas de broca-gigante

As larvas, em ínstares iniciais, de lagartas de *Telchin licus licus* utilizadas nos experimentos foram coletadas em canaviais da Usina Triunfo, na cidade de Maceió/AL, acondicionadas em placas de petri contendo dieta apropriada, acomodadas em caixa de papelão e enviadas para o laboratório via transporte aéreo.

4.5 Oligonucleotídeos iniciadores

Todos os oligonucleotídeos utilizados no trabalho estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 1. Seqüência e aplicação dos oligonucleotídeos iniciadores sintéticos

Nome	Seqüência	Utilização
Cry1a12synthFOR	5' CCC GGC CCA GGC GGC CAT GAA ACT CAA GAA C_3' 31pb	Para amplificação do gene <i>cry1a12synth</i> , a partir da extremidade 5'. Contém sítio de restrição da enzima <i>Sfi</i> (em negrito), para subclonagem no vetor pComb3X
Cry1a12synthREV	5' CCG GCC GGC CTG GCC TTC GTA AGT AAC TTC 3' 30pb	Para amplificação do gene <i>cry1a12synth</i> , a partir da extremidade 3'. Contém sítio de restrição da enzima <i>Sfi</i> (em negrito), para subclonagem no vetor pComb3X
TLL3IF	5' TGT CAG GTC CCA ATA TAT CG 3' 20pb	Para amplificação da porção intermediária do gene <i>cry1a12synth</i> , a partir da extremidade 5'
TLL3IR	5' GTT CCG GTG TTG GTT CTC CT 3' 20pb	Para amplificação da porção intermediária do gene <i>cry1a12synth</i> , a partir da extremidade 3'
MMB4	5' GCT TCC GGC TCG TAT GTT GTG T3' 22pb	Para reação de sequenciamento das variantes do gene <i>cry1a12synth</i> clonadas no vetor pComb3X, a partir da extremidade 5'
MMB5	5' CGT TTG CCA TCT TTT CAT AAT 3' 21pb	Para reação de sequenciamento das variantes do gene <i>cry1a12synth</i> clonadas no vetor pComb3X, a partir da extremidade 3'

4.6 Meios de cultura

Todos os meios foram autoclavados a 120°C, por 20 minutos e conservados a temperatura ambiente até a utilização.

Meio SB (pH 7,0)

- 1% MOPS (3 (N-Morpholino) propanesulfonic acid)
- 3% Triptona
- 2% Extrato de levedura

Meio LB (pH 7,0)

- 1% Triptona
- 0,5% Extrato de levedura
- 1% NaCl

Meio LB agar (pH 7,0)

- 1% Triptona
- 0,5% Extrato de levedura
- 0,5% NaCl
- 1,4% Agar

Meio SOB

- 2% Triptona
- 0,5% Extrato de levedura
- 0,05% NaCl
- 1% v/v KCl-250 mM

Ajustar o pH para 7,0, autoclavar e quando esfriar, adicionar 10 ml de MgCl₂ – 1 M estéril

Meio SOC

Adicionar 1 mL Glicose – 1 M (estéril por filtração em 0.25 µm) a 50 ml de meio SOB – 20 mM

LB/MgSO₄ Soft Top Agar

Meio LB pH 7,0

MgSO₄ – 10 mM

7,2 g agar/L

Autoclavar

Manter a 45°C

4.7 Soluções e tampões

Tampão MET (para extração das BBMV's)

Manitol – 300 mM

EGTA – 5 mM

Tris – 17 mM, pH 7,5

Tampão DNase I

Tris-HCl – 50 mM pH7,5

MnCl₂ – 1 mM

BSA 0,1 mg/mL

Solução Stop (interrompe digestão com DNaseI)

70% Glicerol

75 mM EDTA

0,3% Azul de Bromofenol

Tris Buffer Saline (TBS) 1x – pH 7,5

Tris – HCl – 50 mM

NaCl – 150 mM

Phosphate Buffer Saline (PBS) 1x - pH 7,4

NaCl – 137 mM

KCl – 2,7 mM

Na₂HPO₄ – 12 mM

KH₂PO₄ – 1,2 mM

Phosphate Buffer Saline -T (PBS-T)

PBS adicionado de *tween* 20 a 0,05% (v/v)

Phosphate Buffer Saline – Bovine Serum Albumine (PBS-BSA) 3%

PBS 1X adicionado de albumina bovina sérica a 3% (p/v)

PEG 8000 / NaCl 5x

100 g PEG 8000 (Polietilenoglicol, com massa molecular aproximada de 8000)

15% NaCl – 2,5 M

Esterilizar por autoclavagem, 20 min em ciclo líquido de 15 psi.

4.8 Reagentes, enzimas e demais produtos

O fornecedor de cada produto encontra-se citado ao longo da metodologia.

5. Metodologia

5.1 Extração de intestinos de larvas de broca-gigante

As larvas foram individualmente abertas com o auxílio de tesoura e bisturi para extração dos intestinos. Este procedimento foi feito em placa de vidro sobre cuba de gelo para evitar a degradação de proteínas. Inicialmente, a larva é seccionada em sua parte posterior, seguida do corte da cabeça e posterior abertura do corpo da larva com tesoura. O intestino é separado, esvaziado e acondicionado em tubo corex 15 mL contendo 10 mL de tampão MET- pH 7,5 e 100 µL de PMSF-100 mM. Quando todos os intestinos foram extraídos, este material foi centrifugado a 2500 x g, por 5 min, a 10°C. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi novamente submetido ao mesmo tratamento e após duas lavagens, o precipitado foi recuperado, pesado, aliquotado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a - 80°C.

5.2 Extração das BBMV's (Brusher borders membrane vesicles - vesículas de membranas associadas à borda em escovadura da membrana do intestino)

Para extração das BBMV's do intestino médio de larvas de *T.l.licus*, nos segundo e terceiro instares, foi utilizado protocolo adaptado de Wolfersberger *et al.*, (1987). Os intestinos médios extraídos das larvas, na relação peso/volume de 1/10, foram solubilizados em tampão MET- pH 7,5 com adição de PMSF na concentração final de 1 mM, colocados em tubo corex de 30 mL. Foi adicionado igual volume de MgCl₂ - 24 mM e centrifugado a 2500 x g, por 15 min, a 4°C. Este procedimento foi repetido duas vezes, na segunda vez com metade do volume original. O sobrenadante foi coletado, transferido para tubo de ultracentrífuga e centrifugado a 18.000 rpm, por 35 min, a 4°C. O precipitado foi dissolvido com tampão MET- pH 7,5 e MgCl₂ - 24 mM, e centrifugado a 2500 x g, por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubo de ultracentrífuga e centrifugado a 18.000 rpm, por 35 min, a 4°C. Ao término da segunda ultracentrifugação, o precipitado foi ressuspenso em 300 µL de tampão TBS – pH 7,4, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em -80°C. A concentração protéica foi determinada conforme o método descrito por Bradford (1976), usando BSA como proteína padrão.

5.3 Obtenção do gene *cry1la12synth*

O gene *cry1la12* foi isolado da estirpe S811 de *Bacillus thuringiensis* (Grossi de Sá *et al.*, 2007) e, posteriormente, teve sua seqüência nucleotídica modificada, na intenção de favorecer o código genético de plantas ('codon usage'), assumindo então a denominação de *cry1la12synth*.

O gene *cry1la12synth*, contendo 1944 pb, foi sintetizado e inserido em vetor pBluescript II.

5.4 Digestão do vetor pBluescript e isolamento do gene *cry1ia12synth*

O vetor pBluescript contendo o gene *cry1la12synth* (1944 pb) foi digerido com as enzimas de restrição *Not* I e *Sal* I. Nesta reação, 5 µg do DNA do vetor foram digeridos com 20 U *Not* I [10 U/µL - Promega] e 40 U *Sal* I [20 U/µL - Biolabs], adicionados do tampão Buffer D -10X (Promega) e BSA [10 mg/mL], diluídos para a concentração final de 1X. Em seguida, a reação foi incubada a 37°C, por 16 h. Após incubação, as enzimas foram inativadas a 65°C, por 20 min. O material foi analisado em gel de agarose 1%, após eletroforese a 100 V por 90 min. A banda correspondente a aproximadamente 1944 pb foi cortada do gel e o DNA purificado utilizando o Kit GeneClean® II (Bio 101), segundo o procedimento recomendado pelo fabricante. Este procedimento foi repetido várias vezes para acumular massa.

5.5 DNA *shuffling*

A técnica foi desenvolvida de acordo com protocolos descritos em Stemmer (1994) e Zhao & Arnold (1997). A técnica consiste de duas etapas: (1) fragmentação do gene utilizado como substrato e (2) recombinação.

5.5.1 Fragmentação do gene *cry1la12shynth* com DNaseI

A técnica de DNA *shuffling* foi utilizada para obter uma população de variantes de *cry1la12synth*. Inicialmente, o gene *cry1la12synth* foi aleatoriamente digerido com a endonuclease DNaseI para obtenção de fragmentos entre 30 e 50 pb que foram

utilizados na posterior reação de recombinação por PCR. Foram utilizados 10 µg do DNA liofilizado de *cry1la12synth*, dissolvido em 80 µL do tampão DNaseI, e adicionados de 20 µL da enzima DNaseI na concentração de 12 U/mL. Esta reação foi incubada a 15°C, por 15 min, sendo interrompida pelo acréscimo de 5 µL de EDTA 0,5 M. A análise dos fragmentos foi feita em gel de agarose 2,5%, após eletroforese a 100 V, por 90 min. A purificação dos fragmentos gerados (30 a 50 pb) foi feita com o kit High Pure PCR Product Purification Kit® (Roche).

5.5.2 Recombinação dos fragmentos por PCR (Reação de Cadeia da Polimerase)

Nesta etapa, foram realizadas duas reações consecutivas de PCR. A primeira, sem adição dos oligonucleotídeos para que pudesse ocorrer recombinação de fragmentos. A segunda, com adição dos oligonucleotídeos específicos, para extensão e obtenção dos genes variantes contendo o mesmo tamanho do gene original. Visando a clonagem posterior em vetor fagomídeo, as seqüências dos oligonucleotídeos (*Cry1la12synthFOR* e *Cry1la12synthREV*) citados em materiais, foram flanqueadas com os sítios de restrição da enzima *Sfi* I.

Na mistura para primeira PCR, foram utilizados 10 µL do produto de digestão com DNaseI, acrescido da mistura de dNTPs [0,4 mM], MgSO₄ [1 mM], tampão da *Taq Platinum High Fidelity 5X*, e 2.5 U da enzima *Platinum Taq DNA Pol High Fidelity* (Invitrogen). O volume final de reação foi de 25 µL. As condições utilizadas para a amplificação foram desnaturação a 95°C por 2 min, seguida de 44 ciclos (95°C por 2 min, 42°C por 1 min e 72°C por 1 min, acrescido em 5 s a cada ciclo) e extensão final a 72°C por 7 min.

Na segunda PCR consecutiva, foram utilizados 1,5 µL do produto da primeira PCR como molde, 0,8 µM de cada oligonucleotídeo, *Cry1la12synthFOR* e *Cry1la12synthREV*, 0,2 mM da mistura de dNTPs, 2 mM de MgSO₄, tampão 1X da *Platinum Taq DNA Pol High Fidelity* e 5 U da enzima *Platinum Taq DNA Pol High Fidelity*. O volume final da reação foi de 100 µL. A programação utilizada constou de desnaturação a 95°C por 2 min, seguida de 10 ciclos (95°C por 30 s, 42°C por 1 min e 72°C por 1 min), 14 ciclos (95°C por 1 min, 42°C por 1 min e 72°C por 1 min, acrescido em 20 s a cada ciclo) e extensão final a 72°C por 10 min.

O produto da segunda PCR foi analisado em gel de agarose 1%. O fragmento de de aproximadamente 1944 pb contendo o produto de recombinação (população de

variantes) foi excisado do gel e purificado com o Kit GeneClean[®] II (Bio 101). O fragmento de DNA foi subclonado no vetor pComb 3X e este, utilizado para a construção da biblioteca.

5.6 Subclonagem do gene *cry1la12synth* e dos variantes de *cry1la12synth* no fagomídeo pComb 3X

O vetor pComb 3X e o DNA purificado do gel correspondendo a população de variantes do gene *cry1la12synth* (produto do DNA shuffling) foram submetidos à digestão com enzima de restrição *Sfi*I. Posteriormente, a população de variantes contendo as extremidades coesivas em *Sfi*I, foi inserida no vetor pComb 3X utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) [®].

Na reação de digestão, foram utilizados 10µg de DNA do vetor, 1X do tampão Neb 2 Buffer, BSA 1X e enzima *Sfi*I [40 U] (Biolab's). O volume final de reação foi de 100 µL. As mesmas condições de reação foram utilizadas para digerir as variantes de *cry1la12synth*. As reações foram incubadas em termociclador (modelo) a 50°C, por 16 h. Os fragmentos digeridos foram excisados do gel de agarose 1%, e purificados com o Kit GeneClean[®] II (Bio 101). Esta reação de digestão foi repetida várias vezes para acumular material de ambos os fragmentos.

Na reação de ligação, as variantes de *cry1la12synth* e o vetor pComb 3X, na proporção [1 : 3,5], acrescidos de tampão da enzima T4 DNA Ligase 1X e enzima T4 DNA Ligase [1 U/µL] (Invitrogen) foram incubados em banho de água a 16-18°C, por 16 h. O volume final de reação foi de 200 µL.

O vetor obtido foi utilizado para transformação, por eletroporação, de células de *E. coli* XL-1 Blue dando início a construção da biblioteca combinatória tipo *phage display*.

5.7 Phage display

A metodologia de *phage display* é eficiente para seleção (*biopanning*) e amplificação de fagos dispostos em biblioteca fusionados a inúmeras variantes do alvo desejado. O procedimento de *biopanning* foi realizado segundo Barbas III *et al.*, (2000) e consiste de quatro etapas, ligação dos fagos ao ligante imobilizado em placa, lavagem dos fagos inespecíficos, eluição dos fagos retidos e de alta afinidade por

eluição ácida e amplificação dos fagos selecionados por novos ciclos de infecção de cultura bacteriana.

A metodologia citada foi aplicada para seleção de variantes do gene *cry1la12synth*, geradas por DNA *shuffling*. As proteínas das vesículas de membranas (BBMVs), extraídas do intestino médio da broca gigante da cana-de-açúcar, foram utilizadas como ligantes.

O procedimento utilizado neste trabalho foi dividido em três etapas que consistiram da montagem da biblioteca combinatória, ciclo de cultivo dos fagos e o *biopanning* (seleção) de genes variantes para *cry1la12synth* utilizando BBMVs de broca gigante.

5.7.1 Transformação de células *E. coli* XL1-Blue, por eletroporação (adaptado de Rader *et al.*, 2000) e construção da biblioteca combinatória

O produto de ligação (descrito no item 5.6), precipitado com acetato de sódio 3 M pH 5,2 e etanol 100%, lavado com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspenso com 15 µL de H₂O foi utilizado para a transformação de células *E. coli*.

Foram realizadas cinco transformações, com 3 µL do sistema de ligação sendo misturado suavemente a 60 µL de células quimicamente competentes. Na seqüência, a mistura foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm, previamente resfriada em gelo e submetida à eletroporação, com os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kVolts, 25 µFD e 200 Ω (Ohms). Após a eletroporação, as células foram recuperadas, imediatamente, com 3 mL de meio SOC, transferidas para um tubo Falcon de 50 mL estéril e incubadas a 37°C, por 1 h, sob agitação constante de 250 rpm. Em seguida, o produto das cinco transformações, totalizando 15 mL, foi reunido em erlenmeyer de 125 mL. Deste material, foi retirada uma alíquota de 200 µL para ser serialmente diluída e plaqueada em meio LBagar, contendo carbenicilina [50 µg/mL], para contagem e cálculo do tamanho da biblioteca. Ao material restante, foi adicionado 30 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, 9 µL de carbenicilina [100 mg/mL] e 90 µL de tetraciclina [5 mg/mL], seguido de incubação a 37°C, por 1 h, sob agitação de 250 rpm. Na seqüência, foi adicionado 13,5 µL de carbenicilina [100 µg/mL] e a cultura foi incubada por 1 h, nas condições mencionadas acima. Acrescentou-se ainda 155 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, 77,5 µL de carbenicilina [100 mg/mL], 310 µL de tetraciclina [5 mg/mL] e 2 mL de fago auxiliar [VCSM13 – 10¹² pfu/mL]. As células foram incubadas a 37°C,

por 2 h, sob agitação de 250rpm. Após 2 h, foi adicionado 280 µL de canamicina [50 mg/mL] e a cultura foi novamente incubada a 37°C, sob agitação de 250 rpm, por aproximadamente 16 h.

5.7.2 Preparação e cultivo dos fagos (adaptado de Barbas III et al., 2001)

Foram retiradas quatro alíquotas de 1 mL do cultivo (item 5.7.1) e centrifugadas a 6.000 rpm, por 20 min. O sobrenadante foi coletado e guardado a 4°C e o sedimento estocado a -20°C, para utilização em futuras preparações plasmidiais.

O restante do cultivo foi centrifugado a 4.000 rpm, por 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo frasco corex e os fagos foram precipitados com 40 mL de PEG 8000/NaCl 2,5 M, durante incubação em banho de gelo por 30 min. Após centrifugação a 4.000 rpm, por 80 min, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo os fagos precipitados, invertido sobre papel toalha, por 10 min. O sedimento foi ressuspensão em 1 mL de solução TBS/BSA 1% (p/v), e após centrifugação a 12.000 rpm, por 5 min, a 4°C, o sobrenadante, contendo as partículas virais, foi transferido para um microtubo e mantido a 4°C.

Visando a re-amplificação dos fagos pela infecção da cultura bacteriana, 5 µL de células *E.coli* eletrocompetentes foram adicionadas a 5 mL de meio SB pré-aquecido e incubadas a 37°C, sob agitação constante de 250 rpm, até atingir a D.O._{600nm} aproximada de 1,0.

