

## Inibidores de $\alpha$ -amilase: novas estratégias para identificação de inibidores com potencial para o controle de inseto-praga

Grossi-de-Sa, M.F.<sup>1,2</sup>; Del Sarto, R.P.<sup>1,3</sup>; Cruz, C.C.<sup>1</sup>; Rigden, D.J.<sup>4</sup>; Oliveira-Neto, O.B.<sup>1</sup>; Coutinho, M.V.<sup>1</sup>; Rocha, T.L.<sup>1</sup>, Silva, M.C.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia; <sup>2</sup>Universidade Católica de Brasília, <sup>3</sup> Universidade de Brasília- DF, Brazil, <sup>4</sup> University of Liverpool, United Kingdom

e-mail:fatimasa@cenargen.embrapa.br

O bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) é um dos principais insetos-praga da cultura do algodão, causando sérios danos nos órgãos florais e frutos da planta de algodão. Seu controle é extremamente difícil devido ao seu hábito alimentar e por apresentar total desenvolvimento no interior das estruturas florais. Grãos de amido encontrados nas estruturas reprodutivas da planta de algodão são digeridos por  $\alpha$ -amilases do intestino do inseto, indicando que inibidores de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AIs) podem ser potenciais candidatos alvo para o controle do bicudo do algodoeiro. Atualmente nenhum inibidor de  $\alpha$ -amilase foi demonstrado ser ativo para as  $\alpha$ -amilases de larvas ou de inseto adulto do bicudo.

Neste trabalho, uma biblioteca combinatorial contendo  $10^7$  formas variantes de  $\alpha$ -AIs, obtida por DNA *shuffling*, utilizando os genes  $\alpha AI-1$  e  $\alpha AI-2$  (duas isoformas de  $\alpha$ -AIs, isoladas de feijão comum e selvagem, respectivamente), foi usada para selecionar novas variantes de  $\alpha$ -AIs com capacidade de inibir as  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro. Vinte e seis variantes selecionados pela técnica de *Phage display* mostraram diferentes padrões de mutações. Cinco desses mutantes foram expressos em *Arabidopsis thaliana* e suas atividades de inibição de  $\alpha$ -amilases foram testadas. Dois AI-mutantes, denominados C3 e A11 mostraram alta eficiência em inibir as  $\alpha$ -amilases de *A. grandis* (AGA) em ensaios *in vitro*, na razão de nM. Estudos de modelagem dos inibidores C3 e A11, em complexo com AGA, indicaram alguns resíduos de aminoácidos provavelmente envolvidos na estabilização do complexo enzima-inibidor. Os dados aqui apresentados demonstram o potencial de aplicação dos mutantes de  $\alpha$ -AIs no controle do bicudo do algodoeiro e coloca-os como candidatos para uso da geração de plantas geneticamente modificadas de algodão resistentes a este importante inseto-praga da agricultura.

## INTRODUÇÃO

A produção de algodão (*Gossypium hirsutum* L.r. *latifolium* Hutch.) no Brasil possui posição de destaque, colocando o país na cotonicultura internacional como o quinto maior produtor, com participação de aproximadamente 5% da safra mundial. A produção de algodão alcançou 3,8 milhões de toneladas em 2007 e estima-se para 2008 4,1 milhões de toneladas (Abrapa, 2007; IBGE, 2007).

O ataque de insetos-praga consiste num dos principais motivos de redução da produtividade e lucratividade do cultivo do algodoeiro. O inseto bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* -Coleoptera: Curculionidae, Boheman, 1943) se destaca devido aos prejuízos que causa ao atacar as estruturas reprodutivas da planta. Os insetos adultos se alimentam dos botões florais e maçãs onde fazem oviposição, sendo o

desenvolvimento das larvas totalmente endofítico. Esse comportamento dificulta a ação dos inseticidas, e conseqüentemente, o controle deste inseto-praga por métodos convencionais.

