

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Expressão da urease ubíqua de soja em *Escherichia coli*

Anne Helene Souza Martinelli

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Célia Regina R.S. Carlini

Co-orientador: Dr. Giancarlo Pasquali

Porto Alegre
Agosto de 2007

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Proteínas Tóxicas, do Departamento de Biofísica, e Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, sob a orientação da Dra. Célia Regina R. S. Carlini e co-orientação do Dr. Giancarlo Pasquali. Os auxílios financeiros foram obtidos do: CNPq, CAPES, FAPERGS E FINEP.

Agradecimentos

Agradeço:

Aos meus pais **Sauro Luis Martinelli** e **Maria Elisabete Martinelli**, e meus irmãos **Luiza, Nátali, Sauro, Daniel** por todo amor, carinho, dedicação e apoio em todos os momentos. Amo muito vocês.

Ao meu padrinho **Jorge** por todo apoio e carinho.

Ao meu amado **Marco** pelo amor, carinho, e compreensão nos momentos de ausência; e também à sua família.

À minha orientadora **Célia** pela oportunidade única de atuar em seu grupo de pesquisa, por todo aprendizado e principalmente pela confiança e apoio.

Ao meu co-orientador **Giancarlo** pela confiança e oportunidade de iniciar trabalhos na área de biologia Molecular.

Aos meus colegas do laprotox: **Ju S., Vanessa, Arlete, Mel, Fer S., Evelyn, Fer M., Marina, Ângela M., Ângela P., Martha, Carol, Deiber, German, Rafael, Tinoko, Diogo e Augusto**, pela amizade, ajuda em todos os momentos, pelos risos na hora do cafezinho. Obrigado a todos!!!!

À colega servidora **Sílvia** e ao **Luciano** da secretaria do programa de pós-graduação.

Ao **José Arthur, Nance e Kátia**, do laboratório de Imunogenética em que atuo como técnica de laboratório, pela compreensão e flexibilidade para que eu pudesse realizar este trabalho.

A todos do laboratório de Imunogenética pelo apoio e amizade.

A todas as meninas do laboratório de Biologia Molecular vegetal: **Fe B, Fe S., Dani, Rochele, Ana P., Sinara, Michele, Luiza, Marina**, pela amizade.

A **Jacqueline** e **Débora** que me ajudaram muito na realização do trabalho.

A **Desireé**, que me auxiliou muito no trabalho, e sempre mostrou muita paciência e boa vontade em ajudar. Muito obrigado!!!!

As minhas amigas queridas da Unisinos, **Raquel** e **Cátia**, que mesmo longe me apoiaram muito.

Ao professor **Henrique** pela revisão da dissertação e ótimas sugestões.

A todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram na realização deste trabalho.

Abreviaturas

aa	aminoácidos
ATG	Códon de iniciação da transcrição: adenina, timina, guanina
BCA	ácido bicinconínico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indocil fosfato
cDNA	DNA complementar
CNTX	canatoxina
DL ₅₀	Dose letal para 50% dos indivíduos testados
DNA	ácido desoxirribonucléico
GST	Glutathione-S-transferase
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
JBU	Urease de <i>Canavalia ensiformis</i>
Kb	Quilobases (1.000 pares de bases)
kDa	Quilodaltons (1.000 daltons)
μg	micrograma(s)
μL	microlitro(s)
NBT	azul de nitrotetrazolina
N-terminal	Região amino-terminal de uma proteína
pb	pare(s) de base(s)
PBS	tampão fosfato-salino

PCR	reação em cadeia da DNA-polimerase
PIXE	indução de partículas por emissão de raio-X
p-OHMB	<i>p</i> -hidroximercuribenzoato de sódio
PVDF	Difluoreto de polivinileno
SDS	sódio-dodecilsulfato
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TBS	tampão Tris-HCl salino
TTBS	tampão Tris-HCl salino contendo 0,05% de tween 20
Tween 20	polioxietilenosorbitano
U	unidades

Índice

1. Introdução	11
1.1 Ureases	11
1.1.2 Ureases de semente de feijão-de-porco (<i>Canavalia ensiformis</i>).....	12
1.1.3 Urease de soja	14
1.1.4 Ureases: proteínas de defesa em plantas?	16
1.2 Expressão de proteínas recombinantes	19
1.2.1 Sistema de expressão pGEX	24
2. Objetivos	26
2.1 Objetivos gerais	26
2.2 Justificativa:	26
2.3 Objetivos específicos	27
3. Materiais e Métodos.....	28
3.1 Amplificação do cDNA da urease ubíqua de soja	28
3.1.1 pGPTV-JIT-urease	28
3.1.2 Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)	30
3.2 Construção do vetor de expressão:	30
3.2.1 Ligação do inserto e transformação de células de <i>E. coli</i> termocompetentes.....	30
3.2.2 Seleção das colônias transformadas:.....	31
3.2.3. Sequenciamento do plasmídeo pGEX-4T-2- urease a análise da sequência	32
3.3 Expressão de urease ubíqua recombinante em <i>E. coli</i> :	34
3.3.1 Transformação das células competentes para expressão	34
3.3.2 Seleção de colônias recombinantes para expressão da proteína de fusão (GST+urease).....	34
3.3.3 Otimização das condições de expressão:	35
3.3.4 Solubilidade da proteína urease recombinante fusionada a GST.....	36
3.4 Expressão da urease ubíqua recombinante	36
3.4.1 Purificação da proteína de fusão	37
3.4.2 Purificação e clivagem de proteína de fusão GST-urease	38
3.5 Atividade ureásica.....	38
3.6 Determinação de Proteína	39
3.7 SDS-PAGE	39
3.8 Western blot	39
3.9 ELISA	40
4. Resultados	42
4.1 Amplificação por PCR e subclonagem do cDNA da urease ubíqua.....	42
4.2. Seleção de clones para expressão	44
4.3 Otimização da expressão da urease ubíqua recombinante de soja.....	49
4.3 Purificação da proteína de fusão	53
4.4 Clivagem da proteína de fusão GST-urease com trombina	55
4.5 Atividade enzimática	56
4.5 ELISA	59
5. Discussão	62
6. Perspectivas.....	70