5.7.3 Procedimento de seleção dos variantes do gene *cry11a12synth* (biopanning) (adaptado de Barbas III et al., 2001)

Em placa de microtitulação, dois poços foram sensibilizados com 100 µg/poço de BBMV's extraídas de broca gigante e diluídas em tampão TBS, a placa foi incubada a 4°C, em geladeira, por 16 h. Após este período, a placa foi incubada a 37°C, em estufa, por 1h. Cada um dos poços foi lavado com 150 µL de PBS-Tween 0,1% e, em seguida, foi adicionado 150 µL de BSA-3% em TBS, com o objetivo de bloquear ligações inespecíficas na superfície dos poços. A placa foi incubada a 37°C, por 1 h. A solução de bloqueio foi descartada, os poços foram lavados por três vezes com 150 µL de PBS-Tween 0,1%. Adicionou-se 100 µL da preparação de fagos, obtido no item 5.7.2. A placa foi incubada a 37°C, por 2 h. Depois da incubação, foram realizadas

lavagens nos poços (cinco vezes no primeiro ciclo, e progressivamente aumentado nos ciclos seguintes), com adição de 150 µL de PBS-Tween 0,1%, visando em cada ciclo, a eliminação dos fagos inespecíficos. Os fagos retidos na placa foram eluídos com 100 µL do tampão ácido Glicina-HCl 0,1 M pH 2,2, e neutralizados com 12 µL de Tris-base 2 M. Para re-amplificação dos fagos eluídos, uma alíquota de 106 µL foi utilizada para infectar 2mL de cultivo de *E. coli* XL-1 *Blue* competente, em fase *log* de crescimento. O cultivo foi incubado a temperatura ambiente, por 15 min. Depois, a cultura foi transferida para um tubo falcon de 50 mL e foram adicionados 6 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, 320 µL de Glicose 50%, 1,6 µL de carbenicilina [100 mg/mL] e 12 µL de tetraciclina [5 mg/mL]. Deste cultivo, foi retirada uma alíquota de 200 µL (para posterior plaqueamento e cálculo do título de saída, *output*) e o restante foi incubado a 37°C, por 1 h, sob agitação de 250 rpm. Após incubação, foi acrescentado 2,4 µL de carbenicilina [100 mg/mL] e a cultura foi novamente incubada, sob as mesmas condições, por mais 1 h. Depois, os 8 mL de cultivo foram transferidos para um erlenmeyer de 500 mL, contendo 91 mL de meio SB pré-aquecido, 1 mL de fago auxiliar VCSM13 [10^{12} pfu/mL], 46 µL de carbenicilina [100 mg/mL], 184 µL de tetraciclina [5 mg/mL] e foi incubado a 37°C, por 1 h 30 min, sob agitação de 250 rpm. Depois deste tempo, foi adicionado ao cultivo 70 µL de canamicina [100 mg/mL] e a cultura foi incubada a 37°C, durante aproximadamente 16 h, sob agitação de 250 rpm. O título de entrada (*input*), representa o número de fagos que foi posto em contato com o ligante (BBMVs) a cada ciclo. O título de saída (*output*), o número de fagos eluídos (dos ligantes BBMVs, adsorvidos à placa) que foram selecionados em cada ciclo. A titulação dos fagos foi monitorada pela contagem de colônias bacterianas crescidas (ufc – unidades formadoras de colônia), em meio LBagar contendo carbenicilina [100 µg/mL] após incubação a 37°C, por 16 h. O ciclo apresentando o maior número de colônias bacterianas é indicado como o ciclo onde ocorreu o enriquecimento dos fagos específicos.

5.8 PCR de colônia

Os clones isolados do ciclo indicativo de maior enriquecimento de fagos específicos foi analisado quanto à integridade do gene utilizando PCR de colônia. Na reação, o DNA de cada clone foi individualmente adicionado no microtubo contendo os oligonucleotídeos, Cry1Ia12synth FOR [0,8 µM] e Cry1Ia12synth REV [0,8 µM], mistura

de dNTPs [0,4 mM], MgSO₄ [1,5 mM], tampão da *Taq DNA Pol* [1X] e enzima *Taq DNA Pol* [1,5 U]. O volume final da reação foi de 20 µL. A programação utilizada foi desnaturação a 95°C por 5 min, seguida de 25 ciclos (95°C por 45 s, 42°C por 1 min e 72°C por 1 min 30 s) e extensão final de 72°C, por 10 min. O material foi analisado em gel de agarose 1%, após eletroforese a 100 V por 90 min.

5.9 Expressão das variantes em sistema de fago

Os genes variantes selecionados por PCR de colônia quanto à integridade do gene (1944 pb) do ciclo de seleção com maior enriquecimento de fagos específicos foram utilizados para inoculação e expressão no sistema fago utilizando o fago auxiliar VCSM13.

As colônias selecionadas foram pré-inoculadas em meio SB contendo carbenicilina [100 µg/mL] e incubadas a 37°C, sob agitação de 200 rpm, por 16 h. No dia seguinte, foi adicionado meio SB, fago auxiliar VCSM13 e os antibióticos carbenicilina [100 µg/mL], tetraciclina [5 µg/mL] e canamicina [100 µg/mL] como agentes seletivos. Em seguida, o cultivo foi incubado a 37°C, sob agitação de 200 rpm, durante 16 h. Após incubação durante a noite, o meio de cultura contendo os fagos de fusão foi centrifugado a 4.000 rpm, por 20 min, a 10°C. O sobrenadante foi coletado, acrescido de PEG 5X-NaCl e incubado em banho de gelo por 30 min. Depois, foi centrifugado a 6.000 rpm, por 1 h, a 10°C. O sedimento foi ressuspensão em 50 µL de TBS e centrifugado a 12.000 rpm, por 5 min a 10°C. O sobrenadante contendo os fagos de fusão foi coletado, transferido para um novo tubo e armazenado a 4°C, para ser utilizado posteriormente nos ensaios de imunodeteção e de atividade.

5.10 Análise da expressão das variantes do gene *cry1a12synth* utilizando imunodeteção (Dot blot)

No ensaio de imunodeteção, foram aplicados 5 µL do cultivo de expressão contendo os diferentes variantes sobre uma membrana de nitrocelulose Hybond™ C Extra (Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada com solução de BSA-3% em TBS e incubada a 4°C, durante a noite. Após o bloqueio, a membrana foi lavada e incubada com o anticorpo primário (Santa Cruz Biotechnology) Anti-HA IgG produzido em coelho (diluído 1:1500 em PBS), por 2 h, a temperatura ambiente. Depois, a

membrana foi lavada três vezes com PBS contendo Tween 20 - 0,05% e incubada com o anticorpo secundário (Sigma), Anti-IgG de coelho, produzido em cabra, conjugado com fosfatase alcalina diluído em PBS (1:1000), por 1 h a 37°C e seguida de três lavagens com PBS contendo 0,05% de Tween 20.

Para revelar a membrana, foi utilizado o kit AP Conjugate Substrate[®] (Bio-Rad), conforme procedimento recomendado pelo fabricante. A reação foi interrompida pela adição de água. Foram utilizados como controles positivo e negativo, a proteína contendo epitopo da hemaglutinina e o fago auxiliar VCSM13, respectivamente. A identificação dos variantes expressos foi possível pela comparação com o sinal detectado pelos controles.

5.11 Análise da expressão das variantes do gene *cry1la12synth* utilizando ensaio de imunodeteção por Elisa

Visando a padronização nos bioensaios foi determinada a concentração das proteínas recombinantes utilizando a técnica de Elisa (*Enzyme linked immuno sorbent assay*). Foi utilizado o anticorpo policlonal anti-Cry1I, produzido em coelho, pela equipe do nosso laboratório.

Em placa de microtitulação, os fagos de fusão foram diluídos (1:100, 1:1.000, 1:5.000, 1:10.000 e 1:20.000), em triplicata, para sensibilizar os poços da placa. Como controle positivo foi utilizado a proteína Cry1Ia12, previamente quantificada, diluída em triplicata com diferentes concentrações (8 ng, 4 ng, 2 ng, 1 ng, 0,5 ng, 0,25 ng, 0,125 ng e 0,0626 ng). Como controle negativo, o fago contendo o pComb3X sem proteína de fusão, diluído nas mesmas condições anteriormente descritas para os fagos de fusão. A concentração da proteína recombinante foi estipulada pela subtração dos valores obtidos para o controle negativo em relação aos fagos fusionados.

A placa foi incubada a 4°C, em geladeira, por 16 h. Depois, a placa foi bloqueada com solução de BSA-3% em TBS contendo Tween 20 - 0,05%, por 4 h, a temperatura ambiente. Os poços foram lavados 3 vezes com TBS-T e incubados com o anticorpo anti-Cry1I diluído 1:1000 com solução de BSA-1% em TBS contendo Tween 20 - 0,05%, por 16 h, a 4°C.

Após incubação, os poços foram lavados por 3 vezes com TBS-T 0,05% e incubados com o anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase diluído 1:1000 com solução de BSA-1% em TBS contendo Tween 20 - 0,05%, por 2 h, a temperatura

ambiente. Após este período, foram feitas três lavagens com TBS-T 0,05% e a revelação foi feita com solução TMB (TMB Peroxidase EIA Substrate Kit[®], Bio Rad), conforme instruções do fabricante. A reação foi interrompida com adição de H₂SO₄ -1 N e a absorbância foi medida em leitor de Elisa Benchmark Plus[®] - Bio Rad, a 405 nm.

5.12 Bioensaios

Para avaliar a toxicidade dos fagos de fusão expressando a toxina original Cry1Ia12synth e suas variantes, foram realizados bioensaios em placas de microtitulação de 96 poços. Em cada poço, foi depositado um tecido esponjoso de 1cm² que serviu como suporte para depositar 50 µL da dieta misturada com 10 µg/mL de fagos de fusão expressando a toxina original e suas variantes. Após a distribuição da dieta contendo as variantes e da dieta livre de toxinas, espécimes de larvas neonatas de *T.l.licus* foram individualmente colocadas nos poços da placa.

Cada tratamento consistiu de uma variante fusionada ao fago, oferecidos as larvas, e foi repetido 4x, cada repetição continha 10 larvas.

As placas de petri contendo as larvas foram mantidas em câmara de crescimento controlado, com parâmetros constantes de temperatura a 28±1°C, umidade relativa de 80±10% e fotoperíodo de 12 h. Para o tratamento do controle negativo, apenas a dieta foi fornecida. Após 4 dias, o percentual de mortalidade foi calculado para cada tratamento. Análise estatística foi realizada para a comparação de médias do percentual de mortalidade pelo uso da ANOVA e Teste de Tukey, a um nível de probabilidade de 5% (Cruz, 2001).

5.13 Seqüenciamento do DNA

As moléculas variantes que apresentaram significativa toxicidade sobre a broca gigante tiveram suas seqüências nucleotídicas determinadas em seqüenciador automático 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), localizado na Plataforma de Seqüenciamento de DNA do Cenargen.

Para seqüenciar as extremidades das moléculas variantes e suas porções intermediárias foram utilizados os primers MMB4 (senso), MMB5 (reverso) e TLL3IF (senso intermediário), TLL3IR (reverso intermediário), respectivamente. Nesta reação

foram utilizados 500-1000 ng de DNA plasmidial, 3,2 pmoles dos oligonucleotídeos iniciadores, num volume final de 6 µL.

Os oligonucleotídeos desenhados e utilizados neste trabalho foram previamente analisados pelo programa 'Oligotech' (<http://www.oligoset.com/analysis.php>), que informa a temperatura onde metade dos oligonucleotídeos está anelada, T_m (*melting temperature*), a ocorrência de *loops* e/ou homodímeros, bem como a energia necessária para romper estas estruturas indesejáveis.

As seqüências resultantes foram analisadas pelos programas "BLASTn" e "BLASTx" disponíveis no endereço eletrônico do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

A análise comparativa das seqüências nucleotídicas utilizando os genes variantes para toxina Cry1Ia12synth e o gene parental foi realizada pelo programa ClustalW, disponível no servidor Expasy (<http://www.expasy.org/>). O consenso entre as seqüências nucleotídicas, resultado da análise dos alinhamentos múltiplos do fragmento gênico da variante, foi obtida pelo programa 'Staden Package', acessível no endereço eletrônico (<http://staden.sourceforge.net/>).

5.14 Modelagem molecular

Inicialmente foi realizada uma busca de similaridades de seqüências com a seqüência de aminoácidos traduzida do gene *cry1Ia12synth*. Para a busca de seqüências homólogas foi utilizado o programa Blastp (Altschul *et al.*, 1997) e o banco de dados de estruturas de proteínas (PDB). O programa Muscle (http://phylogenomics.berkeley.edu/cgi-bin/muscle/input_muscle.py) (Edgard, 2004) gerou o alinhamento da seqüência da toxina Cry1Ia12synth com as seqüências escolhidas da busca com Blastp. Usando os recursos do programa Jalview (<http://circinus.ebi.ac.uk:6543/jalview/>) (Clamp *et al.*, 2004) o alinhamento foi manualmente arranjado para indicar regiões de deleções e/ou inserções de aminoácidos. As estruturas de cristal das endotoxinas Cry3Bb1 (1JI6 pdb; Galitsky *et al.*, 2001) e Cry8Ea1 (3EB7 pdb; Guo *et al.*, 2009), que apresentaram identidade de 36% e 45% com a toxina Cry1Ia12synth, respectivamente, foram escolhidas como moléculas moldes para a construção dos modelos tridimensionais das toxinas. O alinhamento final foi submetido ao programa Modeller versão 9.2 (Sali & Blundell, 1993).

A modelagem molecular foi feita de maneira interativa. O primeiro conjunto de vinte modelos construídos a base do alinhamento inicial foram analisadas pelas suas características estereoquímicas, incluindo os gráficos de Ramachandran, com o programa Procheck (Laskowski *et al.*, 1993), e pelas suas características de empacotamento favorável com o DOPE, um recurso disponível no programa Modeller. Trechos contendo aminoácidos em regiões desfavoráveis do gráfico Ramachandran e/ou que exibissem picos nos gráficos de DOPE (indicando empacotamento ruim) foram considerados de baixa qualidade. Nestas regiões, alinhamentos alternativos e/ou modos diferentes de modelagem das inserções e deleções foram testados a fim de conseguir o modelo da maior precisão possível. Modelos apresentando baixa qualidade foram melhorados após alteração manual no alinhamento obtido com o programa Muscle, aplicando os comandos do programa Jalview para manipulação. Novo alinhamento foi então, submetido ao Modeller, contendo alterações em alguns comandos do *script*. Finalmente, foi aplicada uma ferramenta para minimização de energia com o relaxamento das estruturas

As coordenadas atômicas do modelo da Cry1Ia12synth foram utilizadas como molde para se construir os modelos das toxinas variantes de 1 a 4.

6. Resultados

6.1 Extração das BBMV

A metodologia empregada para obtenção das proteínas das vesículas de membranas (BBMVs) do intestino médio de larvas de broca gigante possibilitou obter um extrato destes receptores que foram, posteriormente, utilizados como ligantes determinantes para obtenção de variantes com atividade entomotóxica melhorada para o inseto alvo, em experimento de seleção pela técnica de *Phage display*.

6.2 Aplicação e obtenção do gene *cry1la12synth*

Estudos prévios realizados, em nosso laboratório, por Grossi de Sá *et al.* (2007), revelaram alta atividade tóxica da proteína Cry1la12 em bioensaios realizados com *S. frugiperda* e *A. grandis*. A concentração encontrada para a mortalidade de 50% das larvas foi de 5 µg/mL para *S. frugiperda* e 230 µg/mL para *A. grandis*. Estes resultados, promissores para lepidópteros, estimularam o grupo a continuar os estudos com esta toxina. O gene *cry1la12* teve sua seqüência nucleotídica modificada (assumindo a denominação *cry1la12synth*) para favorecer o viés de códons de plantas e ulterior expressão na cana.

O vetor pBluescript contendo o gene *cry1la12synth* foi digerido com as enzimas de restrição *Not* I e *Sal* I, para liberação do fragmento gênico (1944 pb – figura 9) utilizado nos experimentos de fragmentação e recombinação do gene.

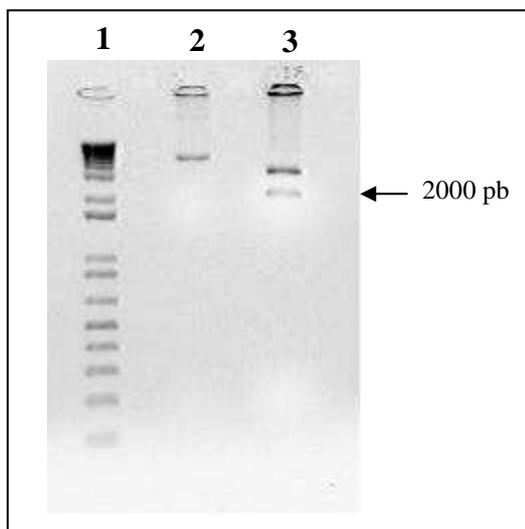


Figura 9. Digestão do vetor pBluescript com enzimas *Not* I e *Sal* I. Gel de agarose 1% mostrando o perfil de digestão enzimática. **1**- Marcador de 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen/Life Technologies). **2** - Vetor pBluescript intacto. **3** – Vetor pBluescript digerido mostrando fragmento de aproximadamente 2000 pb referente ao gene *cry1la12synth*.

6.3 Fragmentação do gene *cry1la12synth* e recombinação por DNA *Shuffling*

A DNaseI é uma endonuclease que digere fitas simples e dupla do DNA. Ela hidrolisa ligações fosfodiésteres produzindo mono e oligodeoxiribonucleotídeos com grupos fosfato 5' e hidroxila 3'.

A digestão do gene *cry1la12synth* com DNaseI, produziu fragmentos de 30-50 pb, que foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,5%, para sua separação. Estes fragmentos formaram uma banda difusa, de difícil visualização, indicativa de digestão total do gene, que por analogia com o marcador de massa de 100 pb utilizado no gel, foram recortados e purificados pelo kit High Pure PCR Product Purification Kit® (Roche).

Os fragmentos, de tamanhos variados (30-50 pb) foram recombinados por PCR, sem utilização de oligonucleotídeos iniciadores.

Em seguida, numa segunda PCR, uma alíquota (1,5 µL) do produto da reação anterior foi utilizada como molde de DNA. A reação ocorreu com a adição dos oligonucleotídeos iniciadores, contendo os sítios da enzima de restrição *Sfi* I e as seqüências para as extremidades 5' e 3' do gene original. Desta forma, foi amplificado uma população de variantes representada por um fragmento de aproximadamente 1944 pb (tamanho correspondente ao tamanho original – Figura 10). Estes fragmentos de DNA foram recortados do gel e purificados.