O inseto utiliza suas enzimas digestivas, tais como  $\alpha$ -amilases para degradar o amido, presente nas estruturas preferencialmente atacadas, ocasionando a queda dos botões florais, flores e maçãs (Bellettini et al., 1998). Estudos mostraram que larvas e insetos adulto do bicudo do algodoeiro, isolados de plantas de algodão danificadas, apresentam altos níveis de atividade amilolítica (Oliveira-Neto et al., 2003). Desta forma, o uso de inibidores de  $\alpha$ -amilases representa potenciais alvos para inibir as  $\alpha$ -amilases, presentes no intestino do bicudo do algodoeiro, visando seu controle.

Os inibidores de  $\alpha$ -amilases do tipo lectina,  $\alpha$ -AI1 e  $\alpha$ -AI2, são encontrados em diversos cultivares de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Estes inibidores apresentam 78% de identidade de aminoácidos e exibem diferente especificidade de interação. Enquanto o  $\alpha$ -AI1 inibe a  $\alpha$ -amilase de mamíferos e de alguns insetos bruquídeos (*Callosobruchus maculatus* e *C. chinenses*), o  $\alpha$ -AI2 inibe a  $\alpha$ -amilases de *Zabrotes subfasciatus* e parcialmente as  $\alpha$ -amilases do *Bruchus pisorirum* (Ishimoto & Kitamura, 1989; Ishimoto & Chrispeels, 1996; Grossi de Sá et al., 1997a,b). Contudo, nenhuma atividade destes inibidores foi detectada para  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro (AGA).

O presente trabalho teve como objetivo obter moléculas de inibidores de  $\alpha$ -amilase ativos contra AGA. Foram selecionados mutantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases, a partir de uma biblioteca combinatória, gerada por DNA *shuffling*, usando os genes para inibidores  $\alpha$ -AI1 e  $\alpha$ -AI2, combinando a técnica de *Phage display*. Dois novos genes para inibidores de  $\alpha$ -amilases foram selecionados e expressos em *Arabidopsis thaliana*. As plantas transformadas expressando os inibidores mutantes foram testadas e a atividade inibitória contra AGA foi detectada na concentração de nanomolar.

## MATERIAS E MÉTODOS

### *Obtenção de AGA para Phage display*

Utilizando larvas do bicudo do algodoeiro de 3º instar de desenvolvimento foram obtidos extratos protéicos. As  $\alpha$ -amilases intestinais (AGA) foram purificadas por meio de cromatografia hidrofóbica (Phenyl-Sepharose CL-4B) de acordo com Silva et al. (1999). As frações ativas foram reunidas e utilizadas para sensibilizar poços de placas de ELISA durante a seleção dos mutantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases.

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

Para selecionar genes variantes com afinidade pelas AGA foi utilizada a biblioteca combinatória de variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilase, construída pela aplicação da técnica de DNA *shuffling* (Silva et al., 2007). A seleção foi realizada de acordo com Barbas III et al. (2001), utilizando como ligante a AGA. Os genes pré-selecionados expressos em *E. coli* foram analisados por imunodeteção usando anticorpo contra anti-hemaglutinina (anti-HA). O DNA dos genes selecionados em Dot-blot foi preparado, os clones foram seqüenciados e as seqüências analisadas utilizando o programa ClustalW(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>).

### *Transformação de A. thaliana com genes variantes para inibidores de $\alpha$ -amilases*

Cinco genes variantes selecionados (C3, C11, G4, E11 e A11) com padrões mutacionais diferentes foram sub-clonados no plasmídeo pCAMBIA2300 (série pCAMBIA, Camberra, Austrália) sob controle do promotor 35S dobrado do CaMV. Os plasmídeos resultantes foram utilizados para transformação de plantas de *A. thaliana*, por meio de imersão do botão floral (Clough & Bent, 1998). As plantas transformadas e expressando os genes variantes dos inibidores de  $\alpha$ -amilases foram usadas nos ensaios *in vitro* para detecção da atividade inibitória contra AGA.