7. Referências..... 71

Abstract

Urease (EC 3.5.1.5, urea amidohydrolase) is a nickel-dependent metalloenzyme, that catalyzes the hydrolysis of urea to form ammonia and carbon dioxide. Ureasases are produced by many organisms, including plants, fungi and bacteria. Soybean produces two isoenzymes, the ubiquitous urease, which is encoded by *Eu4* gene and is present in small amounts in all plant tissues, and the embryo-specific urease, which is encoded by the *Eu1* gene, and is synthesized only in the developing embryo. The ubiquitous urease is responsible for recycling metabolically derived urea while the role of the embryo-specific urease remains unknown. Previous studies had suggested that the embryo-specific urease could be involved in plant defense. Since the ubiquitous urease is found in low amounts in plant tissues making difficult to purify the enzyme, little is known about this protein. In the present work, a system for the expression and partial purification of soluble soybean ubiquitous urease was established expressing a protein fused with glutathione S-transferase (GST). The urease gene amplified by PCR was inserted into a pGEX-4T-2 GST fusion vector and then expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant urease was partially purified by a Glutathione Sepharose 4B affinity chromatography, yielding about 2 mg protein/L of culture broth. The recombinant protein was tested for enzymatic activity and immunoreactivity against anti *Canavalia ensiformis* antibodies. Successful expression of ubiquitous urease in *E. coli* provides a way to produce this protein in amounts enough for posterior studies and characterization.

Resumo

Ureases (uréia amino-hidrolases; EC 3.5.1.5) são metaloenzimas níquel-dependentes, que catalisam a hidrólise da uréia à amônia e dióxido de carbono. Elas são produzidas por fungos, bactérias e plantas, mas não por animais. A soja produz duas isoenzimas, a urease ubíqua, que é codificada pelo gene *Eu4*, presente em pequenas quantidades em todos os tecidos da planta, e a urease embrião-específica, codificada pelo gene *Eu1*, que é sintetizada apenas no embrião em desenvolvimento. A urease ubíqua é responsável pela biodisponibilização de nitrogênio para planta, enquanto o papel da embrião-específica permanece desconhecido. Estudos prévios, sugerem que esta urease possa estar envolvida na defesa da planta. Como a urease ubíqua é encontrada em pequenas quantidades em todos tecidos da planta, tornando difícil sua obtenção, pouco é conhecido sobre esta enzima. No presente trabalho, estabeleceu-se um sistema de expressão e purificação parcial da urease ubíqua recombinante, expressa como uma proteína fusionada a uma cauda de glutathione-S-transferase (GST). O gene da urease foi amplificado por PCR e ligado em plasmídeo pGEX-4T-2 e expresso em *Escherichia coli* BL21 (DE3). A urease recombinante foi parcialmente purificada em resina de afinidade Glutathione Sepharose 4B, obtendo-se um rendimento de aproximadamente 2 mg/L de cultura. A proteína recombinante foi analisada para atividade enzimática e imunorreatividade para anticorpos contra urease de *Canavalia ensiformis*. O sucesso

deste método de expressão da urease ubíqua da soja, permitirá a produção de quantidades suficientes desta proteína para estudos posteriores de caracterização.

1. Introdução

1.1 Ureases

Ureases (uréia amino-hidrolases; EC 3.5.1.5) são enzimas que catalisam a hidrólise da uréia à amônia e carbamato, o qual espontaneamente decompõe-se para formar dióxido de carbono e uma segunda molécula de amônia. Elas são produzidas por fungos, bactérias e plantas mas não por animais. As ureases de plantas e fungos são proteínas homo-hexaméricas, ou seja, formadas por seis subunidades idênticas (SIRKO & BRODZIK, 2000), enquanto as ureases bacterianas são proteínas formadas por duas ou três subunidades distintas: UreA e UreB, formando $(AB)_6$, em *Helicobacter pylori*, e UreA, UreB e UreC formando $(ABC)_6$, em outras bactérias, como *Klebsiella aerogenes*, como é mostrado na Figura 1 abaixo.