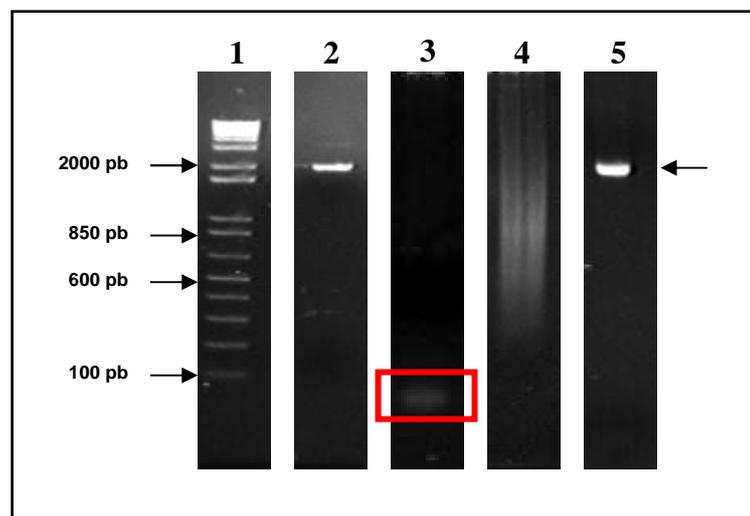


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose (2,5%), mostrando as várias etapas da técnica de DNA *shuffling* utilizada para obter a recombinação do gene *cry1la12synth*. **1** - Marcador de massa molecular 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen/Life Technologies). **2** - Gene *cry1la12synth* original (aproximadamente 2000 pb). **3** - Fragmentos de 30-50 pb, produto da digestão do gene *cry1la12synth* com a enzima DNaseI. **4** - Produto da recombinação dos fragmentos gênicos sem oligonucleotídeos iniciadores **5** - Produto final da recombinação dos fragmentos gênicos apresentando o mesmo tamanho do gene original.

6.4 Construção da biblioteca de variantes do gene *cry1la12synth*

As variantes geradas da recombinação dos fragmentos do gene *cry1la12synth*, assim como o fagomídeo pComb 3X foram digeridos com a enzima de restrição *Sfi* I gerando extremidades coesivas e possibilitando a ligação inserto / vetor (Figura 11).

O fagomídeo (Figura 12) foi utilizado na transformação da bactéria *E. coli* linhagem XL-1Blue, e produziu uma biblioteca de variantes de *cry1la12synth* contendo $1,97 \cdot 10^5$ ufc/mL.

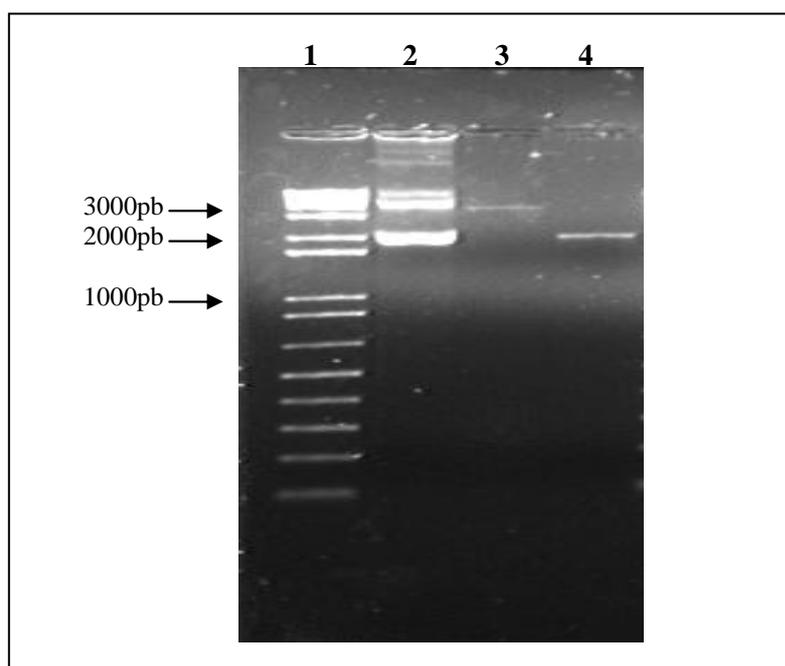


Figura 11. Análise do sistema de ligação entre fagomídeo e gene recombinante. Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. **1** – Marcador 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen/Life Technologies). **2** - Sistema de ligação entre fagomídeo pComb 3X e gene recombinante *cry1la12synth*. **3** – Fagomídeo pComb 3X digerido com *Sfi* I. **4** – Gene *cry1la12synth* digerido com *Sfi* I.

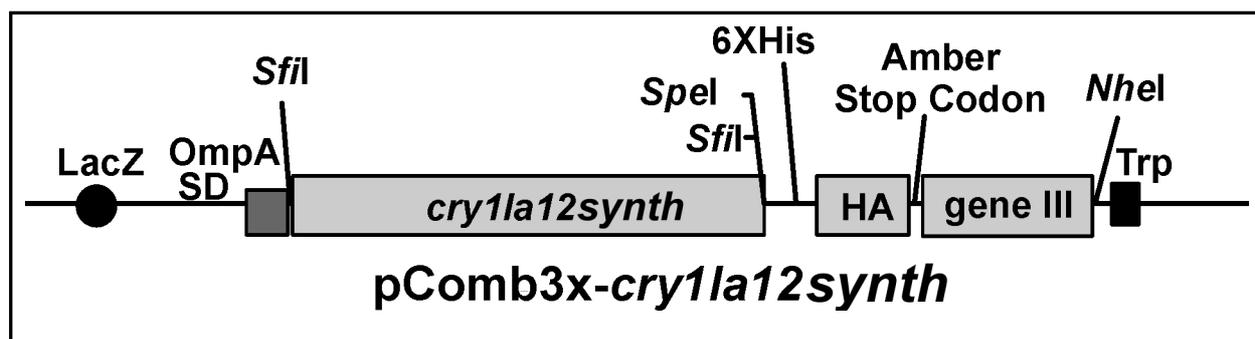


Figura 12. Representação esquemática do cassete de expressão da construção do fagomídeo pComb3X-cry1la12synth, para expressão da proteína Cry1la12synth apresentada na superfície do fago filamentosso M13. Construções similares contendo os insertos cry1la12synth recombinados foram construídos para apresentar as variantes de Cry1la12synth na superfície de partículas do fago M13. **LacZ.** Operon induzível. **SD.** Sítio (Shine Dalgarno) de ligação ao ribossomo que levam a separação de polipeptídeos que são dirigidos pelo peptídeo sinal pelβ para o periplasma. **OmpA.** Peptídeo sinal. **SfiI, SpeI e NheI.** Sítios de enzimas de restrição. **cry1la12synth.** gene a ser expresso em fusão com a proteína III do fago M13. **6xHis.** Seqüência codante de seis caudas de histidina. **HA.** Epitopo para imunodeteção por anticorpos anti-hemaglutinina. **Ambar stop codon.** Codon TAG de terminação da transcrição, o qual permite a produção de proteína heteróloga fusionada e livre de fusão. **gene III.** Região codante da proteína III do fago. **Trp.** Terminação da transcrição. Figura esquemática adaptada de Scott & Barbas, 2001.

6.5 Phage display

Os fagomídeos, contendo a pIII fusionada as variantes da toxina Cry recombinada, foram utilizados na transformação da bactéria *E. coli* XL-1 Blue. Após a transformação, as bactérias foram infectadas pelos fagos VCSM13 e, estes, passaram a expressar em seu capsídeo, as inúmeras variantes da toxina recombinada. Os fagos, apresentando a proteína de fusão, foram liberados para o sobrenadante da cultura e, postos em contato com as BBMVs imobilizadas na placa, para favorecer a ligação entre os mesmos. Foram realizados cinco ciclos de seleção (R-1 ao R-5) (Figura 13) com várias lavagens (5, 8, 10, 15 e 20 repetições de lavagens, respectivamente) e, os fagos inespecíficos foram eliminados, de maneira que, apenas os fagos com mais afinidade pelas proteínas presentes nas BBMVs, ficassem retidos na placa. Os fagos retidos foram eluídos da placa, re-amplificados por nova etapa de infecção da bactéria, e submetidos a outro ciclo de seleção. Este mecanismo se converte numa forma eficiente de eliminar as partículas virais com menor afinidade e enriquecer o 'pool' de fagos com maior afinidade.

O número de lavagens permite manusear a condição de estringência e, portanto, de seleção de fagos de fusão eluídos. A estringência da reação é determinante para ligação de alta afinidade requerida para a seleção de variantes melhoradas.

Os títulos dos fagos de entrada (*input*) e dos fagos de saída (*output*) foram determinados e utilizados para monitorar o enriquecimento de fagos em todos os ciclos de seleção. O material recolhido do ciclo 2 ($1,0 \cdot 10^5$ ufc/mL) e ciclo 3 ($1,51 \cdot 10^5$ ufc/mL) da seleção foi escolhido para ter seus clones isolados e avaliados quanto a integridade do gene, por PCR de colônia. Estes ciclos foram escolhidos por terem o maior número de colônias bacterianas contendo os fagos de saída no monitoramento das placas.

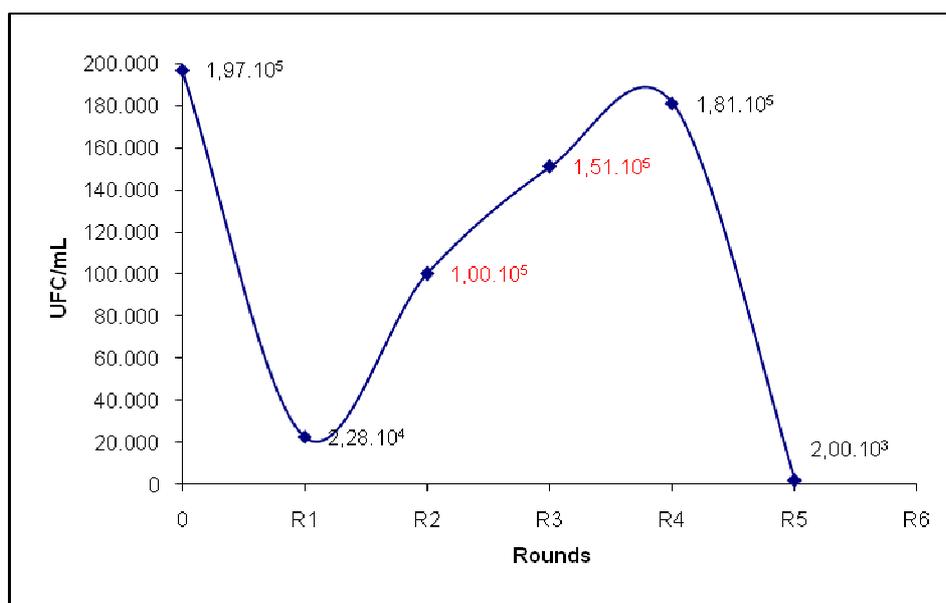


Figura 13. Representação gráfica da seleção indicando o resultado do monitoramento do número de colônias retiradas após cada round de seleção. Os ciclos R2 e R3, com 8 lavagens e 10 lavagens, respectivamente, foram escolhidos como indicativos do enriquecimento de fagos específicos apresentando afinidade pelos receptores presentes na membrana do intestino da praga. O primeiro ponto do gráfico representa o tamanho da biblioteca contendo $1,97 \cdot 10^5$ ufc/mL variantes.

6.6 PCR de colônia

Para analisar a integridade das variantes, foram escolhidos, aleatoriamente, 200 clones de cada um dos ciclos 2 e 3 para serem avaliados por PCR (Figura 14). Dos 400 clones avaliados, 397 clones apresentaram o tamanho original do gene de 1944 pb.



Figura 14. Análise em gel de Agarose 1%, mostrando os produtos do PCR de colônias de variantes do gene *cry1a12synth*. **1** - Marcador 1 kb Plus DNA ladder. **2** - Controle positivo, gene *cry1a12synth* original. **3 a 18** - variantes do gene *cry1a12synth*.

6.7 Análise da expressão das variantes do gene *cry1a12synth* utilizando *Dot blot* e Elisa

As colônias com variantes de mesmo tamanho do gene original foram expressas em sistema de fago e o produto desta expressão foi diretamente aplicado sobre uma membrana de nitrocelulose (Figura 15). Após incubação com anticorpos e revelação da membrana, a intensidade do sinal detectado para a expressão das variantes foi comparado com os sinais obtidos para os controles positivo (uma proteína conhecida por conter o epítopo da hemaglutinina) e, negativo (fago auxiliar VCSM13).

Aproximadamente 90 variantes do experimento de seleção foram analisadas em *Dot Blot*. Devido ao fraco sinal exibido por estas variantes, poucas foram identificadas como positivas, pela comparação visual do sinal de expressão.

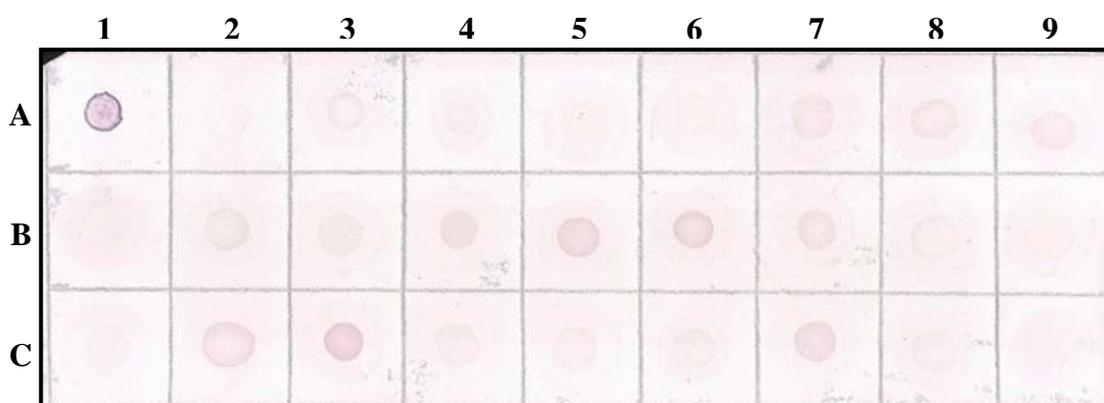


Figura 15. Análise do Dot Blot da expressão das variantes *cry1a12synth* identificadas por PCR de colônia. **A1-** Controle positivo (proteína HA08). **A2** Controle negativo (fago helper). - **A3-A9, B1-B9, C1-C9** - Variantes testadas.

Por conseguinte, foram escolhidas cerca de 30 variantes que também foram expressas em fagos para serem imunodetectadas por Elisa. Esta técnica permite simultaneamente identificar qualitativamente e quantitativamente as variantes fusionadas por utilizar sistema de detecção com anticorpo. Com base na concentração da proteína expressa foram definidas quais variantes seriam testadas em bioensaios.

6.8 Bioensaio

Os bioensaios foram realizados para testar a atividade tóxica dos mutantes da proteína *Cry1a12synth*. As variantes expressas em fagos de fusão, na concentração

de 10 µg/mL, foram individualmente adicionadas na dieta artificial líquida, que foi oferecida as larvas. Após quatro dias, a mortalidade das larvas foi calculada.

A análise dos dados de 30 variantes testados nos bioensaios (Figura 16) mostrou que para 4 mutantes houve aumento de atividade tóxica, de pelo menos 2x, em relação à dieta livre de toxina. A análise de variância foi significativa para a mortalidade gerada por estes 4 mutantes ($F= 20,10$; $p < 0.0001$). A análise estatística de comparação de médias pelo Teste de Tukey revelou que os mutantes apresentaram toxicidade similar quando comparados entre si e toxicidade melhorada quando comparados com a toxina original que não é tóxica para broca gigante.

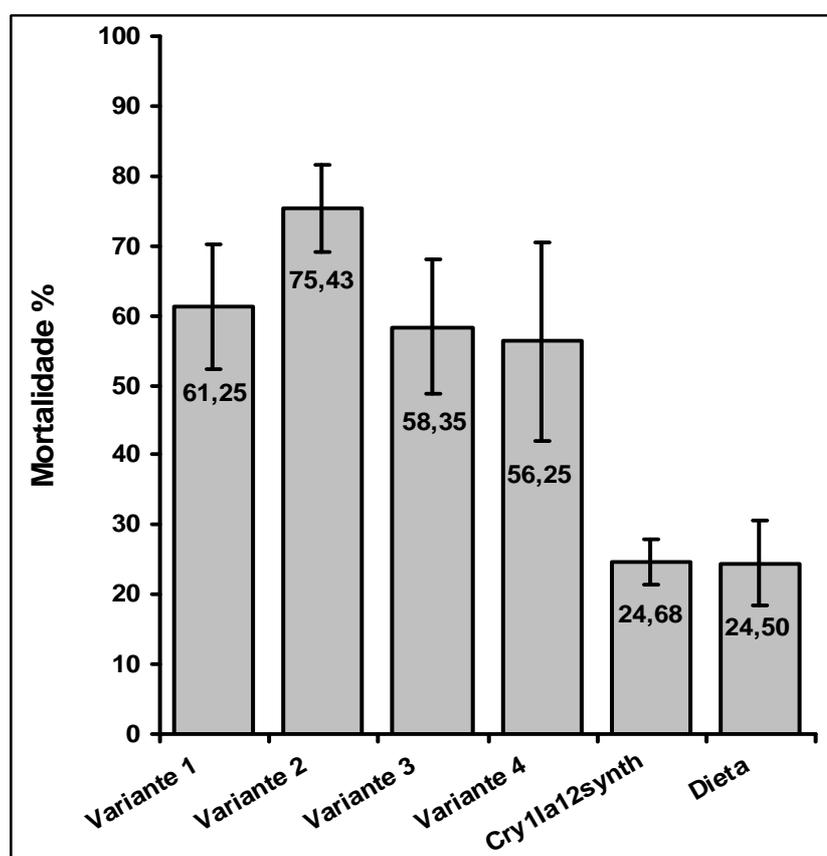


Figura 16. Representação gráfica do bioensaio realizado com 4 variantes da toxina Cry11a12synth expressas em fagos de fusão, na presença de larvas neonatas de *T.l.licus*.