#### *Análise da Atividade Inibitória dos Inibidores de $\alpha$ -amilases selecionados para AGA*

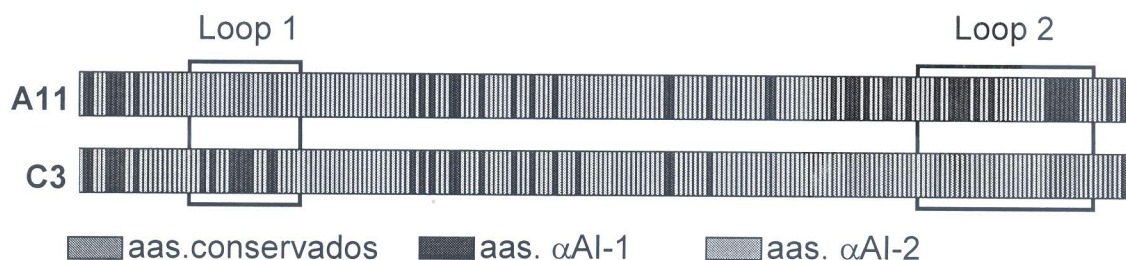
Extratos proteicos de plantas de *A. thaliana*, expressando os inibidores selecionados, foram analisados *in vitro* utilizando tampão com pH 6.0, previamente determinado como pH ótimo para as  $\alpha$ -amilases do *A. grandis* e de acordo como descrito em Bernfeld, 1955).

#### *Modelagem molecular*

Foram construídos os modelos estruturais para a AGA em complexo com os mutantes C3 e A11 selecionados da biblioteca combinatória. O programa Muscle ([http://phylogenomics.berkeley.edu/cgi-bin/muscle/input\\_muscle.py](http://phylogenomics.berkeley.edu/cgi-bin/muscle/input_muscle.py)) gerou o alinhamento da seqüência dos inibidores com as seqüências escolhidas da busca com Blastp (NCBI homepage). O programa Jalview foi utilizado para o arranjo manual do alinhamento em regiões de deleções e/ou inserções de aminoácidos. A estrutura de cristal do complexo  $\alpha$ A11-TMA (1viw.pdb) foi escolhida como molde para a construção dos modelos 3D dos complexos C3AGA e A11AGA. O alinhamento final foi submetido ao programa Modeller versão 9.2 (<http://www.salilab.org/modeller/>). O primeiro conjunto de vinte modelos construídos por Modeller foi analisado pelas suas características estereoquímicas, utilizando o programa Procheck (Laskowski et al., 1993). Os resíduos envolvidos na interface de interação dos complexos modelados foram identificados após análises no servidor Protein-Protein Interaction (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PP/server/>).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

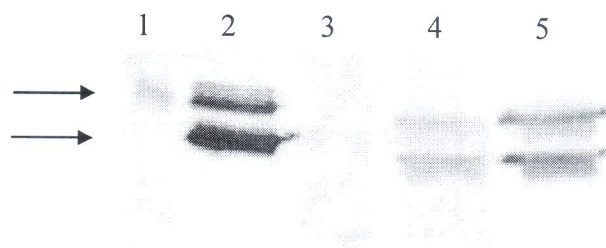
As titulações das preparações de fagos obtidas nos cinco ciclos de seleção indicaram o enriquecimento de fagos no terceiro ciclo, onde foi realizada a coleta do *pool* de fagos específicos mostrando afinidade pela AGA. Dos oitenta e seis clones isolados e expressos na superfície do fago, 31 mostraram forte sinal de expressão nos experimentos de dot-blots e seus DNAs foram seqüenciados. A figura 1 ilustra o padrão mutacional dos variantes de inibidores de  $\alpha$ -amilases (C3 e A11), selecionados por afinidade pela AGA.