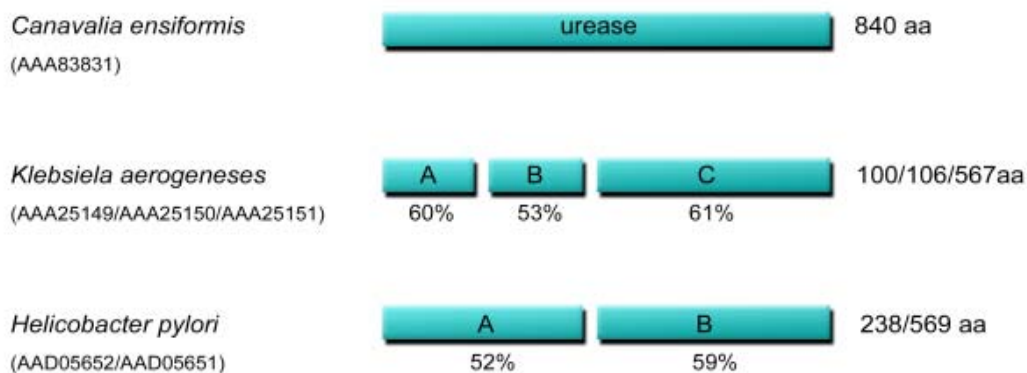


Figura 1: Comparação esquemática das subunidades estruturais das ureases de diferentes organismos. Os valores em percentual, indicados abaixo de cada bloco, indica o grau de identidade com a urease de *C. ensiformis*. O número de aminoácidos de cada bloco estão indicados a direita (aa). (Adaptado de SIRKO & BRODZIK, 2000).

Em bactérias, a urease está envolvida como fator de virulência em infecções humanas do trato urinário e gastro-intestinal (MOBLEY *et al.*, 1995), favorecendo a sobrevivência destes microrganismos em pH desfavorável, além de estar presente em bactérias de solo e em bactérias anaeróbicas presentes em ruminantes, favorecendo a reciclagem de compostos nitrogenados. Em plantas, a urease está presente abundantemente na semente e distribuída nos demais tecidos, apesar da uréia não ser um metabólito majoritário em plantas (POLACCO & HOLLAND, 1993; SIRKO & BRODZIC, 2000) o que desperta curiosidade para estudo das funções fisiológicas desta enzima nos vegetais. Apesar de diferenças na estrutura quaternária entre as ureases, a identidade de seqüência primária é maior que 50% entre bactérias e plantas, e com similaridades maiores que 70% dentro de cada grupo (MOBLEY *et al.*, 1995).

1.1.2 Ureases de semente de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*)

O feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), planta-modelo utilizada em nosso laboratório, é uma leguminosa com alta resistência a insetos e possui várias proteínas interessantes, como a lectina concanavalina A (SUMNER & HOWELL, 1936), a canatoxina (CARLINI & GUIMARÃES, 1981) e a urease, que foi a primeira enzima a ser cristalizada (SUMNER, 1926) e a primeira metalo-enzima a ser caracterizada (DIXON, 1975).

A urease de *C. ensiformis* constitui-se de uma cadeia polipeptídica com 840 aminoácidos e massa molecular de 90,77 kDa. A forma mínima da enzima ativa é trimérica, com 270 kDa, e a enzima é encontrada em sua forma nativa como um hexâmero de 540 kDa (ZERNER, 1991). Ela possui dois átomos de níquel no sítio ativo, cada um coordenado por dois resíduos de histidina.

CARLINI & GUIMARÃES (1981), isolaram a CNTX, uma proteína tóxica a insetos e mamíferos que anos mais tarde, foi caracterizada como uma isoforma de urease (FOLLMER *et al.*, 2001). A CNTX apresenta massa molecular de 184 kDa quando analisada em gel-filtração em pH 7,5. Em SDS-PAGE, em meio redutor, sua massa molecular é de 95 kDa, sugerindo que a forma nativa da proteína seja um dímero mantido por ligações não covalentes. Além disso, é uma metalo-proteína contendo zinco e níquel. A CNTX e a urease de *C. ensiformis* apresentam um alto grau de homologia entre si (85%), mas a CNTX apresenta apenas 30 - 40% da sua atividade enzimática sobre uréia em relação a urease majoritária.

A CNTX, quando injetada por via intraperitoneal, induz convulsão e morte de ratos e camundongos, com uma DL_{50} de 2 mg/kg, mas é inócua quando administrada através de via oral nesses animais, provavelmente devido à sua instabilidade em meio ácido (CARLINI *et al.*, 1984; CARLINI & GUIMARÃES, 1991). Ela também apresenta potente atividade inseticida (CARLINI *et al.*, 1997; FERREIRA-DASILVA *et al.*, 2000; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002), que está relacionada com a clivagem da proteína por enzimas digestivas dos insetos, gerando um peptídeo de 10 kDa que é o agente responsável por essa atividade.

Estudos adicionais mostraram que quando a CNTX é tratada com um inibidor irreversível de urease, ρ -hidroximercuriobenzoato, ela perde totalmente sua atividade ureolítica, mas suas atividades biológicas permanecem inalteradas, sugerindo que estas propriedades são independentes da atividade enzimática. A urease clássica possui atividades biológicas descritas para a CNTX, como ativação plaquetária e interação com gangliosídeos, mas não é letal por via intraperitoneal em camundongos. As atividades citadas também são independentes da atividade ureolítica (FOLLMER *et al.*, 2001). Esse dado indica a existência, nestas proteínas, de pelo menos dois domínios protéicos distintos, responsáveis por atividades biológicas diferentes: um domínio com atividade hidrolítica sobre a uréia, suscetível de inibição por agentes oxidantes; e pelo menos mais um domínio, responsável pela toxicidade intraperitoneal da CNTX e outras propriedades farmacológicas compartilhadas com a urease.