6.9 Seqüenciamento do DNA

O gene original cry11a12synth com 1944 pb codifica uma proteína com 648 resíduos de aminoácidos. As variantes ativas em bioensaios contra *T.l.licus* foram seqüenciadas, e as seqüências analisadas. Estas seqüências foram depositadas no

banco de dados genéticos do NCBI sob os números de acesso FJ938022 a FJ938026 correspondentes a proteína original Cry1Ia12synth e suas quatro variantes, respectivamente.

A análise das seqüências dos variantes mostrou que o maior número de mutações foi observado nas seqüências nucleotídicas, mas que não se traduziram em diferenças de aminoácidos. A maioria das alterações na seqüência peptídica foi produzida no domínio I, seguida do domínio III e nenhuma alteração foi encontrada no domínio II destes mutantes (Tabela 2). O mutante 1 teve alteração de um aspartato D233N por uma asparagina, no domínio I e uma segunda alteração na posição 639 de glutamato (E) para glicina (G), no domínio III. O mutante 2 apresentou modificação apenas no domínio I referente a troca de um aspartato (D) 233 (N) por uma asparagina. O mutante 3 apresentou duas variações no domínio I, isoleucina I116T substituída por treonina e leucina L266F por fenilalanina e uma variação no domínio III, no resíduo de aminoácido correspondente a posição 580, com substituição de lisina (L) por arginina (R). O mutante 4 teve uma modificação na porção N-terminal da molécula com alteração de metionina M45V por valina e uma segunda alteração no domínio I, aspartato D233N por asparagina.

Tabela 2. Mutações pontuais presentes em variantes de Cry1Ia12synth.

Variantes	Mutações pontuais	Domínios
1	D233N	I
	E639G	III
2	D233N	I
	I116T	I
3	L266F	I
	K580R	III
4	M45V	N-terminal
	D233N	I

6.10 Modelagem molecular

Na tentativa de prever os efeitos destas mutações na estrutura e função de suas proteínas, modelos teóricos foram construídos para Cry1Ia12synth e suas

variantes utilizando como molde as estruturas de cristal das toxinas Cry8Ea1 e Cry3Bb1 (Cód PDB: 3EB7 e 1JI6) (Shu *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2009; Galitsky *et al.*, 2001).

Os melhores modelos para Cry1Ia12synth e cada uma de suas 4 variantes foi escolhido após análises utilizando o programa PROCHECK. As estruturas sobrepostas de Cry3Bb1 e Cry8Ea1, quando comparados ao modelo da Cry1Ia12synth, apresentaram os valores de desvio médio quadrático (RMS) de 0,61Å e 0,31Å considerando os C α . Os valores de RMS de cada um dos 4 variantes modelados foram de 0,800 Å, 0,767 Å, 0,712 Å e 0,767 Å para o C α , em comparação modelo da Cry1Ia12synth. O diagrama de Ramachandran contendo a distribuição de aminoácidos para a proteína Cry1Ia12synth indicou que 99,2% dos resíduos estavam em regiões consideradas favoráveis e permitidas. Uma vez que as estruturas moldes não possuem coordenadas atômicas correspondendo a região do N-terminal da toxina Cry1Ia12synth e suas variantes, os modelos construídos para estas toxinas não contemplam os 61 primeiros resíduos da seqüência primária das moléculas. Os modelos teóricos apresentam os três domínios (I, II e III) conservados nas estruturas das toxinas Crys (Fig 11A).

As análises dos modelos construídos foram importantes para indicar o posicionamento estrutural dos resíduos mutados. Observou-se que a maioria das mutações ocorridas nas novas variantes 1-4 está localizada nos domínios I e III, envolvidos na inserção na membrana, formação do poro e especificidade com receptores relatados para outras toxinas Cry.

Com a obtenção do modelo estrutural da toxina Cry1Ia12synth foi possível situar espacialmente a posição das 8 mutações encontradas nas quatro toxinas variantes (Figura 17A). Três mutações estão distribuídas no domínio I, I116T no loop3 (α 2b - α 3), D233N na hélice α 6 e L266F na hélice α 7. Duas mutações foram encontradas no domínio III, K580R na fita β 16 e E639G na fita β 19 (Figura 17B).

Embora, aqui a modelagem tenha sido utilizada com o intuito de explicar a função das mutações na toxicidade das moléculas, uma conclusão precisa sobre os resíduos envolvidos só será possível após a identificação do receptor com afinidade pela nova toxina e confecção dos modelos em complexo receptor-toxina.

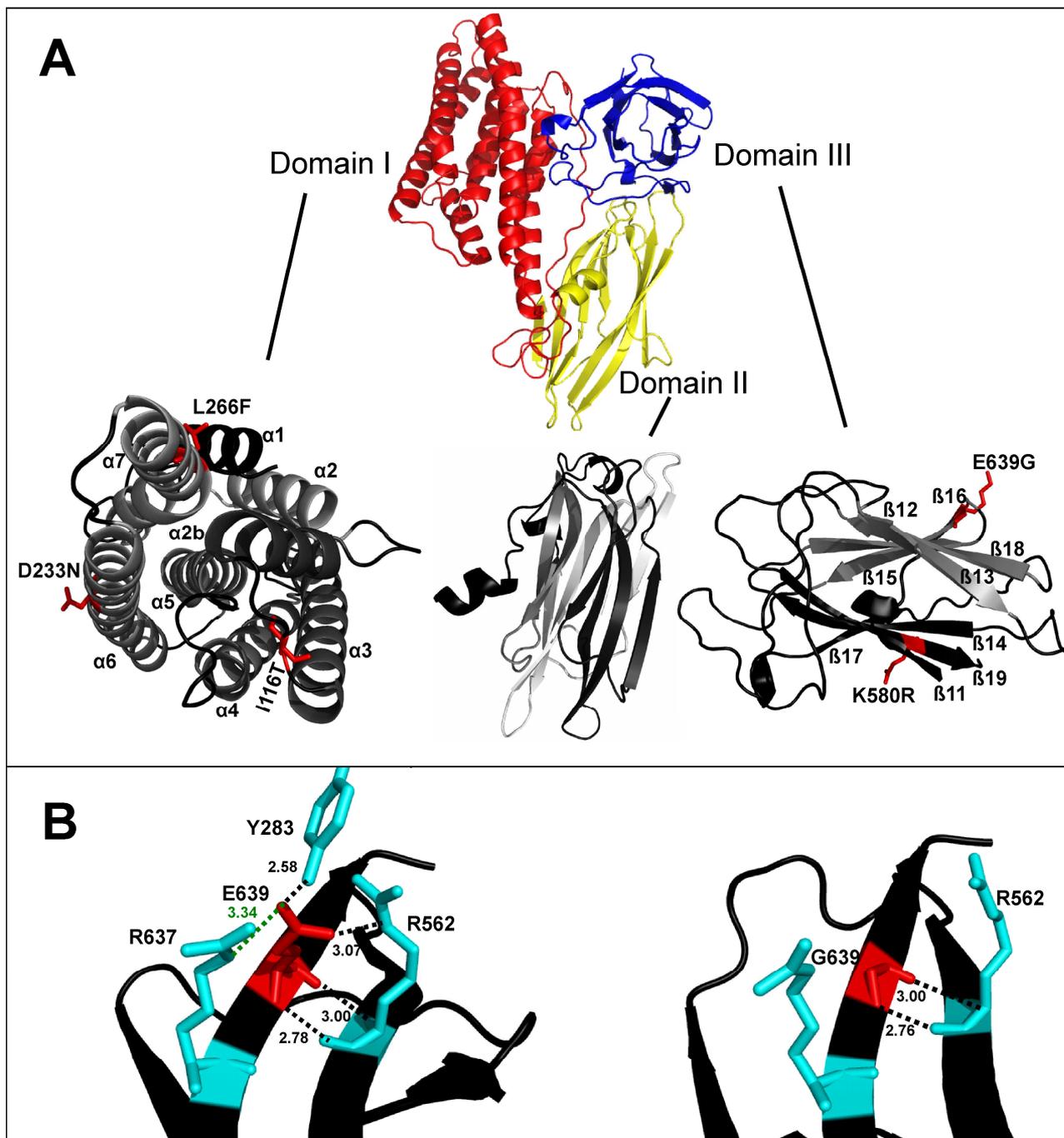


Figura 17. Modelo teórico de Cry1Ia12synth e suas variantes. **A.** Diagrama de fitas de Cry1Ia12synth, visualizada pelo programa PyMOL. Domínio I está mostrado em vermelho, domínio II em amarelo e domínio III em azul. Modelos separados de cada domínio são mostrados em detalhe na parte inferior do painel A. As estruturas de α -hélice e fitas- β estão identificadas. Mutações presentes nas variantes estão coloridas em vermelho. Linhas pontilhadas em preto representam pontes de hidrogênio e a linha pontilhada em verde representa pontes salinas. **B.** Detalhes da mutação presente no variante 1 de Cry1Ia12synth (na direita) comparado com o parental Cry1Ia12synth (na esquerda). O variante 1 apresenta a mutação E639G, localizada na fita $\beta 19$ do domínio III. O modelo da esquerda representa as interações do resíduo E639 (em vermelho) com os resíduos Y283 (do bloco 2), R562 (do bloco 4) e R637 (do bloco 5) em azul. Estas interações estão rompidas no variante 1 (na esquerda).

7. Discussão

O gene *cry11a12* foi isolado previamente (Grossi de Sá *et al.*, 2007), da cepa S811 de *Bacillus thuringiensis*, e codifica uma proteína de 719 aminoácidos, que mostrou-se bastante efetiva contra o lepidóptero *S. frugiperda*. Para avaliar a atividade tóxica contra um lepidóptero extremamente danoso à cultura de cana-de-açúcar e com a perspectiva do gene que codifica para esta toxina tornar-se bom candidato para ser utilizado na transformação de cana de modo a conferir resistência ao inseto *T.l.licus*, o viés de codon do gene *cry11a12* foi modificado de modo a favorecer a presença de nucleotídeos usuais para plantas. O gene modificado, denominado *cry11a12synth* possui 1944 pb e codifica para uma proteína de 648 aminoácidos. A diferença de tamanho em relação ao gene original se deve a presença de um longo C-terminal. Essa região está ausente no gene modificado que codifica apenas a toxina ativa.

Nos últimos 20 anos, desde que foi possível a introdução de transgenes em plantas, várias estratégias foram executadas para melhorar a produtividade das culturas. Muitas estratégias para o controle de pragas, tolerância ao frio, controle de doenças e outras áreas tiveram resultados iniciais positivos no cenário de pesquisa, porém os genes não forneceram eficácia suficiente para a comercialização de produtos viáveis geneticamente modificados (Yuan *et al.*, 2005; Lassner & Bedbrook, 2001).

Em relação à técnica de DNA *shuffling*, são descritos inúmeros relatos do sucesso da estratégia de evolução para aumentar em muitas vezes a eficácia de determinada molécula, desde enzimas, a exemplo de β glucuronidases e enzimas envolvidas na biossíntese de carotenóides (Lassner & Bedbrook, 2001), a genes de resistência a insetos para transformação de plantas, como o aumento da atividade específica de genes que codificam para proteínas Bt. Entretanto, também existem alguns relatos discutindo a dificuldade em se obter mutantes com atividade aumentada recombinação vários genes *cry*. Knight *et al.*, (2004), em trabalho sobre *shuffling* de vários domínios da proteína cristal de Bt descreveram uma recombinação *in vitro*, onde segmentos correspondentes aos 3 domínios de diversas proteínas Cry foram embaralhados, na tentativa de produzir uma proteína Cry recombinante com toxicidade aumentada para larvas de *L. cuprina*. Foi mostrado que a despeito da extensiva varredura realizada em grande número de recombinantes, apenas poucas proteínas recombinantes foram encontradas com atividade, e nenhuma delas foi

identificada com atividade superior a original. Os resultados indicaram que proteínas Cry não seriam tolerantes a permuta de domínios e particularmente intolerantes a mutações em regiões conservadas. Os autores concluíram que as quimeras geradas desta forma, possivelmente similar ao processo natural de evolução, são raramente funcionais em bioensaios, mas quando ativas freqüentemente alteram a especificidade da espécie (Knight *et al.*, 2004).

No presente trabalho, foi utilizada a técnica de DNA *shuffling* como ferramenta para induzir alterações no gene *cry1la12synth* a fim de aumentar a atividade inseticida da toxina por ele codificada. A biblioteca de 10^5 variantes geradas pelo embaralhamento do gene foi utilizada no procedimento de *biopanning* para selecionar variantes por afinidade de ligação às BBMV's de larvas de *T.l.licus*, resultando na seleção de toxinas mais específicas.

No sistema de expressão em fagos, um fator relevante que deve ser levado em consideração se trata da escolha do bacteriófago que por suas diferentes características, como ciclo de infecção lítico ou lisogênico, proteína de fusão escolhida, tamanho da proteína apresentada, capacidade de suportar condições de restringências mais severas, podem atuar de forma sinérgica ou não, na etapa de varredura da biblioteca. Em trabalhos anteriores (Marzari *et al.*, 1997; Kasman *et al.*, 1998), as toxinas Cry1Aa e Cry1Ac, ativas contra insetos lepidópteros, foram apresentadas em fagos lisogênicos do tipo M13 (filamentoso) ou λ . Nos estudos utilizando o M13, foi constatado que a estrutura da toxina Cry1Aa não foi corretamente apresentada na superfície do fago devido a deleções ocorridas na proteína de fusão. Em contraste, a toxina Cry1Ac apresentada por M13 reteve a toxicidade frente à larva de *M.sexta*, porém não houve ligação a receptores funcionais *in vitro*, sugerindo restrições estruturais na toxina apresentada. Quanto ao sistema de apresentação em fagos utilizando M13, Pacheco *et al.* (2006) relatam um problema intrínseco na apresentação de proteínas maiores, visto que as proteínas de fusão são transportadas para o periplasma na montagem do fago. Inversamente ao que acontece com fagos λ , nos quais sua montagem é feita no citoplasma da bactéria possibilitando a fusão com proteínas maiores. Diante das dificuldades impostas pelo trabalho com fagos M13 e λ , os autores resolveram testar o fago T7 que apresentava vantagens como replicação mais rápida e estabilidade a condições mais severas que poderiam inativar outros fagos. Mostraram que a toxina Cry1Ac foi eficientemente apresentada na superfície do

fago T7, retendo a capacidade de se ligar a moléculas de receptores naturais e sua toxicidade a larvas de *M.sexta*.

Contudo, os resultados obtidos em outro trabalho do nosso grupo, utilizando um gene que codifica para uma toxina Cry com 620 resíduos de aminoácidos, indicaram que o sistema de expressão em fagos M13 foi eficiente para selecionar variantes, que apresentaram alta toxicidade contra larvas de *A. grandis*. O variante *cry8Ka5* foi expresso em bactéria e confirmado por análises em Western blot e bioensaios, o mesmo resultado obtido com a expressão em M13, indicando a conservação da estrutura molecular e funcional da toxina. De acordo com este resultado, o tamanho da proteína não foi impedimento para o sucesso do sistema de expressão, muito menos para seu desempenho na atividade tóxica.

Da mesma forma, acredita-se que no presente trabalho, o sistema de expressão em fago filamentososo M13 também tenha sido eficiente, embora os variantes não tenham sido expressos e testados em outros sistemas. O sistema de seleção por *phage display* agrega algumas vantagens importantes como rapidez, facilidade e baixo custo na seleção de mutantes. Além do que, o sistema de expressão convencional em bactérias tem a desvantagem de produzir protoxinas em cristais ou corpos de inclusão que ainda precisarão ser solubilizados e a apresentação em fagos fornece toxinas solúveis prontas para o uso.

Em nosso estudo utilizando *biopanning* da biblioteca de variantes de *cry1la12synth* foram selecionados diversos variantes por ligação a BBMV's de *T. l. licus*, destes, cerca de 30 foram testados em bioensaios e 4 que apresentaram atividade melhorada em relação a toxina original tiveram suas seqüências analisadas.

Entre as quatro toxinas variantes, foram encontrados oito sítios de mutações em todas elas. Metade destas mutações correspondeu a alterações de resíduos carregados, tanto negativamente como positivamente, e a outra metade correspondeu a substituições de resíduos apolares. Também foi observado que 50% destas mutações foram encontradas no domínio I e 33% no domínio III, lembrando que no domínio II não houve mutações, a outra parte (17%) destas mutações estava na porção N-terminal.

No trabalho de Dean *et al.* (1996), onde foi estudado o mecanismo de ação de proteínas Cry de *B. thuringiensis* por mutagênese sítio-dirigida foram revisados a estrutura e função de toxinas Cry por meio de mutações em cada um dos seus 3 domínios, visando avaliar efeitos na estabilidade da toxina, ligação a receptores,

inserção irreversível na membrana e atividade do canal iônico. Nas substituições feitas no domínio I, Y153D, Y153R e Y153A, foi mostrado que o resíduo carregado negativamente (D), nesta posição, era menos favorável a inserção da toxina na membrana do que alteração por resíduos carregados positivamente (R) ou neutros (A). Ainda trabalhando com mutações em CryIAb, no domínio I, dos resíduos A92E e A92D, foi constatado que a troca por resíduos carregados negativamente não produziam efeito significativo na constante de dissociação e nem na concentração dos sítios de ligação.

Em outro trabalho (Wu e Aronson, 1992; Grochulski *et al.*, 1995), os autores investigaram duas regiões do domínio I em CryIA(c), que são altamente conservadas em proteínas Cry e, uma delas, referente aos resíduos Ala164-His168, corresponde a parte central da hélice $\alpha 5$. Nesta região, foi encontrada que a substituição de Leu167 afeta drasticamente a toxicidade. Mutações deste resíduo não polar por resíduos carregados positivamente ou aromáticos, a exemplo de L167K ou L167F, possivelmente alteraram a toxicidade por romperem a estrutura terciária do domínio I. Considerando nosso trabalho, o mutante 3 que apresentou a mutação L266F no domínio I, não apresentou redução de toxicidade, pelo contrário, teve um moderado aumento (2x) de toxicidade em relação a toxina selvagem. Em cotejo a estes resultados, trabalho de Girad *et al.* (2009), sugere que a presença de resíduo aromático (Y na posição 153, em particular) parece ser importante para a inserção da toxina, desde que aminoácidos aromáticos facilitam a translocação de segmentos protéicos através de membranas biológicas e contribuem para ancoragem de proteínas de membrana pela interação com grupos de fosfolipídeos na interface água-lipídeo.