**Figura 1** – Esquema ilustrativo da recombinação de resíduos dos inibidores  $\alpha$ A11 e  $\alpha$ A12 (obtida por DNA *shuffling*) observada para os variantes C3 e A11. As cores indicam: aminoácidos conservados

(verde), aminoácidos idênticos a seqüência do  $\alpha$ AI-1(azul) e aminoácidos idênticos a seqüência do  $\alpha$ AI-2. As regiões das duas principais alças envolvidas na interação enzima-inibidor estão destacadas.

Os resultados observados no *Western Blot* (figura 2) confirmaram a expressão, em plantas de *Arabidopsis* dos variantes C3 e A11, pela detecção das duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , que constituem a molécula ativa do inibidor.



**Figura 2** - *Western Blot* de proteínas totais de extratos de plantas de *A. thaliana* transformadas com os variantes para  $\alpha$ -AIs: 1. marcador de massa molecular; 2:  $\alpha$ AI-1 purificado de feijão; 3: planta não transformada; 4: planta transformada com o inibidor C3; 5: planta transformada com o inibidor A11. As setas indicam as duas subunidades (9 e 14 kDa) que formam a molécula ativa.

Os testes de atividade inibitória *in vitro*, utilizando extrato de plantas de *A. thaliana* expressando os variantes C3, C11, A11 e E11 demonstraram que estes inibidores foram capazes de inibir AGA em concentrações de nanomolar (Tabela 1), similar a inibição detectada para as  $\alpha$ -amilases do *Cryptolestes ferrugineus* e *Tribolium castaneum* onde 50% de inibição foi obtida com 10.9 e 4.2 nM e 2.4 e 4.8 nM de  $\alpha$ -A11, em pH 4.5 e 6.0, respectivamente (Kluh et al., 2005).

**Tabela 1:** Atividade inibitória dos variantes selecionados para AGA.

Mutante	Concentração (nM)	Inibição (%)
C3	3.9	60,4
C11	11.7	56,7
E11	4.7	36,1
A11	4.9	75,5
$\alpha$ -AI1	>10	1,3
$\alpha$ -AI2	>10	1,8

A análise visual dos modelos tridimensionais C3AGA e A11AGA (figura 3) focada na região das duas alças principais (N e C-terminal) que interagem com enzima mostraram diferenças em aminoácidos que podem induzir uma mudança conformacional destas duas alças. As diferenças encontradas poderiam mudar significativamente a capacidade de interação com determinada enzima, já que estas alças contribuem com a maior parte na interface com enzima.

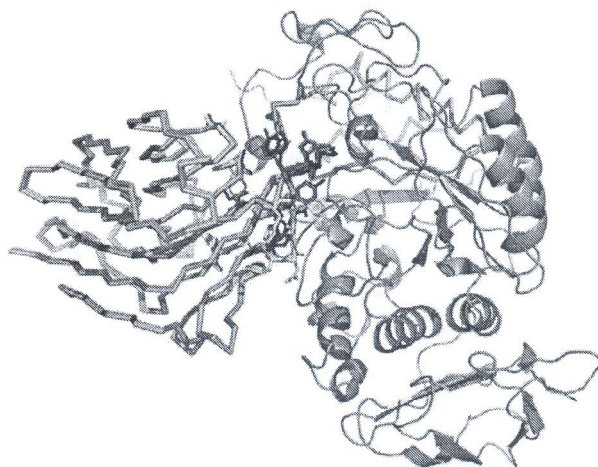


Figura 3 Representação em ribbon do modelo do complexo inibidores-AGA. A esquerda sobreposição das estruturas atômicas dos novos inibidores C3 (azul) e A11 (verde) interagindo com a AGA (NCBI: AF527877) a direita (laranja). Os resíduos coloridos na região de interface representam diferenças relacionadas com a especificidade.