1.1.3 Urease de soja

A soja (*Glycine max*) possui duas isoformas de urease: a ubíqua, que está presente em pequenas quantidades em todos os tecidos da planta, e uma segunda isoenzima, designada embrião-específica, expressa no embrião em desenvolvimento e preservada na semente madura, onde é encontrada em cerca de 1.000 vezes mais abundância do que a urease ubíqua (POLACCO & SPARKS, 1982, POLACCO & WINKLER, 1984). As isoformas de urease encontradas na soja, a embrião-específica e a ubíqua, são altamente homólogas entre si (cerca de 85%) e também à urease de *C. ensiformis* (TORISKI *et al.*, 1994.) Cada isoenzima de urease parece ser

codificada por um único gene estrutural: *Eu1* e *Eu4* para a urease embrião-específica e a ubíqua, respectivamente. Mutações em cada um dos genes afetam somente uma das isoenzimas (MEYER-BOTHLING & POLACCO, 1987; POLACCO *et al.*, 1989). Um estudo realizado com plantas de soja mutantes mostrou que, com o silenciamento da urease ubíqua, as plantas apresentaram anormalidades como necroses nas extremidades das folhas e raízes, acúmulo de uréia nas folhas e sementes, além de retardamento na germinação sugerindo um papel importante desta enzima na reciclagem de derivados de uréia. Já a perda da urease embrião-específica não acarretou danos visíveis à planta, sugerindo que esta enzima não possua função fisiológica importante no metabolismo de nitrogênio (POLACCO & HOLLAND, 1993).

Em culturas de cotilédones de ervilha e de soja, mostrou-se que as ureases desempenham pouca ou nenhuma função na nutrição do embrião, visto que a uréia comporta-se como uma fonte extremamente pobre de nitrogênio (POLACCO & HOLLAND, 1993).

Estes dados são conflitantes, pois, se a urease embrião-específica não possui papel relevante para a planta, por que esta apresentaria conteúdos elevados desta proteína na semente? Tem sido proposto que, em decorrência da liberação enzimática de amônia, esta isoforma possa estar envolvida na proteção da planta contra insetos, fungos e agentes agressivos a semente. (POLACCO & HOLLAND, 1993).

1.1.4 Ureases: proteínas de defesa em plantas?

(CARLINI *et al.*, 1997, FERREIRA-DASILVA *et al.*, 2000) descreveram a atividade inseticida da CNTX. Nestes trabalhos, insetos de diferentes ordens foram testados e apenas foram suscetíveis os insetos *Callosobruchus maculatus* e *Rhodnius prolixus*, cujos sistemas digestivos são baseados em enzimas proteolíticas ácidas, do tipo catepsinas (TERRA *et al.*, 1988). Nesse caso, o efeito inseticida não está associado à atividade ureolítica da toxina, pois depende da formação de peptídeos entomotóxicos a partir da hidrólise das proteínas por enzimas digestivas dos insetos. Nesses estudos realizou-se a digestão *in vitro* da canatoxina com enzimas obtidas da larva de *C. maculatus*. Obteve-se, desta forma, um conjunto de peptídeos (10 – 15 kDa) tóxicos quando injetados ou ingeridos pelos barbeiros *R. prolixus*. O fragmento mais tóxico (10 kDa); chamado de pepcanatox, foi seqüenciado em sua região N- terminal. A partir desta seqüência, utilizando-se como molde a seqüência da urease JBURE-II de *Canavalia ensiformis*, foi expresso em *Escherichia coli* um peptídeo chamado de jaburetox-2 Ec (MULINARI *et al.*, 2004), que apresentou toxicidade à barata *Blatela germanica* ao inseto manchador-de- algodão *Dysdercus peruvianus* (STANISÇUASKI *et al.*, 2005). Em outro estudo (FOLLMER *et al.*, 2004), verificou-se que a urease embrião-específica da soja e a urease majoritária de *C. ensiformis*, ambas purificadas a partir da semente, apresentam atividade tóxica contra o inseto *D. peruvianus*, e são capazes de promover a agregação de plaquetas de coelho. Neste mesmo trabalho, mostrou-se que estas atividades são independentes da atividade ureolítica.

OLIVEIRA, *et al.*, (1999) descreveram a atividade fungicida da CNTX sobre alguns fungos filamentosos. Recentemente, nosso grupo descreveu a ação fungicida das ureases vegetais (urease embrião-específica da soja, e a urease de *C. ensiformis*) e urease bacteriana de *Helicobacter pylori*, sobre fungos fitopatogênicos. Foram realizados ensaios de inibição de crescimento por difusão em disco de papel (Figura 2), e por método de turbidimetria, bem como microscopia eletrônica de transmissão de fungos afetados em que monitoramos a inibição em espectrofotômetro. As três ureases estudadas apresentam atividade tóxica aos fungos, mas as ureases vegetais foram mais potentes em relação à bacteriana (BECKER-RITT *et al.*, no prelo). Verificamos ainda que as propriedades antifúngicas persistem na urease inibida por p-hidroximercuribenzoato, mostrando ser independente da atividade enzimática.