Nossos estudos de modelagem revelaram que as três mutações presentes no mutante 3 parecem ter efeito interativo sobre a estrutura da variante e, possivelmente sobre sua atividade biológica. Na mutação I116T, o oxigênio da T116 interage com o carbono β do resíduo A120, que corresponde ao resíduo homólogo estrutural A92 (Cry1Ab), o qual está associado com a inserção da toxina na membrana (Chen *et al.*, 1995). Na mutação L266F, L266 tem sua cadeia lateral voltada para os resíduos D270 e R262 (domínio I) e E455 (domínio II), e o anel aromático de F266 torna este resíduo menos reativo que o seu original L266, interferindo nas interações entre os domínios I e II. Na mutação K580R, ambos os resíduos K580 e R580 estão voltados para o solvente e próximos de N578, homólogo estrutural de N546 (Cry1Ac) que foi

demonstrado estar relacionado com a ligação à membrana e toxicidade de Cry1Ac (Xiang *et al.*, 2009).

Em Xiang *et al.* (2009), os autores analisaram por mutagênese sítio-dirigida a função de resíduos de asparagina (N) no domínio III. Constataram que os mutantes foram severamente afetados, o que suscitou como explicação para o efeito causado pelas mutações (substituições de N por A, G, D, K ou deleção de N), a mudança conformacional sofrida por alguns dos mutantes ou diferenças na ligação de afinidade entre mutantes e macromoléculas receptoras (BBMV's).

A ligação ao receptor é um fator preponderante na especificidade da toxina e esta interação é mediada por elementos dos domínios II e III, constituídos principalmente de folhas β . A interação receptor-toxina é determinante para a inserção da toxina dentro da membrana e formação de poros amplos que impedem o vital gradiente iônico transmembrana. Estes poros permitem a difusão de uma grande variedade de solutos carregados e não carregados, porém com presença de uma leve seletividade catiônica. Sua formação é atribuída ao domínio I. Trabalho recente (Girard *et al.*, 2009) investigou a contribuição de distintos elementos estruturais do domínio I no mecanismo de formação do poro. Vasto número de mutantes da toxina Cry1Aa foi testado pela substituição de resíduos de aminoácidos estrategicamente localizados por resíduos de cisteína. Os resíduos alterados incluíram aminoácidos carregados na hélice α_3 , numerosos aminoácidos localizados nos loops entre as hélices do domínio I e em quase todos os resíduos da hélice α_4 . Segundo os autores, a atividade dos mutantes variou consideravelmente e muitos deles foram menos eficientes do que a toxina Cry1Aa original. O efeito dos reagentes tiol-específicos na atividade de formação do poro destes mutantes foi evidente apenas quando os aminoácidos alterados faziam parte do grampo α_4 - α_5 , ou dos loops adjacentes α_3 - α_4 e α_5 - α_6 , indicando que estes elementos estruturais exercem importante função no mecanismo de formação do poro.

Nossos resultados mostram que a maior parte das mutações foi encontrada no domínio I, e pelo menos uma mutação D233N foi encontrada em 3 dos 4 mutantes. A frequência desta mutação em praticamente todos os mutantes também reflete a especificidade na seleção dos variantes obtidos com o experimento de *biopanning*. Todavia, deve ser ressaltada a necessidade de estudos adicionais sobre estrutura-função destes mutantes.

A despeito da mutação D233N ser encontrada em quase todos os variantes, os estudos de modelagem molecular indicaram que na variante 2 esta mutação (D233N) apresenta ambos os resíduos (cadeia lateral) voltados para o solvente. Estes resíduos, não estão próximos de nenhuma outra região descrita na literatura como importante para a atividade entomotóxica, mas a substituição de um O (D233) por um N (N233) torna esta região da toxina menos negativa e pode estar relacionada com as interações da toxina com o meio. Para elucidar o papel deste resíduo na atividade, seriam necessários estudos de dinâmica molecular para esclarecer o movimento da cadeia do lateral do resíduo e experimentos de *docking* com o receptor. Experimentos de bancada abrangendo a identificação do receptor e mutagênese sítio dirigida no resíduo 233 também seriam importantes no entendimento de sua função.

As duas mutações presentes no domínio III reforçam a importância deste domínio na atividade das proteínas Cry. A este domínio é atribuída à função de estabilização da toxina pela proteção de proteólises, tanto quanto o envolvimento na ligação ao receptor e regulação da atividade de formação do poro (Flores *et al.*, 1997). De Maagd *et al.* (1996), construíram toxinas híbridas de CryIA(b) e CryIC para determinar se o domínio III de CryIC poderia melhorar a moderada toxicidade de CryIA(b) frente a *S. exigua*. No trabalho, foram fornecidas evidências de que o domínio III de delta-endotoxinas está envolvido na ligação a proteínas de membrana do intestino médio de *S. exigua*, demonstrando que domínio III de CryIC exerce importante função na toxicidade contra *S. exigua*, o que torna a substituição deste domínio uma relevante ferramenta para aumentar o repertório de toxinas ativas disponíveis para o combate a insetos pragas.

Em nossa variante 1, a presença da mutação E639G, mostra a substituição de um resíduo que está relacionado com a interface de três blocos conservados. Na proteína Cry1Ia12synth, este resíduo (E639) interage com resíduos Y283 (bloco 2, por uma ponte de hidrogênio de 2,58 Å), R562 (bloco 4, por 3 pontes de hidrogênio de cerca de 3 Å) e R637 (bloco 5, por uma ponte salina de 3,34Å), enquanto que na variante 1, G639 interage apenas com o resíduo R562 (bloco 4, por 2 pontes de hidrogênio). Além disto, a mutação E639G da variante 1 está localizada na fita β 19 do domínio III que como mencionado acima parece ser responsável por importante função na atividade de proteínas Cry.

No cerne da questão que engloba a resistência desenvolvida pelos insetos alvos por meio da evolução encontra-se justamente a busca de formas alternativas de contornar o mecanismo elaborado por insetos ao longo do tempo.

O desenvolvimento da resistência é determinado por uma série de complexas interações que envolvem fatores ecológicos, genéticos e operacionais. Portanto, a taxa de crescimento populacional, a mobilidade da praga, a frequência alélica inicial de genes de resistência, o grau de dominância, a relação pleiotrópica, a aplicação de pesticidas, o tempo, dose e formulação usada são fatores que influenciam o surgimento de populações de pragas resistentes (Peck, 2001; Cerda e Paletti, 2004; Heckel *et al.*, 2007).

Várias estratégias podem ser usadas no cultivo de plantas transformadas com Bt para lidar com o gerenciamento da resistência. Elas consistem no uso de misturas, mosaicos ou rotações de plantas transgênicas; expressão controlada da toxina, tecido ou tempo específica; emprego de baixas doses da toxina associadas com a presença de inimigos naturais; co-expressão de diferentes genes *cry* e alta expressão (dose) da toxina Bt juntamente com o uso de áreas de refúgios, que consiste da estratégia mais recomendada (Cerda e Paletti, 2004; Zhao *et al.*, 2005).

Nesta vertente de ação é importante assegurar um alto nível de expressão da toxina, para que o fenótipo de resistência do inseto seja herdado como um traço recessivo. Portanto, refúgios são áreas plantadas com culturas não transgênicas, que possibilitam o acasalamento de insetos suscetíveis homozigotos com indivíduos resistentes homozigotos, de forma que resultem numa progênie heterozigota, capaz de limitar a difusão de alelos de resistência na população (Cerda e Paletti, 2004).

Para retardar o desenvolvimento da resistência, a piramidização de genes tem se evidenciado como alternativa paralela. O conceito de pirâmide se aplica quando duas ou mais toxinas com diferentes modos de ação se ligam a moléculas receptoras distintas na mesma planta. A possibilidade de gerar insetos resistentes é reduzida exponencialmente, visto que múltiplas mutações seriam requeridas para a perda de suscetibilidade a ambas as toxinas. Recentemente, foi anunciada a liberação comercial de milho transgênico contendo seis genes *cry* piramidizados. Este milho transgênico nomeado 'SmartStax' contém 3 genes *cry* (*cry34Ab/cry35Ab* e *cry3Bb*) que codificam toxinas para insetos coleópteros e 3 genes *cry* (*cry1A.1.05*, *cry2Ab* e *cry1F*) que codificam toxinas para lepidópteros (Bravo e Soberón, 2008; Pardo-López *et al.*, 2009).

Estudos estão sendo feitos com estratégias experimentais que visem o melhoramento da ação das toxinas Cry. O processo de ativação da toxina pode ser modificado pela adição de inibidores de protease ou pela introdução de sítios de clivagem intramolecular na toxina. A qualidade da interação de ligação toxina-receptor pode ser potencializada pelo uso de quitinases ou pela inclusão de sítios de ligação adicionais, favorecidos com a presença de toxinas Cyt. A afinidade da interação de ligação pode ser melhorada pelo emprego de mutagênese sitio-dirigida e evolução dirigida ou pelo desenho de toxinas híbridas (Pardo-López *et al.*, 2009).

8. Conclusões

- A estratégia combinando as técnicas de DNA shuffling e *phage display* foi eficiente para obter uma biblioteca combinatória do gene *cry1la12synth* contendo 10^5 variantes apresentadas na superfície dos fagos
- A seleção de fagos apresentando em sua superfície proteínas de fusão promoveu o enriquecimento de variantes da toxina Cry1la12synth mais específicas para BBMV's de larvas neonatas de *T.l.licus*
- A expressão de variantes do gene *cry1la12synth* em fagos M13 mostrou-se uma alternativa otimizada para produzir rapidamente proteínas que precisam ser testadas quanto a sua atividade biológica
- Os bioensaios mostraram que foram encontradas quatro variantes que apresentam atividade entomotóxica diferenciada em pelo menos duas vezes para larvas de broca gigante da cana-de-açúcar
- Estudos de modelagem molecular auxiliaram na localização das mutações criadas nas quatro variantes e permitiram indicações de prováveis resíduos envolvidos com regiões importantes para interação com receptores por analogia com resíduos conhecidos em outras toxinas
- Identificar receptores da broca-gigante que se ligam aos variantes

9. Perspectivas

- Estudos de mutagênese sítio-dirigida e de dinâmica molecular da interação com o receptor seriam importantes para o melhor entendimento do efeito das mutações presentes nas variantes da toxina Cry1Ia12synth sobre a atividade biológica exercida por estas proteínas contra larvas de *T.l.licus*.
- Avaliar o potencial entomotóxico destas toxinas contra outras pragas da cana-de-açúcar
- Utilizar os mutantes apresentados em experimentos de transformação de plantas, a fim de produzir uma cana-de-açúcar geneticamente modificada resistente a pragas.

10. Referências Bibliográficas

Agaisse, H., Lereclus, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal of Bacteriology*, v.177, n.21, p.6027-6032, 1995.

Agrolink. Acessado na internet em maio de 2008. On-Line. Disponível no site: <http://www.agrolink.com.br/clipping/jr.aspx?cn=115693&ul=138516&cid=1531&rt=1&cn d=0&tv=1>

Altschul, S. F., Madden, T.L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, v.25, p.3389-3402, 1997.

Arap, M.A. Phage display technology – Applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*, v.28, n.1, p. 1-9. 2005.

Aronson, A.I., Shai, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, v. 195, p.1-8, 2001.

Arrigioni, E.D.B. Uso de defensivos agrícolas. In: Macedo, I.C (Organizador) – vários autores. A energia da cana-de-açúcar. Doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade. São Paulo, Editora Berlendis&Vertecchia, Única, 237p, 2005.

Azzazy, H.M.E., Edward Highsmith, Jr. W. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*, v.35, p. 425-445, 2002.

Barbas III, C.F., Burton, D.R., Scott, J.R., Silverman, G.J. Phage Display: A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

Baret, P., Cesari, M., Queiroz, C., Rouch, C., Meunier, J.C, Cadet, F. Purification and characterization of a multienzymatic complex in sugarcane, a C4 plant. *Biochemistry*, v. 322, p.29-34, 1999.

Bernhard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D.J., Roberts, G.M., Pauli, S., Rodgers, P., Burges, H.D. Natural Isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide Distribution, Characterization and Activity against Insect Pests. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.70, p. 59-68, 1997.

Betz, F.S., Hammond, B.G., Fuchs, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory, Toxicology and Pharmacology*, v.32, p.156-173, 2000.

Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J., Li, J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of Molecular Biology*, v.348, p.363–382, 2005.

Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C., Lescar, J. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *Journal of Bacteriology*, v.188, p.3391–3401, 2006.

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

Bravo, A. Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *Journal of Bacteriology*, v.179, n.9, p2793-2801, 1997.

Bravo A., Gill, S.S., Soberón, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt and their potential for insect control. *Toxicon*, v.49, p.423-435, 2007.

Bravo, A., Soberón, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends in Biotechnology*, v.26, n.10, p. 573-579, 2008.

Carvalho, L.C.C. Perspectivas da cultura da cana-de-açúcar para a década de noventa. In: Camara, G.M.S., Oliveira, E.A.M. (Eds.) *Produção de cana-de-açúcar*. Piracicaba: FeALQ, p. 1-17, 1993.

Cerda, H., Paoletti, M.G. Genetic engineering with *Bacillus thuringiensis* and conventional approaches for insect resistance in crops. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.23, n.4, p.317-323, 2004.

Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M., Barton, G. F. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics*, v.20, p.426-427, 2004.

Chen, X. J., Curtiss, A., Alcantara, E., Dean, D. H. Mutations in Domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin CryIAb Reduce the Irreversible Binding of Toxin to *Manduca sexta* Brush Border Membrane Vesicles. *J Biol Chem* v.270, p.6412-6419, 1995.

Coco, W. M., Levinson, W. E., Crist, M. J., Hektor, H. J., Darzins, A., Pienkos, P.T., Squires, C.H., Monticello, D.J. DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nature Biotechnology*, v.19, p.354-359, 2001.

Conab. Acompanhamento da safra brasileira Cana-de-açúcar Safra 2008/ Primeiro levantamento, abril/2009. Brasília, Conab, p.1-10, 2009.

Cooper, M.A., Carroll, J., Travis, E.R., Williams, D.H., Ellar, D.J. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin interaction with *Manduca sexta* aminopeptidase N in a model membrane environment. *Biochem J*, v.333, p.677-683, 1998.

Crickmore, N., Zeigler, D.J., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D.H. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.62, n. 3, p. 807-813, 1998.

Cruz, C. D. Programa Genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Editora UFV, Viçosa, 2001.

CTNBio, 2009. Disponível no endereço:
<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12482.html>

Dai S.M., Gill S.S. In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry IVD proteins by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 21, p.273–283, 1993.

Daniel, J., Roach, B.T. Taxonomy and evolution. In: Heinz, D.J. (Ed.) *Sugarcane improvement through*. Amsterdam: Elsevier, p. 7-84, 1987.

Dean, D.H., Rajamohan, F., Lee, M.K., Wu, S-J., Chen, X.J., Alcantara, E., Hussain, S.R. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis – a minireview. *Gene*, v.179, p.111-117, 1996.

DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System on the World Wide Web. posting date, 2002. [Online.]

De Maagd, R. A., Kwa, M. S. G., Klei, V. D., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J. M., Stiekema, W. J., Bosch, D. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl Environ Microbiol.*, v.62, p.1537-1543, 1996.

De Maagd, R.A., Bosch, D., Stiekema, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in Plant Sciences*, v.4, p.9-13, 1999.

De Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, v.17, n.4, p. 193-199, 2001.

De Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H.E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.*, v.37, p.409-433, 2003.

Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, v.32, p.1792-1797, 2004.

Estruch, J.J., Carozzi, N.B., Desai, N., Duck, N.B., Warren, G.W., Koziel, M.G. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology*, v.15, p.137-141, 1997.

Fernández, L.E., Gómez, I., Pacheco, S., Arenas, I., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M. Employing phage display to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Peptides*, v. 29, p. 324-329, 2008.

Fernandez-Gacio, A. Uguen, M., Fastrez, J. Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. *TRENDS in Biotechnology*, v.21, n.9, p. 408-414, 2003.

Flores, H., Soberón, X., Sánchez, J., Bravo, A.. Isolated domain II and III from the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. *FEBS Lett*, v.414:313, p.318, 1997.

Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J.R., Pangborn, W., English, L. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. Sect. D*, v. 57, p.1101–1109, 2001.

Gilliland, A., Chambers, C.E., Bone, E.J., Ellar, D.J. Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ - Endotoxin Binding in Determining Potency during Lepidopteran Larval Development. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.4, p. 1509–1515, 2002.

Girard, F., Vachon, V., Lebel, G., Préfontaine, G., Schwartz, J-L, Masson, L., Laprade, R. Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1788, p.575-580, 2009.

Gitahy, P.M., Souza, M.T., Monnerat, R.G., Arrigoni, E.B., Baldani, J.I. A brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 531-537, 2007.

Gómez, I., Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Fernandez, L.E., Pérez, C., Sánchez, J., Soberón, M., Bravo, A. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, v.28, n.1, p.169-173, 2007.

Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R., Cygler, M. *Bacillus thuringiensis* CryIa(a) Insecticidal Toxin: Crystal-Structure and Channel Formation. *Journal of Molecular Biology*, v.254, n.3,p.447-464, 1995.

Grossi de Sa, M. F., Magalhães, M. Q., Silva, M. S., Silva, S. M. B., Dias, S. C., Nakasu, E. Y. T., Brunetta, P. S. F., Oliveira, G. R., Oliveira-Neto, O. B., Oliveira, R. S., Soares, L. H. B., Ayub. M. A. Z., Siqueira, H. A. A., Figueira, E. L. Z. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry1Ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. *J Biochem Mol Biol*, v.40, p.773-782, 2007.

Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., Song, F., Zhang, J., Wu, X., Huang, D., Rao, Z. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *Journal of Structural Biology*, v.168, p.259-266, 2009.

Harayama, S. Artificial evolution by DNA *shuffling*. *Trends in Biotechnology*, v.16, n.2, p.76-82, 1998.