A estratégia de seleção de inibidores de  $\alpha$ -amilases a partir de uma biblioteca combinatória foi eficiente para a identificação de inibidores de  $\alpha$ -amilase com atividade contra as  $\alpha$ -amilases do bicudo do algodoeiro. Os inibidores C3 e A11 estão sendo analisados em ensaios *in vivo* para confirmação da atividade sobre as larvas de bicudo. Estes inibidores são candidatos com potencial para uso na transformação de plantas de algodão de modo a conferir resistência ao inseto.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBAS III, C.F.; BUSTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. Selection from Antibody Libraries. *In: Phage Display a Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, p. 10.1-10.20, 2001.

BELLETTINI, S.; BELLETTINI, N.M.T.; SALVADOR, G.; MENDES, E.; GARCIA, E.C.; DA SILVA, W.G. Diferentes inseticidas do controle do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis*-Bohemian 1843. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, Res. 17, p.133, 1998.

CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, v.16, p.735-743, 1998.

GROSSI DE SÁ, M.F.; MIRKOV, T.E.; ISHIMOTO, M.; COLUCCI, G.; BATEMAN, K.S. & CHRISPEELS, M.J. Molecular characterization of a bean  $\alpha$ -amylase inhibitor that inhibits the  $\alpha$ -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. *Planta*, v. 203, p. 295-303, 1997.

GROSSI DE SÁ, M.F.; CHRISPEELS, M.J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amilase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.27, p. 271-281, 1997.

ISHIMOTO, M.; KITAMURA, K. Growth inhibitory effects of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *Applied Entomology Zoology*, v. 24, p. 281-286, 1989.

ISHIMOTO, M.; CHRISPEELS, M.J. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of  $\alpha$ -amylase inhibitor in the common bean. **Plant Physiology**, v.11, p. 393-401, 1996.

KLUH I.; HORN M.; HYBLOVA J.; HUBERT J.; DOLECKOVA-MARESOVA L.; VOBURKA, Z.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; BATISTA, J.A.N.; RIGDEN, D. J.; FRANCO, O. L.; FALCÃO, R., FRAGOSO, R.R.; MELLO, L. V.; SANTOS, R.C. dos; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Molecular Cloning of  $\alpha$ -Amylases from Cotton Boll Weevil, *Anthonomus grandis* and Structural Relations to Plant Inhibitors: An Approach to Insect Resistance. **Journal of Protein Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 77-87, 2003.

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. Cryst.*, **26**, 283-291.

SILVA, C.P.; TERRA, W. R.; XAVIER-FILHO, J.; GROSSI DE SÁ, M.F.; LOPES, A. R.; PONTES, E. G. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on  $\alpha$ -amylases and oligosaccharidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.29, p. 355-366, 1999.

SILVA, M.C.M.; GROSSI-DE-SA, M. F.; CHRISPEELS, M.J.; TOGAWA, R.C.; NESHICH, G. Analysis of structural and physico-chemical parameters involved in the specificity of binding between  $\alpha$ -amylases and their inhibitors. **Protein Engineering**, v. 13, n. 3, 167-177, 2000.

SILVA, M.C.M.; MELLO, L.V.; COUTINHO, M.V.; RIGDEN, D.J.; NESHICH, G.; CHRISPEELS, M.J.; GROSSI DE SA, M.F. Mutants of common bean  $\alpha$ -amylase inhibitor-2 as an approach to investigate binding specificity to  $\alpha$ -amylases. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 3, p. 201-208, 2004.

SILVA, M. C. M. DA; TEIXEIRA, F. R.; SARTO, R. P. DEL; CRUZ, CLEITON, C. M. DA; AGASIE, I. C. B.; MARANHÃO, A. Q.; VENTURA, M. C.; OLIVEIRA NETO, O. B. DE; MAGALHÃES, J. C. CRUZ; ROCHA, T. L.; SÁ, M. F. G. DE . Biblioteca combinatória de genes para inibidores de  $\alpha$ -amilases: seleção de novos genes com potencial aplicação no controle de insetos-praga de armazenamento. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007 (Boletim de Pesquisa, 185 Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/bp185.pdf>