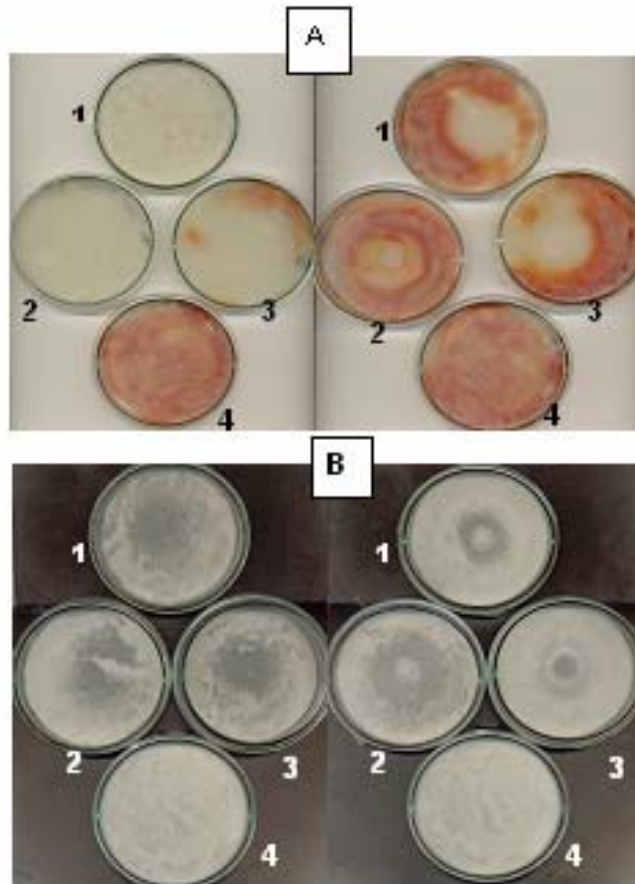


Figura 2: Efeito da urease embrião-específica da soja sobre os fungos *Penicillium herquei* (A) e *Trichoderma viride* (B). Painel de esquerda: uma suspensão de 10^6 esporos foi incubada com 40 μ L da solução de proteína (12,5 μ g proteína/ μ L) (1, 2,3) ou tampão (4) durante 2 horas a temperatura ambiente, e inoculadas em placas contendo meio BDA, incubadas a 28°C por 48 horas. Painel da direita: 500 μ g da proteína em 40 μ L (1,2,3) ou somente tampão (4) foram pipetados em discos de papel estéril e colocados em placas previamente inoculadas com os fungos. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas. A urease inibiu o crescimento e a germinação dos esporos dos fungos (BECKER-RITT *et al.*, no prelo).

1.2 Expressão de proteínas recombinantes

Nem sempre é possível obter preparações enriquecidas de proteínas específicas a partir de células, tecidos ou órgãos onde elas são naturalmente encontradas. Para contornar estes problemas, surgiram técnicas para a expressão em larga-escala de proteínas de diferentes organismos em células procarióticas. A expressão de genes em *E. coli*, talvez seja a via mais utilizada para a produção de proteínas recombinantes, devido a algumas características específicas deste microrganismo, como: ser geneticamente bem caracterizado, manipulação simples do microrganismo, baixo custo de cultivo, curto tempo necessário para obtenção de grande quantidade da proteína desejada (HUNT, 2005), além da disponibilidade de números cada vez maiores de vetores de clonagem e cepas mutantes de expressão, permitindo seu uso para uma grande variedade de atividades, tais como: produção de antígenos, vacinas, imunologia molecular, estrutural, além de estudos bioquímicos (SALUTA *et al.*, 1998).

Em geral, é difícil decidir qual é o melhor sistema plasmidial e cepa bacteriana para expressão heteróloga de proteínas (TERPE, 2006). Entretanto, para esta escolha, há alguns elementos essenciais que devem ser levados em consideração. A expressão normalmente é induzida a partir de um plasmídeo que carrega um sistema genético compatível. Os elementos genéticos de um plasmídeo de expressão incluem a origem de replicação, um ou mais marcadores de resistência a antibiótico, um promotor da transcrição, com ou sem a região iniciadora da tradução, bem como a região terminadora da transcrição (SORENSEN, 2004).

Muitos vetores de expressão de proteínas recombinantes replicam-se a partir do replicon ColE1 ou p15A. O ColE1, presente em plasmídeos de expressão modernos, é derivado da família de plasmídeos pBR322 (15 a 20 cópias por célula bacteriana) ou do pUC (500 a 700 cópias/ célula), e o replicom p15A é derivado do pACYC184 (10 a 12 cópias/ célula). Além disso, o número de cópias de um plasmídeo é controlado pela origem de replicação que preferencialmente replica na conformação relaxada do plasmídeo (BANEYX, 1999).

Outro fator importante é a marca de resistência de um plasmídeo. Os marcadores mais comuns são genes codificadores de proteínas de resistência a ampicilina, canamicina, cloranfenicol ou tetraciclina. Plasmídeos contendo o gene *bla*, expressam a β -lactamase que confere resistência a ampicilina. Esta enzima é secretada para o periplasma, onde catalisa a hidrólise do anel β -lactâmico das penicilinas. A ampicilina presente no meio de cultivo é especialmente suscetível à degradação, tanto pela β -lactamase ou por condições acídicas em culturas de alta densidade. O efeito de degradação pode ser aliviado com uso de análogos mais resistentes como a carbenicilina. A canamicina, o cloranfenicol e a tetraciclina interferem na síntese de proteínas por se ligarem em áreas críticas do ribossomo bacteriano. A canamicina é inativada no periplasma pela aminoglicosídeo-fosfotransferase, e o cloranfenicol pelo produto do gene *cat*, a cloranfenicol-acetiltransferase. De forma análoga, vários genes conferem resistência à tetraciclina (CONNELL *et al.*, 2003).