Heckel, D.G., Gahan, L.J., Baxter, S.W., Zhao, J-Z, Shelton, A.M., Gould, F., Tabashnik, B.E. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.95, p.192-197, 2007.

Hofte, H., Whiteley, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, Washington, v.53, p.242-255, 1989.

James, C. Situação global das culturas biotecnológicas/GM comercializadas:2008. Resumo Executivo, N.39, 2008. Disponível no endereço: <http://translate.google.com/translate?u=http://www.isaaa.org/Default.asp?&langpair=en|pt>

Kasman, L.M., Lukowiak, A.A., Garczynski, S.F., McNall, R.J., Youngman, P. Adang, J.M. Phage display of a biologically active *Bacillus thuringiensis* toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n.8, p. 2995-3003, 1998.

Kehoe, J.W., Kay, B.K. Filamentous Phage Display in the New Millennium. *Chem Rev*, v105, p.4056-4072, 1998.

Keller M., Sneh B., Strizhov N., Prudovsky E., Regev A., Koncz C., Schell J., Zilberstein A. Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to Cry 1C. *Insect Biochem. Mol. Biol*, v.26, p.365–373, 1995.

Knight, J.S., Broadwell, A.H., Grant, W.N., Shoemaker, C.B. A Strategy for shuffling numerous *Bacillus thuringiensis* crystal protein domains. *Biological and Microbial Control*, v.97, n.6, p.1805-1813, 2004.

Lassner, M., Bedbrook, J. Directed molecular evolution in plant improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, v.4, p.152-156, 2001.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J.M.. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr*, v.26, p.283-291, 1993.

Li, J. D., Carroll, J., Ellar, D.J. Crystal-Structure of Insecticidal Delta-Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5-Å Resolution. *Nature*, v.353, n.6347, p.815-821,1991.

Li, J., Derbyshire, D.J., Promdonkoy, B., Ellar, D.J. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Trans*, v.29, p.571–577, 2001.

Lima, L. M. Caracterização molecular e imunológica de anticorpos desenvolvidos contra proteínas de nematóides de galhas de raiz. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, 2005.

Macedo, I.C (Organizador) – vários autores. A energia da cana-de-açúcar. Doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade. São Paulo, Editora Berlendis&Vertecchia, Única, 237p, 2005.

Marzari, R. Edomi, P., Bhatnagar, R.K., Ahmad, S., Selvapandiyan, A., Bradbury, A. Phage display of a *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin. FEBS Letters, v.411, p. 27-31, 1997.

Mendonça, A.F. A broca gigante *Castnia licus* Drury, 1770 (Lepidóptera: Castniidae) no Brasil. Saccharum APC, São Paulo, v.5, n.20, p.53-60, 1982.

Mendonça, A.F., Viveiros, A.J.A., Sampaio F., F. A broca gigante da cana-de-açúcar, *Castnia licus* Drury, 1770 (Lep.: Castniidae). Pragas da cana-de-açúcar. Brasil, Insetos & Cia, p.133-167, 1996.

Milner, R.J. History of *Bacillus thuringiensis*. Agriculture, Ecosystems & Environment, v.49, p.9-13,1994.

Morse, R. J., Yamamoto, T., Stroud, R.M. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. Structure (Cambridge), v. 9, p.409–417, 2001.

Mozambani, A.E., Pinto, A.S., Segato, S.V., Mattiuz, C.F.M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: Segato, S.V., Pinto, A.S., Jendiroba, E., Nóbrega, J.C.M. (Organizadores) - vários autores. Atualização em produção de cana-de-açúcar. Piracicaba, 415p, 2006.

Neylon, C. Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. Nucleic Acids Research, v.32, n.4, p.1448-1459, 2004.

Oliveira, G. R. Evolução in vitro de moléculas cry ativas contra *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande

do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2008.

Ostermeier, M., Lutz, S. The creation of ITCHY hybrid protein libraries. *Methods Molecular Biology*, v.231, p. 129-141, 2003.

Pacheco, S., Gómez, I., Sato, R., Bravo, A., Soberón, M. Functional display of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on T7 phage. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.92, p. 45-49, 2006.

Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Porta, H., Rodriguez-Almazán, C., SOberón, M., Bravo, A. Strategies to improve the inseticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, v.30, p.589-595, 2009.

Patten, P.A., Howard, R.J., Stemmer, W. PC. Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Current Opinion in Biotechnology*, v.8, p.724-733, 1997.

Peck, S.L. Antibiotic and insecticide resistance modeling – is it time to start talking. *Trend Microbiology*, v.9, p. 286-292, 2001.

Perferöen, M. Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. *Trends in Biotechnology*, v.15, p.173-177, 1997.

Pigott, C.R., Ellar, D.J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.71, n.2, p.255-281, 2007.

Planalsucar. Guia das principais pragas da cana-de-açúcar no Brasil. Piracicaba, 28p, 1977.

Rasko, D.A., Altherr, M.R., Han, C.S., Ravel, J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, p.303–329, 2005.

Rees, J.S., Jarrett, P., Ellar, D.J. Peritrophic membrane contribution to Bt Cry δ -endotoxin susceptibility in Lepidoptera and the effect of Calcofluor. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.100, p. 139-146, 2009.

Risco, S.H. Broca Gigante: Um problema que se agrava.. Acessado na internet em outubro de 2004. No site: <http://www.stableste.org.br/artigostecnicos/brocagigante.htm>. 2003

Roh, Yul, J., Choi, J.Y., Li, M.S., Jin, B.R., Je, Y.H. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe and effective tool for insect pest control. *J. Microbiol. Biotechnol*, v.17, n.4, p.547-559, 2007.

Rukmini, V., Reddy, C.Y., Venkateswerlu, G. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie*, v.82, p.109-116, 2000.

Ryu, D.D.Y., Nam, D-H. Biomolecular engineering: a new frontier in biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 10, p.23–37, 2000.

Sali, A., Blundell, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J Mol Biol*, v.234, p.779-815, 1993.

Schnepf, E., Crickmore, N., Rie, J.V, Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Deam, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.62, n.3, p.775-806, 1998.

Scott, J.K., Barbas III, C.F. Phage-display vectors. In: Barbas III, C.F., Burton, D.R., Scott, J.R., Silverman, G.J. *Phage Display: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. C.F., p. 1.1-1.37, 2001.

Segato, S.V., Mattiuz, C.F.M., Mozambani, A.E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: Segato, S.V., Pinto, A.S., Jendiroba, E., Nóbrega, J.C.M. (Organizadores) - vários autores. *Atualização em produção de cana-de-açúcar*. Piracicaba, 415p, 2006.

Sergeeva, A., Kolonin, M.G., Molldrem, J.J., Pasqualini, R., Arap, W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 58, n.15, p. 1622-1654, 2006.

Shu, C., Yu, H., Wang, R., Fen, S., Su, X., Huang, D., Zhang, J., and Song, F. Characterization of two novel *cry8* genes from *Bacillus thuringiensis* strain BT185. *Curr. Microbiol*, v.58, p.389-392, 2009.

Silva, M.C.M., Figueira, E.L.Z., Sá, M.F.G. A Metodologia de DNA *Shuffling* na produção de diversidade gênica. Documentos/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 30p, 2003.

Sindaçúcar 2003. Broca gigante causa redução acima de 10% na cana. Acessado na internet em outubro de 2004. No site: <http://zoonews.com.br/noticias2/noticia.php?idnoticia=8545>

Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v.228, p.1315-1317, 1985.

Soberón, M., Fernández, L.E., Pérez, C., Gill, S.S., Bravo, A. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon*, v.49, p.597-600, 2007.

Soltes, G., Hust, M., Ng, K. K. Y., Bansal, A., Field, J., Stewart, D. I.H., Dübel, S., Cha, S., Wiersma, E. J. On the Influence of Vector Design on Antibody Phage Display. *Journal Biotechnology*, v.127, n.4, p.626-637, 2007.

Stemmer, W.P.C. Rapid evolution of a protein *in vitro* by *DNA shuffling*. *Nature*, v.370, p. 389-391, 1994.

Stemmer, W.P.C. Molecular breeding of genes, pathways and genomes by *DNA shuffling*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 19-20, p.3-12, 2002.

Van Frankenhuyzen, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.101, p.1-16, 2009.

Warren, G.W., Carozzi, N. B., Desai, N., Koziel M. Field evaluation of transgenic tobacco containing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. *Journal of Economical Entomology*, v.85, n. 5, p.1651-1659, 1992.

Webster, R.E. Biology of the Filamentous Bacteriophage. In: Kay, B.K., Winter, J., McCafferty, J. Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual. Academic Press, California, p.1-23, 1996.

Webster, R. Filamentous phage biology. In: Barbas III, C.F., Burton, D.R., Scott, J.R., Silverman, G.J. Phage Display: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. C.F., p. 1.1-1.37, 2001.

Whiteley, H.R, Schnepf, H.E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Microbiol*, v.40, p.549-76, 1986.

Willats, W.G.T. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology*, v.50, p.837-854, 2002.

Wolfersberger, M., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F. V., Giordana, B., Hanozet, G. M. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comparative Biochemistry and Phisiology*, v.86, n.2, p.301-308, 1987.

Wolfersberger, M.G. V-ATPase-energized epithelia and biological insect control. *J Exp Biol*, v. 172, p.377-86, 1992.

Wu, D., Aronson, A.I. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n.4, p.2311-2317, 1992.

Xiang, W. F., Qiu, X.L., Zhi, D. X. and Min, Z.X. N546 in β 18- β 19 loop is important for binding and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *J Invertebr Pathol*, v.101, p.119-123, 2009.

Yamamoto, T., Cong, R., Cerf, D., McBride, K. DNA shuffling of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. Documentos Embrapa Soja (184), p. 156-159, 2002.

Yuan, L., Kurek, I., English, J., Keenan, R. Laboratory-directed protein evolution. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.69, n.3, p.373-392, 2005.

Zhang, X., M. Candas, N. B. Griko, R. Taussig, and L. A. Bulla Jr. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. Proc Natl Acad Sci USA , v.103, p.9897-9902, 2006.

Zhao, H., Arnold, F.H. Optimization of *DNA shuffling* for high fidelity recombination. Nucleid Acids Research, v. 25, n.6, p.1307-1308, 1997.

Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J. A., Arnold, F. H. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination. Nat. Biotechnol., v.16, p.258–261, 1998.

Zhao, J-Z., Cao, J., Collins, H.L., Bates, S.L., Roush, R.T., Earle, E.D., Shelton, A.M. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. PNAS, v. 102, n.24, p.8426-8430, 2005.

ANEXO



Variant Cry1Ia toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer

Kilvia I.C. Craveiro^{a,b,c}, José Edilson Gomes Júnior^{a,b}, Maria Cristina M. Silva^a, Leonardo L.P. Macedo^{a,d}, Wagner A. Lucena^{a,e,f}, Marília S. Silva^g, José Dijair Antonino de Souza Júnior^{a,b}, Gustavo R. Oliveira^{a,e,i}, Mariana T. Quezado de Magalhães^{a,e}, Antônio D. Santiago^h, Maria Fatima Grossi-de-Sa^{a,d,*}

^a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB-Final W5 Norte, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brazil

^b Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brazil

^c Embrapa Transferência de Tecnologia, PqEB-Final Av. W5 Norte, CEP 70770-901, Brasília, DF, Brazil

^d Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SGAN 916-Av. W5 Norte, CEP 70790-160, Brasília, DF, Brazil

^e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, CP 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^f Embrapa Algodão, Rua Oswaldo Cruz 1143, Centenário, CP 174, Campina Grande, PB, Brazil

^g Embrapa Cerrados, BR 020 Km 18, CP 08223, CEP 73310-970, Planaltina, DF, Brazil

^h Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar 3250, Jardins, CP 44, CEP 49025-040, Aracaju, SE, Brazil

ⁱ Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2009

Received in revised form 3 November 2009

Accepted 12 November 2009

Keywords:

Telchin licus licus

Bacillus thuringiensis

Saccharum officinarum

Brush Border Midgut Vesicles

Phage-display

Molecular modelling

ABSTRACT

Sugarcane giant borer (*Telchin licus licus*) is a serious sugarcane pest in Americas whose endophytic lifestyle hampers effective chemical and biological controls. Therefore, development of alternative control methods is extremely important. Envisaging development of transgenic plants resistant to this pest, we investigated the effect of the *Bacillus thuringiensis* Cry protein Cry1Ia12synth (truncated protein lacking C-terminus with plant codon usage) and variants against *T. l. licus*. *cry1Ia12synth* gene was used to generate mutated variants, which were screened for toxicity toward *T. l. licus*. For that purpose, an innovative technique combining *cry* gene shuffling with phage-display was used to build a combinatorial library comprising 1.97×10^5 Cry1Ia12synth variants. Screening of this library for variants binding to *T. l. licus* Brush Border Midgut Vesicles led to the identification of hundreds of clones, out of which 30 were randomly chosen for toxicity testing. Bioassays revealed four variants exhibiting activity against *T. l. licus* as compared to the non-toxic Cry1Ia12synth. Eight single substitutions sites were found in these active variants. Based on theoretical molecular modelling, the probable implications of these mutations are discussed. Therefore, we have four genes encoding Cry1Ia12synth variants active against *T. l. licus* promising for future development of resistant transgenic sugarcane lines.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Despite technological advances, sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) culture still faces several phytosanitary problems and plant predators. Sugarcane giant borer, *Telchin licus licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae), is one of the most important insect pests of the sugarcane crop, occurring in several countries of the Americas (Mendonça et al., 1996). The *T. l. licus* caterpillar develops inside the sugarcane stem, survives from one season to the next and causes significant annual economical losses (Mendonça, 1982). This endophytic lifestyle hampers the effectiveness of chemical,

mechanical and biological control methods. The damage caused by this insect pest involves destruction of the basal internodes, reduction of sucrose, and formation of galleries that may compromise the entire diameter of the stem. This facilitates secondary infections by other insects and even more frequently by microorganisms (Mendonça et al., 1996). Therefore, the search for new alternatives for the control of this pest is of great importance for sugarcane producers.

In this context, a *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) encoded entomotoxic protein (Cry) has been investigated for potential control of sugarcane giant borer neonate larvae. *Bt* is an aerobic, gram-positive bacterium that synthesizes crystalline inclusions during its sporulation that are composed of one or more Cry toxins and/or Cyt toxins (Höfte and Whiteley, 1989; Silva-Werneck and Ellar, 2008). Cry toxins are presently classified into 58 types (Cry1–Cry58) and many sub-types (e.g. Cry1Aa and Cry1Ba) based on their amino acid sequence similarity. They are active against a limited number of

* Corresponding author at: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB-Final W5 Norte s/n, CP 02372, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brazil.
Tel.: +55 61 3448 4902; fax: +55 61 3340 3624.

E-mail address: fatimasa@cenargen.embrapa.br (M.F. Grossi-de-Sa).

susceptible insect species (including lepidopterans, coleopterans and dipterans) and also against nematodes (Bravo and Soberón, 2008). A major group of Cry toxins is the three-domain (3D)-Cry family, members of which share similarities in sequence and structure. At least two different hypotheses have been proposed to explain the mode of action of these toxins, one relating to formation of pores in the target insect midgut and the other involving signal transduction. For both models, the first step is similar, i.e. the crystals are ingested by the larvae and solubilised in the midgut into protoxins. These are cleaved by midgut proteases to give rise to an active 60 kDa 3D-Cry toxin. The activated toxin binds to a cadherin receptor that is located in the midgut microvilli (Bravo and Soberón, 2008). The pore formation model suggests that this interaction with a cadherin receptor facilitates the proteolytic removal of the Cry α 1-helix, triggering toxin oligomerisation that results in pore formation, causing larval death. In contrast, the signal transduction model proposes that binding of monomeric toxin to a cadherin receptor activates an adenyl cyclase/protein kinase A magnesium-dependent signalling pathway, resulting in cell lysis (Bravo and Soberón, 2008; Zhang et al., 2006).

The spectrum of insects controlled by *Bt* can be broadened by directed molecular evolution techniques, such as DNA shuffling (Lassner and Bedbrook, 2001). DNA shuffling coupled with the phage-display technique has been valuable for the generation of genetic diversity and for selection of variants showing binding affinity to specific protein targets. DNA shuffling is an *in vitro* recombination method that uses small homologous DNA sequence fragments as substrates for PCR reactions, aiming to produce populations of gene variants (Stemmer, 1994; Zhao and Arnold, 1997). This technique has been used for several applications in different fields, including the generation of new molecules conferring resistance to insect pests (Patten et al., 1997). The phage-display approach involves the presentation of peptide and protein libraries on the surface of phage particles for facilitated selection of proteins with high affinity and specificity for a determined target (Willats, 2002).

In a previous study, it was reported that Cry11a12 protein exhibits considerable toxicity against the lepidopteran fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), indicating a potential for activity against other lepidopteran species (Grossi-de-Sa et al., 2007). Since the *cry11a12* gene was isolated by our research group and our bank of *cry* genes is still under construction, the *cry11a12* gene was therefore used to initiate the prospection and development of Cry toxins against *T. l. licus*. For this purpose, the nucleotide sequence of the original *cry11a12* gene was first changed to accommodate plant codon usage, resulting in *cry11a12synth*. Considering that Cry11a12synth is not toxic to *T. l. licus*, the aim of this work was to use the *cry11a12synth* gene to generate and select protein variants with toxicity towards *T. l. licus*. Then, DNA shuffling coupled with phage-display was used to generate a *cry11a12synth* combinatorial library. Screening of this combinatorial library for *cry11a12synth* variants that bind to Brush Border Midgut Vesicles (BBMVs) of *T. l. licus* resulted in the identification of new *cry11a12synth* molecules with entomotoxicity towards sugarcane giant borer larvae.

2. Materials and methods

2.1. Midgut dissection

T. l. licus second and third instar larvae, available in the field solely during part of sugarcane season, were collected in a sugarcane plantation in Maceió, AL, Brazil. The larval midguts were extracted and transferred to a microcentrifuge tube with MET buffer (300 mM mannitol, 5 mM EGTA, 17 mM Tris, pH 7.5) containing 1 mM PMSF. Then, midguts were centrifuged at 2500 \times g for 5 min at 4 °C, the pellet was washed twice with MET buffer. The

resulting pellet, enriched with midguts, was stored at –80 °C until use.

2.2. Preparation of brush border membrane vesicles (BBMVs)

Preparation of BBMVs from the dissected midguts of *T. l. licus* larvae was performed by using the precipitation method described by Wolfersberger et al. (1987). The concentration of BBMVs proteins was determined by the Bradford assay (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (BSA) as the standard for the calibration curve.

2.3. *cry11a12synth* gene

Previously, the *B. thuringiensis* S811 Brazilian strain, obtained from the collection of EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology, was used to isolate the *cry11a12* gene (Grossi-de-Sa et al., 2007) (GenBank accession no. AY788868). For the present work, the original *cry11a12* nucleotide sequence coding solely for the truncated toxin (lacking the C-terminus, i.e. consisting of the N-terminus and the domains I–III) was changed in order to accommodate plant genetic codon usage and named *cry11a12synth*. The *cry11a12synth* gene (1944 bp) was synthesized by Epoch Biolabs, Texas, US and cloned into the pBluescript II vector (Stratagene). The resulting sequence of *cry11a12synth* gene was deposited in the NCBI gene databank under accession number FJ938022.

2.4. DNA shuffling

First, the *cry11a12synth* gene was excised from the pBluescript II harbouring vector by digestion at 37 °C for 16 h under the following conditions: 5 μ g plasmid DNA, 10 U *Not* I (Promega), 20 U *Sal* I (New England Biolabs), 1 \times Buffer D (Promega), 10 μ g/mL BSA, in a 20 μ L final volume. The digestion products were analysed by 1% agarose gel electrophoresis and the fragment corresponding to the *cry11a12synth* insert (1944 bp) was excised and purified from the agarose gel using the GeneClean II Kit (Bio 101). Then, 10 μ g of the purified *cry11a12synth* gene was digested with 12.5 U of DNase I (Invitrogen) at 15 °C for 15 min and then interrupted by addition of 5 μ L of 0.5 M EDTA. Resulting fragments of 30–50 bp were jointly purified from a 2.5% agarose gel by using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Ten microlitres of the pool of purified fragments was used as template in a PCR without primers in a 25 μ L final volume containing 0.4 mM dNTPs, 1 mM MgSO₄ and 2.5 U Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), in 5 \times Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity buffer. The conditions of the primerless PCR were: 2 min 95 °C; 44 cycles: 1 min 95 °C, 1 min 42 °C and 1 min 72 °C (with a 5 s increase in extension time per cycle); with a final step of extension for 7 min at 72 °C. The products of the primerless PCR (1.5 μ L) were used as template for a second PCR, containing the forward primer *Cry11a12synth*FOR (5'-CCCGG-CCCAGGCGGCCATGAACTCAAGAAC-3') and the reverse primer *Cry11a12synth*REV (5'-CCGGCCGGCCTGGCCTTCGTAAGTAACTTC-3'). Both primers encode a *Sfi* I site, which is adequate for later cloning into the pCOMB3X phagemid (Andris-Widhopf et al., 2000). The second PCR, performed in a 100 μ L final volume, contained 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgSO₄, 0.8 μ M each primer, 5 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) and 5 U Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), in 1 \times Platinum *Taq* Buffer. The conditions for the second PCR were: 2 min 95 °C; 10 cycles: 30 s 95 °C, 1 min 42 °C and 1 min 72 °C; followed by 14 cycles: 1 min 95 °C, 1 min 42 °C and 1 min 72 °C (with 20 s increase in extension time per cycle); with a final step of extension for 10 min at 72 °C. The second PCR product corresponding to the DNA shuffling product was analysed by 1% agarose gel electrophoresis

and the only band of approximately 1944 bp, corresponding to a population of *cry11a12synth* variants, was excised and purified with the GeneClean II Kit (Bio 101).

2.5. Phage display combinatorial library construction

The DNA shuffling product and the pCOMB3X phagemid were both digested with the restriction enzyme *Sfi* I. The resulting digestion products were separated by agarose gel electrophoresis and purified with the GeneClean II Kit (Bio 101). The purified DNA shuffling product (1 µg) was ligated into the pCOMB3X phagemid (3.5 µg) in a reaction containing 18 U T4 DNA Ligase (Invitrogen) in 200 µL final volume. The ligation product was dialysed, lyophilised, dissolved in 15 µL H₂O and then fractionated into five aliquots. Each aliquot containing 3 µL was used to transform 60 µL *E. coli* XL1-Blue electrocompetent cells (Stratagene). The procedure was repeated five times and the product of all the bacterial transformations, harbouring the phagemids encoding *cry11a12synth* gene variants, were cultivated for 1 h at 37 °C in SB medium (1% MOPS, 2% yeast extract, 3% tryptone, pH 7.0) containing carbenicillin at 20 µg/mL and tetracycline at 10 µg/mL. Afterwards, carbenicillin was added to 30 µg/mL and the cultivation proceeded for 1 h at 37 °C. M13 fusion phages were then produced by the sequential addition of pre-warmed SB medium at 37 °C, carbenicillin to 38 µg/mL, tetracycline to 7.75 µg/mL and 10¹² plaque-forming units (pfu)/mL of helper phage (VCSM13 Stratagene). The culture was incubated for 2 h at 37 °C under agitation at 250 rpm. After adding 70 µg/mL kanamycin, the culture was incubated for 16 h at 37 °C under agitation at 250 rpm. The resulting M13 phages consisted of fusions between protein III of the phage capsid coding region and the *cry11a12synth* gene. In order to determine the library titre, an aliquot of the original culture was plated on selective LB-agar (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chloride, pH 7.0, containing 1.4% agar and 100 µg/mL carbenicillin). After incubation at 37 °C for 16 h, the number of plaques was counted and used to calculate the library titre.

2.6. Selection of the *cry11a12synth* gene variants (biopanning)

The biopanning procedure was performed as described by Rader et al. (2001), with some modifications. Briefly, at each round, wells in a microtitre plate were coated with BBMV preparation (100 µg) and incubated 16 h at 4 °C. After coating, fusion phages in solution were added and incubated for 2 h at 37 °C. Several washing cycles were performed with PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM Na₂HPO₄ and 1.2 mM KH₂PO₄) containing 0.1% Tween 20. The retained M13 fusion phages were eluted (in 0.2 M glycine, pH 2.2) and used for transfection into *E. coli* cells, to be amplified for further selection rounds. In order to determine the titre of the phage specifically bound to BBMVs that were recovered in each selection cycle, an aliquot of the eluted phage was diluted 100 times and plated onto SB-agar containing 100 µg/mL carbenicillin. The biopanning cycle exhibiting the highest number of colony-forming units (cfus) was taken as the “cycle of enrichment of specifically bound phages”. In this study, the biopanning procedure consisted of five rounds. The clones isolated from the enriched cycles were analysed to verify the integrity of the inserted *cry11a12synth* variant genes via colony PCR, using primers *Cry11a12synth*FOR and *Cry11a12synth*REV. The clones that presented amplicons around 1944 bp in length were further used for expression of *Cry11a12synth* variant proteins.

2.7. Expression of *Cry11a12synth* variants in fusion phage

The *cry11a12synth* variants exhibiting size integrity (1944 bp) and the DNA shuffling parental gene *cry11a12synth* were expressed on the surface of M13 phage. Bacteria harbouring the fusion phage

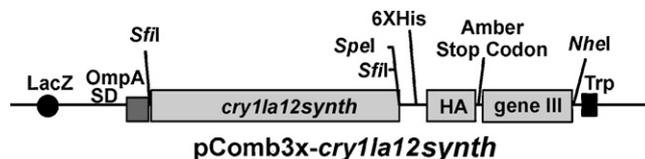


Fig. 1. Schematic representation of the expression cassette of the pCOMB3X-*cry11a12synth* phagemid construct, for expression of the protein *Cry11a12synth* displayed on the surface of filamentous M13 phage. Similar constructs containing shuffled *cry11a12synth* inserts were built to display the *Cry11a12synth* variants on the surface of M13 phage particles. LacZ: LacZ inducible operon. SD: One ribosome binding sites (Shine Dalgarno) give rise to separate polypeptides that are directed by the *pelB* signal peptide to the periplasm. OmpA: Signal peptide. *Sfi*I, *Spe*I and *Nhe*I: Restriction sites. *cry11a12synth*: *cry* gene expressed as a fusion with M13 phage protein III (encoded by the virus). 6XHis: Six histidine-tag coding sequence. HA: Epitope for immunodetection by hemagglutinin antibodies. Amber Stop Codon: TAG stop codon that allows production of free and fusion heterologous proteins. gene III: Coding region of M13 phage Protein III. Trp: Transcription termination. Schematic figure adapted from Scott and Barbas (2001).

were cultivated in SB medium containing 100 µg/mL carbenicillin, 5 µg/mL tetracycline and 100 µg/mL kanamycin for 16 h at 37 °C under stirring (250 rpm). The culture supernatant was collected, precipitated with PEG-NaCl (20% Polyethylene-Glycol 8000, 15% NaCl) for 30 min at 4 °C and then centrifuged at 4300 × *g*. The precipitate was dissolved in TBS (5 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, pH 7.5), centrifuged, and the supernatant (containing the fusion phages) was collected and stored at 4 °C until use. Dot blot analysis by immunodetection of the hemagglutinin (HA) epitope (present in the pCOMB3X phagemid – Fig. 1) fused to the variant proteins was used to evaluate the presence or absence of the *cry11a12synth* variant fusion genes expressed on the phage. The concentration of the recombinant *Cry11a12synth* variant proteins was quantified by ELISA, using a polyclonal rabbit anti-*Cry11* previously obtained in our lab (data not shown).

2.8. Bioassays of the anti-*T. l. licus* activity of *Cry11a12synth* and its variants

To assess the toxicity of the fusion phage-expressed *Cry11a12synth* and variants to sugarcane giant borer larvae, bioassays were carried out in 96-well microplates. Each well contained a 50 µL mixture of sterilised liquid artificial diet (2% casein, 1% yeast extract, 6% white sugar, 1% ascorbic acid, 1.1% vitamins, 0.75% Wesson salt mixture, 0.03% cholesterol, 0.03% sodium benzoate, 100 µg/mL ampicillin, 0.2% cholin chloride 50% and water) and 10 µg/mL of phage-expressed *Cry11a12synth* or variants deposited on a solid support (1 cm² of a commercial porous sponge of 0.5 mm thickness). One *T. l. licus* neonate larva was then placed into each well, and the microplate was incubated at 28 ± 1 °C, 80 ± 10% relative humidity and 12 h photoperiod. For the negative control treatment, the artificial diet without addition of *Cry11a12synth* or variants was used. Each treatment was repeated four times and each replicate contained 10 larvae. After 4 days, percent mortality was recorded for each treatment. Statistical analyses were performed to compare the average percent mortalities by using ANOVA and the Tukey's test at the probability level of 5% (Cruz, 2001).

2.9. DNA sequencing

The *cry11a12synth* variant genes that exhibited proteins significant toxicity against *T. l. licus* in the bioassays had their nucleotide sequences determined using a 3130xL Genetic Analyzer automatic sequencer (Applied Biosystems). The forward and reverse primers used for sequencing N and C-terminal coding ends were: MMB4 (5'-GCTCCGGCTCGTATGTTGTGT-3')

and MMB5 (5'-CGTCCATTGCATTCTTTAAT-3'), respectively. The primers TLL3IF (5'-TGTGTCAGCCAATATATCG-3') and TLL3IR (5'-GTTGCCGTGTGGTTCTCCT-3') were designed to determine the variants' intermediate sequences. The nucleotide sequences were analysed using the BLASTn and BLASTx algorithms (Altschul et al., 1997), available on the web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Sequence alignments were performed by the ClustalW program (Thompson et al., 1994), available on the web (<http://www.expasy.org/>). In order to assemble the sequenced fragments and identify the positions of the mutated residues, the variant sequences were compared with the *cry11a12synth* parental sequence using the Staden Package program (Staden, 1996).

2.10. Molecular modelling

Sequence homology to Cry11a12synth was sought in the Protein Database Bank—PDB at the NCBI web site by using BLASTp with default parameters (Altschul et al., 1997). The resulting sequence set was aligned by using MUSCLE (Edgar, 2004) and further analyzed with JALVIEW (Clamp et al., 2004). After manual refinement of the sequence alignment, a homology model of Cry11a12synth and four variants was generated using MODELLER, Version 9.6 (Sali and Blundell, 1993). Default regimes of model refinement by energy minimisation and simulated annealing were employed. A rigorous interactive modelling protocol was adopted in which 20 models were constructed and analysed for each variant alignment. These models were analysed for stereochemical properties by using PROCHECK (Laskowski et al., 1993). When no further improvements could be achieved, the model with the best PROCHECK score was taken as the final model. Diagrammatic representations of the structures were generated by using PyMOL (DeLano, 2002).

3. Results

3.1. Generation of a *cry11a12synth* combinatorial library

The *cry11a12* gene (Grossi-de-Sa et al., 2007) had its nucleotide sequence modified (hereafter referred to as *cry11a12synth*) to conform to plant codon usage, facilitating its future use in plants for transgenic protection against insect pests. Besides changes in codon usage, the *cry11a12synth* gene coding sequence was also reduced to comprise only the active part of the original *cry11a12* molecule. Thus, the C-terminal domain, known to be dispensable for the toxicity of Cry proteins, was deleted. Consequently, the *cry11a12synth* gene is comprised of a 1944 bp open reading frame encoding a predicted protein of 648 residues, whereas the *cry11a12* gene is 2160 bp long and encodes a protein of 719 amino acids. For DNA shuffling purposes, the purified *cry11a12synth* parental gene was fragmented with DNaseI. The resulting fragments in the 30–50 bp range were recombined by primerless PCR. After a subsequent PCR reaction containing suitable primers to recover mutated *cry11a12synth* sequences, a population of *cry11a12synth* variants was obtained and visualised as a 1944 bp band (data not shown). This band was excised from the gel, purified and cloned into the pCOMB3X phagemid between two *Sfi* I restriction sites (Fig. 1). XL-1 Blue *E. coli* cells transformed with the resulting pCOMB3X-*cry11a12synth* constructs generated a phage-display combinatorial library of *cry11a12synth* variants containing 1.97×10^5 colony-forming units (cfu)/mL (Fig. 2).

3.2. Selection of *Cry11a12synth* variants binding to *T. l. licus* BBMVs (biopanning)

In order to select the clones expressing Cry11a12synth variants that bind specifically to the *T. l. licus* midgut, the phage-display com-

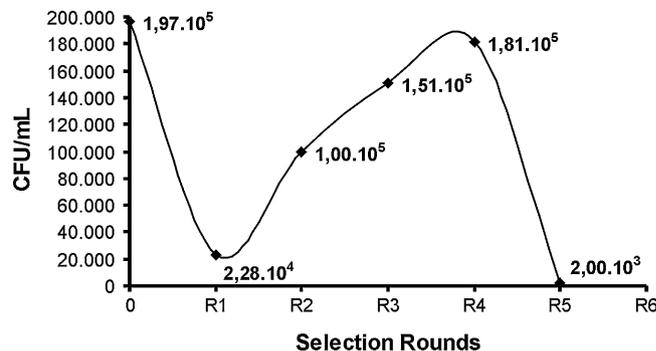


Fig. 2. Biopanning screening of the *cry11a12synth* Phage display combinatorial library for interactions of Cry11a12synth variants with Brush Border Midgut Vesicles (BBMVs) from sugarcane giant borer larvae (*T. l. licus*). The graph shows the number of phage-infected bacterial colonies obtained from each round of biopanning. In the second and third rounds of biopanning occurred the enrichment of recombinant phages displaying Cry11a12synth variants specifically bound to *T. l. licus* BBMVs. The points of the curve indicate the library titres in colony-forming units (cfu)/mL.

binatorial library was used for biopanning. Five selection rounds were performed. The second and third rounds were chosen since they yielded phage showing the highest binding specificity to *T. l. licus* BBMVs (Fig. 2). Four hundred randomly chosen clones from the second and third rounds exhibited amplicons corresponding to the original gene size of 1944 bp (data not show). The expression of the variant proteins was confirmed by dot blot detection of the hemagglutinin (HA) epitope fused to the variant proteins. A reaction signal was observed in the dot blot for most of the analysed clones (data not shown). Thirty clones that showed an expression signal in the dot blot analyses were randomly selected for further analysis of activity against *T. l. licus*.

3.3. Bioassays of the anti-*T. l. licus* activity of *Cry11a12synth* and its variants

Bioassays to test the activity of Cry11a12synth and the 30 selected Cry11a12synth variants against *T. l. licus* were conducted by feeding neonate larvae an artificial diet containing 10 µg/mL of the proteins expressed in fusion with M13 phage. Incubation of larvae either with a Cry11a12synth protein-supplemented diet or a diet with no supplementation (negative control) resulted in a mortality rate of about 25%, indicating that Cry11a12synth protein is not active against *T. l. licus* at the concentration tested (Fig. 3). On the other hand, four out of the thirty Cry11a12synth variants tested had a statistically significant effect on *T. l. licus* as compared to the non-supplemented diet (Fig. 3). The analysis of variance was significant for the mortality rates of these four variants ($F=20.10$; $p<0.0001$). Statistical analysis to compare the average mortality rate revealed that the variants had similar toxicity to each other and higher toxicity than Cry11a12synth (Fig. 3).