Para a expressão da proteína recombinante, em altos níveis, em *E. coli* é necessário um promotor transcricional forte. O promotor do operon Lac de *E. coli* é o mais comumente utilizado, sendo a molécula de açúcar isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) o seu indutor (HANING *et al.*, 1998). Aproximadamente 80% das proteínas utilizadas para análise de estrutura tridimensional submetida ao banco de dados de proteínas (PDB) em 2003 foram obtidas a partir do sistema de expressão em *E. coli* (SORENSEN, 2004). O sistema de expressão plasmidial pET (Novagen), contendo promotor T7, foi de longe o mais utilizado nestes estudos. Outro sistema muito utilizado é o pGEX (GE healthcare), que possui o promotor tac.

Outro fator decisivo para expressão de proteínas recombinantes é a escolha da cepa de *E. coli*, entretanto grandes variedades de cepas podem ser usadas na clonagem e na expressão. As cepas para expressão podem ser deficientes de proteases naturalmente nocivas, mantendo a expressão do plasmídeo estável e conferindo elementos genéticos relevantes para o sistema de expressão. A cepa mais comumente utilizada é a *E. coli* BL21, por ser uma bactéria robusta, capaz de se multiplicar rapidamente em meio de cultivo pobre, além de não ser patogênica. A BL21 é deficiente em ompT e lon, duas proteases que podem interferir no isolamento da proteína recombinante intacta.

Como foi dito anteriormente, um sistema de expressão para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli* normalmente envolve a combinação de plasmídeo e uma cepa de bactéria (SORENSEN, 2005). O principal propósito da expressão é obter um grande acúmulo da proteína-alvo na célula bacteriana, preferencialmente na sua forma solúvel. Esta estratégia nem sempre é aceita pelo sistema metabólico da bactéria, podendo ocorrer respostas ao estresse celular como

o acúmulo da proteína-alvo como agregados insolúveis, denominados corpos de inclusão. Estes agregados protéicos em geral não permitem a adequada conformação protéica e são biologicamente inativos (VILLAVERDE *et al.*, 2003). O agregado de proteínas recombinantes expressas em células bacterianas pode algumas vezes resultar no acúmulo de altas concentrações de proteínas com *foldings* intermediário ou de processamento ineficiente das chaperonas. Na literatura estão descritos alguns métodos para redirecionar corpos de inclusão para a fração citoplasmática solúvel, ou modificar condições de expressão para obter a proteína na forma solúvel (SORENSEN, 2005), como pode ser visto na Figura 3.

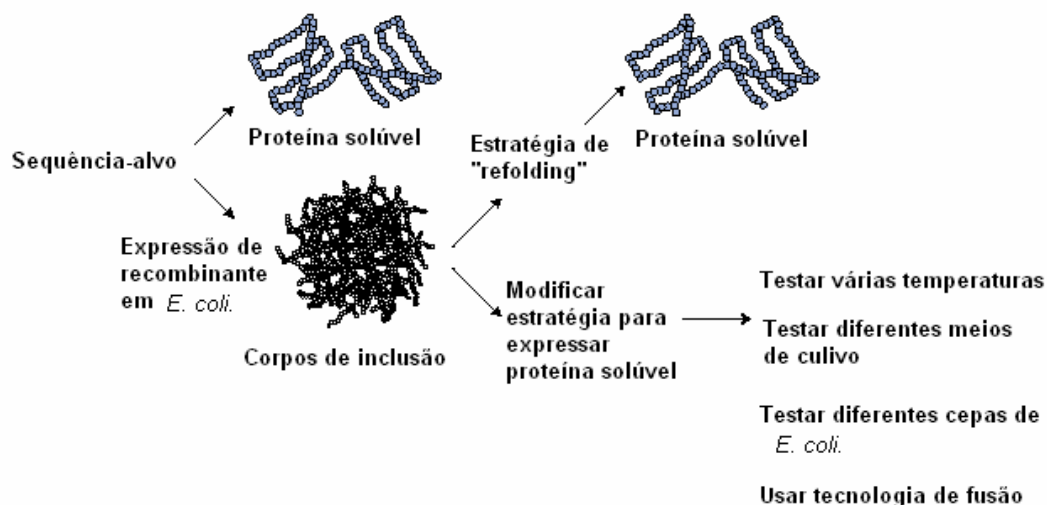


Figura 3. Desenho esquemático de passos para a obtenção de proteína recombinante em *E. coli*. A proteína-alvo pode ser obtida na fração solúvel ou na forma de corpos de inclusão. (Adaptado de SORENSEN *et al.*, 2005 b).

Outro sistema muito utilizado é a expressão da proteína-alvo fusionada a uma cauda de aminoácidos que pode ser mais tarde removida por clivagem. Exemplo disto é a cauda de histidinas, amplamente utilizada em proteínas recombinantes possibilitando a purificação com resinas de afinidade a metais. A introdução de uma cauda pode trazer muitos benefícios como o aumento do rendimento da proteína, a prevenção contra a proteólise, o aumento da solubilidade, além de facilitar o processo de purificação (ARNAU *et al.*, 2006). Por outro lado, a presença da cauda pode afetar a proteína-alvo através de alteração da atividade enzimática e biológica, por interferir na conformação correta da proteína. (CHANT *et al.*, 2005).

1.2.1 Sistema de expressão pGEX

O sistema pGEX, apresentado por SMITH (1988), possui um sítio de multiclonagem para ligação do gene de interesse, o qual será fusionado na sua porção N-terminal a uma proteína do parasito *Schistosoma japonicum*, a Glutathione-S-transferase (GST). Esta proteína, de 26 kDa, liga-se reversivelmente e com alta afinidade à resina de Glutathione-Sepharose, permitindo a rápida purificação da proteína de fusão, na maioria dos casos. A expressão de insertos clonados em vetor pGEX é controlada pelo promotor *tac* induzido por IPTG. Todos os vetores pGEX são construídos com um gene *lacI^q*. O produto deste gene é uma proteína repressora que se liga à região operadora do promotor *tac*, prevenindo sua expressão até a indução com IPTG. Na Figura 4, está mostrado o mapa do vetor pGEX-4T-2 (GE Healthcare).

Muitas cepas de *E. coli* podem ser usadas na clonagem e expressão de vetor pGEX. A cepa mais comumente utilizada é a *E. coli* BL21, que como já descrito, é deficiente em *ompT* e *lon*, duas proteases que podem degradar a proteína recombinante quando presentes.

pGEX-4T-2 (27-4581-01)

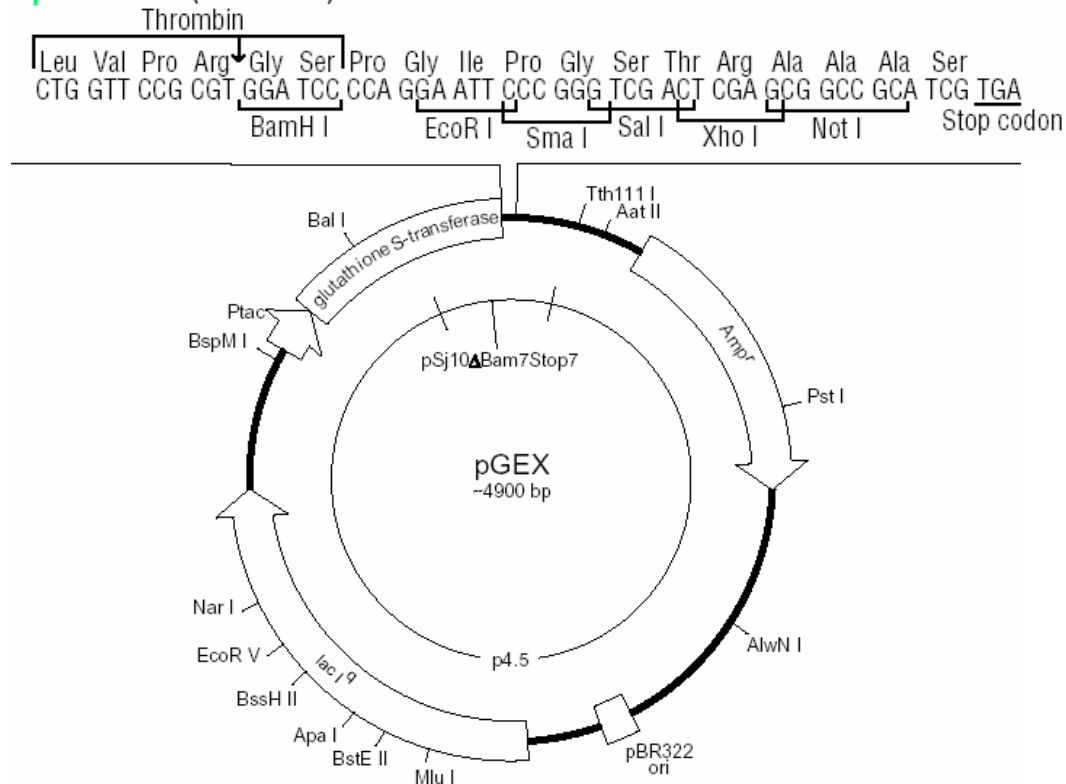


Figura 4. Mapa esquemático do vetor pGEX de fusão a Glutathione-S-transferase. Está sendo mostrado o sítio de multiclonagem na versão do pGEX-4T-2 além do sítio de clivagem proteolítica por trombina. (Figura retirada do manual do fabricante GE healthcare).

Apesar deste sistema de expressão em *E. coli* ser bem estabelecido, há vários fatores que podem influenciar na obtenção da proteína de fusão na sua forma solúvel e sua purificação, sendo muito importante a escolha da cepa de *E. coli*, a otimização do processo de multiplicação bacteriana como temperatura e concentração do indutor IPTG e nos diversos passos subsequentes de purificação da proteína (SALUTA, 1998).

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Clonagem e expressão heteróloga do gene estrutural da urease ubíqua de soja, em células de *Escherichia coli*. Além disto, realizar a otimização das condições de expressão, purificação parcial, e caracterização bioquímica da proteína, visando estudos funcionais posteriores.

2.2 Justificativa:

Estudos anteriores de nosso grupo mostraram as ações inseticida, e fungicida das ureases vegetais, incluindo a urease embrião-específica da soja. Entretanto, a outra isoforma encontrada na soja, a urease ubíqua, foi pouco estudada, por ser encontrada em pequenas quantidades em todos os tecidos da planta e assim, dificultar a obtenção de quantidades suficientes desta proteína por métodos convencionais de purificação. Além disto, na literatura está descrito que a provável função desta isoforma é a disponibilização de nitrogênio para a planta, mas como as duas isoformas da soja apresentam similaridade de 85% na sua seqüência de aminoácidos, pode-se sugerir que a urease ubíqua também esteja envolvida na proteção da planta, como é sugerido para a urease embrião-específica.