3.4. Analysis of the mutations in the active *Cry11a12synth* variants

The four Cry11a12synth variants previously demonstrated to be active against *T. l. licus* were sequenced, and after assembly and alignment analysis, these new variant sequences were deposited in the NCBI gene databank under assigned accession numbers FJ938023 to FJ938026, respectively corresponding to *cry11a12synth* variants 1–4. The *cry11a12synth* gene and its four shuffled variant genes encode proteins of 648 amino acid residues. Sequence alignments comparing parental *cry11a12synth* and its variants identified numerous nucleotide substitutions. Most of these nucleotide substitutions resulted in silent mutations, but a few resulted in amino acid residue substitutions (mutations). No deletions were obtained

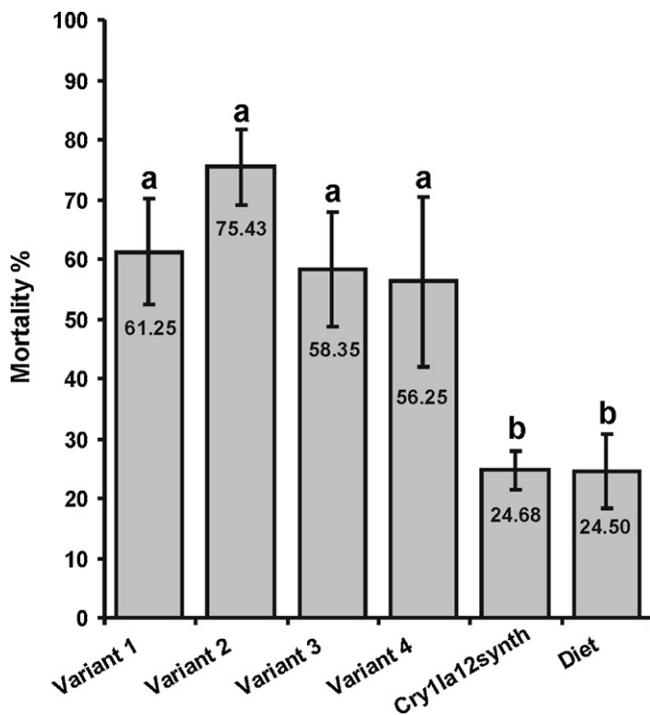


Fig. 3. Bioassays of Cry11a12synth and variants against *T. l. licus*. Treatments consisted of artificial diet supplemented or without Cry11a12synth protein or its variants. Average mortality rates (%) are plotted (vertical bars) and corresponding values are indicated. The standard deviation is indicated for each treatment (vertical lines). Average mortality rate values with different letters differ from each other by the Tukey's test at a probability of 5%.

(Table 1). Most of the changes in amino acid sequence were found in domain I, with a few changes found in domain III and none in domain II (Table 1).

To try to predict the effects of the mutations on structure and function, theoretical models were built for Cry11a12synth and the four variants by using Cry8Ea1 and Cry3Bb1 (PDB entries 3EB7 and 1J16, respectively) (Galitsky et al., 2001; Guo et al., 2009) as templates. Models were chosen for Cry11a12synth and its variants according to PROCHECK analysis. In the template crystal structures chosen (i.e. E3B7 and 1J16) there are no defined atomic coordinates to serve as templates to model N- and C-termini of the Cry11a12synth variant structures. Therefore, the models of the Cry11a12synth variants correspond to residues 62–643 (residue numbers of the Cry primary sequences), lacking the N- and C-termini but containing the three conserved domains of the Cry toxin structure (Fig. 4A).

The theoretical tertiary structure of Cry11a12synth depicts the location of the eight substitutions present in variants 1–4 (Fig. 4A). Three substitutions are located in domain I (Fig. 4A): (i) I116T, in variant 3, located in the loop between alpha2b and alpha3; (ii)

D233N, in all variants except for variant 3, located in helix $\alpha 6$; and (iii) L266F, in variant 3, located in helix $\alpha 7$. Two mutations were found in domain III: (i) K580R, in variant 3, located in strand $\beta 16$; and (ii) E639G, in variant 1, located in strand $\beta 19$.

4. Discussion

The gene *cry11a12*, previously isolated by our group from *B. thuringiensis* S811 strain, encodes a protein proven to be highly effective against the lepidopteran species *S. frugiperda*. In the present work, we generated a combinatorial phage-display library of variants of *cry11a12synth* via DNA shuffling and successfully identified four variants with optimised activity against *T. l. licus*.

In the last decade, directed molecular evolution techniques, such as DNA shuffling, have been employed in the agricultural research to create genes, such as the *cry* genes, encoding insecticidal molecules for the development of transgenic insect-resistant plants (Lassner and Bedbrook, 2001). The DNA shuffling strategy used here was highly efficient for our purposes, as it generated 1.97×10^5 variants of *cry11a12synth*, out of which over 400 bound specifically to *T. l. licus* BBMV. Furthermore, four out of 30 tested variants presented activity against sugarcane giant borer neonate larvae when compared to the non-toxic Cry11a12synth.

In comparison to conventional bacterial expression systems, the phage-display system, in addition to providing soluble, ready-to-use protein, has advantages for the selection of variants that include speed, ease of use and low cost. However, previous studies (Kasman et al., 1998; Marzari et al., 1997) have encountered problems with the functionality of proteins displayed on M13 phage. It was found that the Cry1Aa toxin was not properly displayed, resulting in deletions of the fused protein. Moreover, despite the fact that Cry1Ac toxin displayed by M13 phage retained its toxicity against *Manduca sexta* larvae, there was no binding to functional insect midgut receptors *in vitro*, suggesting structural restrictions of the displayed toxin (Pacheco et al., 2006). In spite of these limitations previously related in the literature, our group apparently established optimal conditions that overcame such constraints to successfully express Cry11a12synth protein variants with the M13 phage-display system.

When considering the four Cry11a12synth variants active against sugarcane giant borer larvae, eight mutation sites of amino acid substitutions were found. Out of these eight, half resulted in substitutions of nonpolar residues, whereas the other half resulted in substitution of charged residues. Moreover, it was observed that most of these mutations were found in domain I of the Cry11a12synth active variants. One of the roles of the Cry domain I is the insertion of the protein into the membrane. Dean et al. (1996) using Y153D, Y153A and Y153R substitutions in Cry1Ab domain I, demonstrated that the negatively charged residue D was less favourable for toxin insertion into membranes than the positively charged R or neutral A residues. Another biological role attributed to Cry domain I is the formation of pores. Girade et al. (2009) demonstrated with Cry1Aa mutations in the $\alpha 4$ and $\alpha 5$ helices and the $\alpha 3$ – $\alpha 4$ and $\alpha 5$ – $\alpha 6$ adjacent loops that these regions have an important role in the pore formation mechanism. Therefore, mutations located in domain I of the Cry11a12synth variants may have influenced their insertion into the membrane or pore formation in the midgut of *T. l. licus*.

In our work, two mutations in active Cry11a12synth variants were found in domain III, a domain associated with protection of Cry from proteolysis, with receptor binding and with regulation of pore formation (Flores et al., 1997). In this respect, there is evidence that domain III of Cry proteins is involved in binding to membrane proteins of the *Spodoptera exigua* midgut, demonstrating that domain III of Cry1C can play an important role in toxicity to insect pests (de Maagd et al., 1996).

Table 1
Mutations present in Cry11a12synth variants.

Variant	Substitution mutation	Domain
1	D233N	I
	E639G	III
2	D233N	I
3	I116T	I
	L266F	I
	K580R	III
4	M45V	N-terminus
	D233N	I

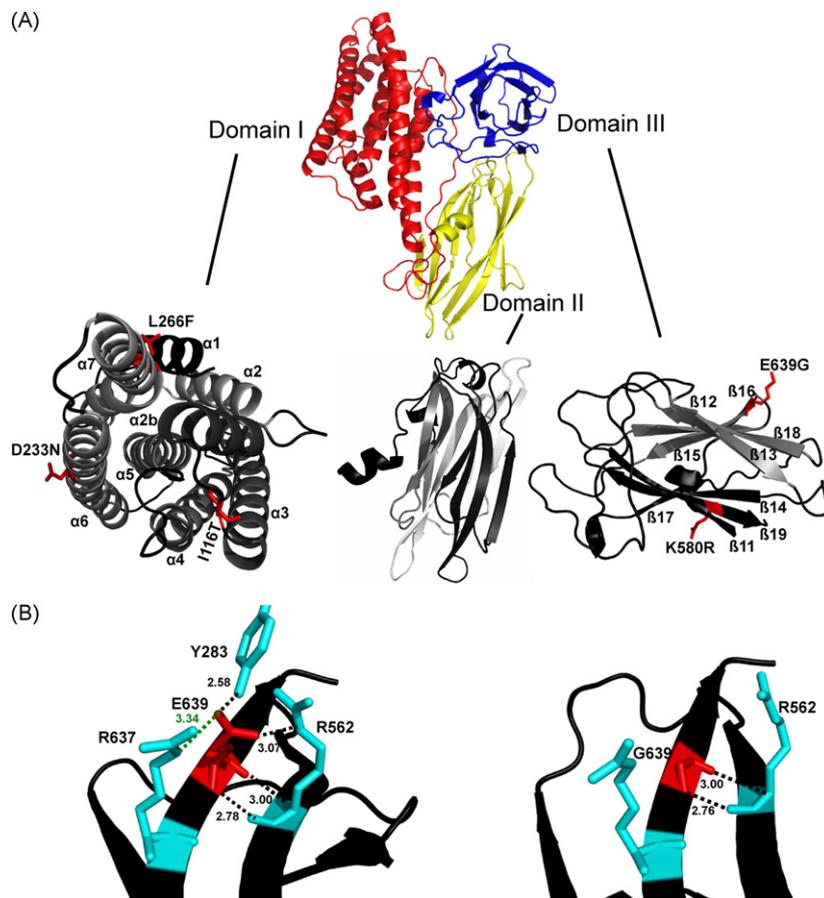


Fig. 4. Theoretical models of Cry11a12synth and variants. (A) A Cry11a12synth ribbon diagram, as viewed using PyMOL, is depicted at the top of panel A. Domain I is shown in red, domain II in yellow and domain III in blue. Separate models of each Cry11a12synth domain is shown in detail at the bottom of panel A. α -helices and β -strands are identified. Amino acid single substitutions present in the variants are coloured in red. The black dashed lines represent hydrogen bonds and the green dashed lines represent salt bridges. (B) Details of an amino acid substitution present in Cry11a12synth variant 1 (right), as compared to the parental Cry11a12synth (left). The variant 1 presents the mutation E639G, located in the β 19 strand in domain III. The model on the left depicts the interactions between residue E639 (in red) and residues Y283 (from block 2), R562 (from block 4) and R637 (from block 5) (in cyan). These interactions are disrupted in Cry11a12synth variant 1 (right).

Taken alongside previous data in the literature, our molecular modelling analysis provides potential explanations for the activity of the four variants:

- (i) In all Cry proteins, there are three conserved blocks, denoted blocks 2, 4 and 5, that are associated with the functionality of the toxins (Schnepf et al., 1998). In reference to the mutation E639G found in variant 1, G639 interacts solely with residue R562 from block 4 through two hydrogen bonds of around 3 Å, whereas in the Cry11a12synth protein, E639 interacts with Y283 from block 2 through a hydrogen bond of 2.58 Å, with R562 from block 4 through three hydrogen bonds of around 3 Å, and with R637 from block 5 through a salt bridge of 3.34 Å (Fig. 4B). Moreover, the mutation E639G of variant 1 is located in the β 19 strand of domain III, a domain associated with protection of the toxin from proteolysis, binding to midgut receptors, regulation of pore formation (Flores et al., 1997) and binding to insect midgut membrane proteins (de Maagd et al., 1996).
- (ii) Variant 2 contains the single mutation D233N. The residue at this position, be it D233 or N233, invariably presents its side chain to the solvent environment. These residues neither interact with nor belong to any region known to be relevant to the entomotoxic activity of Cry proteins. Nevertheless, the substitution of an oxygen from D233 for a nitrogen in N233 makes this spot on the toxin less negative, which might affect the

interactions of the toxin with the solvent environment. To elucidate the role of this mutation in the functionality of variant 2, it would be interesting to perform modelling studies of molecular dynamics in order to better understand the movement of the side chain of residue 233 in relation to simulated changes in environmental conditions. Modelling studies of Cry11a12synth or variant 2 docking to the Cry receptor might also be revealing. Moreover, bench experiments involving site-directed mutagenesis of residue 233 and its consequences on interactions with the receptor and protein toxicity could shed light on the role of this residue in Cry functionality.

- (iii) Three mutations occurring in variant 3 seem to present an interactive effect on the variant's structure, and consequently probably also on the variant's biological activity. Concerning the mutation I116T, the oxygen of T116 interacts with the beta-carbon of residue A120. This residue corresponds to residue A92 from Cry1Ab, which is involved in the insertion of the Cry toxin into the insect midgut membrane (Chen et al., 1995). Regarding the mutation L266F, L266 has its side chain turned towards the residues E455 (domain II), D270 and R262 (domain I). Thus the aromatic ring of F266, which is a less reactive residue than L266, interferes with interactions between domains I and II. With respect to the mutation K580R, both K580 and R580 are turned towards the neighbouring N578, which corresponds to the Cry1Ac N546 residue demonstrated to be related to Cry1Ac toxicity (Xiang et al., 2009).

Since the first 61 residues corresponding to the N-terminal portion of Cry1Ia12synth were not modelled, the effect of the mutation M45V present in variant 4 could neither be modelled nor analysed.

This work presents a pioneering approach towards the generation and selection of new genes to be used in the development of transgenic sugarcane resistant to the giant borer *T. l. licus*, a pest that is extremely resistant to conventional control methods and for which there is no known natural source of resistance. It should be noted that additional experiments, such as site-directed mutagenesis and modelling studies of molecular dynamics and interactions with the receptor are needed to better understand the effects of the mutations present in the Cry1Ia12synth variants on the biological activity of these proteins against *T. l. licus*. It will be also interesting to test these toxins against to others insect pest and non-target beneficial insects. In conclusion, the Cry1Ia12synth variants 1 to 4 are active against sugarcane giant borer larvae and are therefore promising proteins for the future development of transgenic sugarcane resistant to insect pests.

Acknowledgments

The present work was performed with financial support from CNPq, CAPES and EMBRAPA. The authors thank: Dr. Andréa Maranhão (University of Brasília, Brazil) for kindly providing the pCOMB3X phagemid and support about phage-display approaches; Dr. Dan Rigden (University of Liverpool, UK) for critical reading; Mr. Luiz Avelar Brandão Góis (Phytosanity Supervisor, Usina Triunfo, AL, Brazil) for sending us the giant borer larvae and Dr. Eduardo Alano Vieira (EMBRAPA Cerrados, Planaltina, DF, Brazil) for the aid in statistical analyses.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Andris-Widhopf, J., Rader, C., Steinberger, P., Fuller, R., Barbas III, C.F., 2000. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by Phage display. *J. Immunol. Methods* 242, 159–181.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bravo, A., Soberón, M., 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.* 26, 573–579.
- Chen, X.J., Curtiss, A., Alcantara, E., Dean, D.H., 1995. Mutations in Domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 270, 6412–6419.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S.M., Barton, G.F., 2004. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* 20, 426–427.
- Cruz, C.D., 2001. Programa Genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Editora UFV, Viçosa.
- de Maagd, R.A., Kwa, M.S.G., Klei, V.D., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J.M., Stiekema, W.J., Bosch, D., 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1537–1543.
- Dean, D.H., Rajamohan, F., Lee, M.K., Wu, S.-J., Chen, X.J., Alcantara, E., Hussain, S.R., 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis—a minireview. *Gene* 179, 111–117.
- DeLano, W.L., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System on the World Wide Web.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Flores, H., Soberón, X., Sánchez, J., Bravo, A., 1997. Isolated domain II and III from the *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. *FEBS Lett.* 414, 313–318.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J.R., Pangborn, W., English, L., 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr., Sect. D.* 57, 1101–1109.
- Girade, F., Vachon, V., Lebel, G., Préfontaine, G., Scgwartz, J.-L., Masson, L., Laprade, R., 2009. Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788, 575–580.
- Grossi-de-Sa, M.F., Magalhães, M.Q., Silva, M.S., Silva, S.M.B., Dias, S.C., Nakasu, E.Y.T., Brunetta, P.S.F., Oliveira, G.R., Oliveira-Neto, O.B., Oliveira, R.S., Soares, L.H.B., Ayub, M.A.Z., Siqueira, H.A.A., Figueira, E.L.Z., 2007. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry1Ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40, 773–782.
- Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., Song, F., Zhang, J., Wu, X., Huang, D., Rao, Z., 2009. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J. Struct. Biol.* 168, 259–266.
- Höfte, H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242–255.
- Kasman, L.M., Lukowiak, A.A., Garczynski, S.F., McNall, R.J., Youngman, P., Adang, M.J., 1998. Phage display of a biologically active *Bacillus thuringiensis* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2995–3003.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.
- Lassner, M., Bedbrook, J., 2001. Directed molecular evolution in plant improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 152–156.
- Marzari, R., Edomi, P., Bhatnagar, R.K., Ahmad, S., Selvapandiyar, A., Bradbury, A., 1997. Phage display of a *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin. *FEBS Lett.* 411, 27–31.
- Mendonça, A.F., 1982. A broca gigante *Castnia licus* Drury, 1770 (Lepidoptera: Castniidae) no Brasil. *Saccharum APC*, São Paulo.
- Mendonça, A.F., Viveiros, A.J.A., Sampaio, F.F., 1996. A broca gigante da cana-de-açúcar, *Castnia licus* Drury, 1770 (Lep.: Castniidae). *Pragas da cana-de-açúcar. Insetos, Cia., Maceió*, pp. 133–167.
- Pacheco, S., Gómez, I., Sato, R., Bravo, A., Soberón, M., 2006. Functional display of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on T7 phage. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 45–49.
- Patten, P.A., Howard, R.J., Stemmer, W.P.C., 1997. Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 724–733.
- Rader, C., Steinberger, P., Barbas III, C.F., 2001. Selection from Antibody Libraries. In: Barbas III, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J. (Eds.), *Phage Display: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 10.1–10.20.
- Sali, A., Blundell, T.L., 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779–815.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Releclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775–806.
- Scott, J.K., Barbas III, C.F., 2001. Phage-display Vectors. In: Barbas III, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J. (Eds.), *Phage Display: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 2.1–2.19.
- Silva-Werneck, J.O., Ellar, D.J., 2008. Characterization of a novel Cry9Bb d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 320–328.
- Staden, R., 1996. The staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5, 233–241.
- Stemmer, W.P.C., 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Lett. Nat.* 370, 389–391.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Willats, W.G.T., 2002. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol. Biol.* 50, 837–854.
- Wolffersberger, M., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F.V., Giordana, B., Hanozet, G.M., 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* 86, 301–308.
- Xiang, W.F., Qiu, X.L., Zhi, D.X., Min, Z.X., 2009. N546 in β 18- β 19 loop is important for binding and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 119–123.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taussig, R., Bulla Jr., L.A., 2006. A mechanism of cell death involving an adenyllyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 9897–9902.
- Zhao, H., Arnold, F.H., 1997. Optimization for DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res.* 25, 1307–1308.