Um plasmídeo binário de expressão em planta, denominado pGPTV-JIT, contendo o cDNA do gene estrutural da urease ubíqua, foi gentilmente cedido ao nosso laboratório pelo pesquisador Dr. Mark Taylor (Scottish Crop Research Institute, Escócia). Com este cDNA da urease ubíqua da soja, foi tentado sua

expressão em plantas de tabaco. Entretanto, não foi obtido êxito nesta tentativa. Foi tentado também a expressão deste gene em *Escherichia coli*, utilizando plasmídeos da versão pET. Também não foi obtido sucesso.

A partir disto, decidimos realizar a expressão desta proteína, utilizando outro plasmídeo de expressão em *E. coli*, o sistema pGEX de fusão a GST, utilizamos este mesmo cDNA a partir do plasmídeo cedido para nosso grupo. Desta forma procedeu-se à clonagem e expressão da urease ubíqua, sem níquel, a fim de obter quantidades suficientes para estudos funcionais posteriores.

2.3 Objetivos específicos

- Expressar a urease ubíqua recombinante, fusionada a GST, em *E. coli*;
- Otimizar as condições de expressão, para obter a proteína-alvo na fração solúvel;
- Purificar a proteína recombinante utilizando cromatografia de afinidade;
- Clivar a proteína de fusão com trombina;
- Testar a atividade enzimática;
- Caracterizar a proteína recombinante por Western-blot e ELISA.

3. Materiais e Métodos

3.1 Amplificação do cDNA da urease ubíqua de soja

3.1.1 pGPTV-JIT-urease

O cDNA da urease ubíqua de soja foi gentilmente cedido ao nosso grupo pelo pesquisador Dr. Mark Taylor (Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Escócia). O cDNA veio ligado a um plasmídeo de expressão em plantas denominado pGPTV-JIT (Figura 5). O cDNA de 2520 pb foi removido deste plasmídeo com a enzima de restrição *EcoRI* (Fermentas) e ligado ao plasmídeo SK (+) pBluescript (Stratagene) que havia sido previamente digerido por *EcoRI* e defosforilado com a enzima fosfatase alcalina de camarões (Fermentas).

O plasmídeo SK(+)-urease foi seqüenciado no seqüenciador automático ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) utilizando-se os *primers* universais M13 –40 Forward e SK-reverse. Um alinhamento por BLASTn (www.ncbi.org) foi realizado para comparar nossa seqüência com a disponível no GenBank (**No. Acesso AJ276866**). Após a análise da seqüência, foi encontrado um códon de terminação antes do códon de início de tradução (ATG) e a falta de todo o códon de terminação. Para corrigir estes erros, *primers* foram projetados para adicionar a trinca de nucleotídeos ao final da seqüência a retirar o códon de terminação no início da seqüência sem que a seqüência de aminoácidos fosse comprometida. Os *primers* utilizados foram: Seqüência *Forward*: 5' TTA AAA ATG AAA CTG AGT CC 3' e seqüência reversa: 5' TTA AAA GAG GAA GTA ATT TCG 3'. Utilizamos o programa

OligoTech para checar a T_m (temperatura na qual a metade dos oligonucleotídeos estão anelados) e a formação de estruturas secundárias dos oligonucleotídeos, assim como a temperatura necessária para romper estas estruturas.

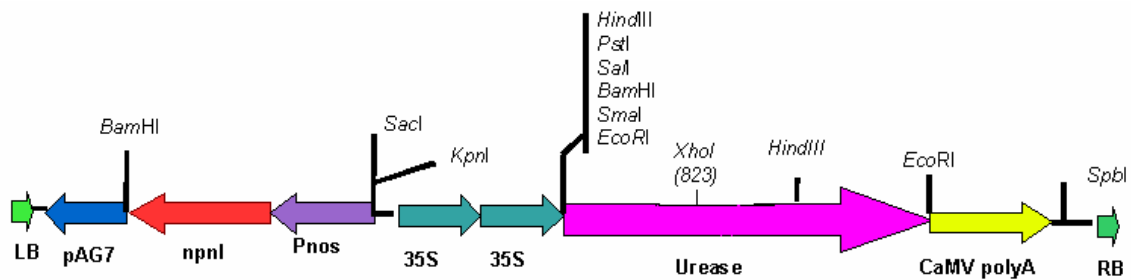


Figura 5. Desenho esquemático do vetor de expressão binário pGPTV-JIT, contendo o cDNA da urease ubíqua. O cDNA foi removido deste plasmídeo com a enzima de restrição *EcoRI*, subclonado em plasmídeo SK (+) pBluescript (Stratagene) e seqüenciado.

3.1.2 Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

A PCR foi realizada num volume final de 50 μ L contendo 250 ng de cada oligonucleotídeo, 10 mM de dNTPs, tampão da enzima na concentração final de 1x, 2,5 U de DNA polimerase pfu (Stratagene) e 50 ng de SK(+)-urease contendo a seqüência da urease ubíqua de 2520 pb como molde. A amplificação foi realizada em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) e teve as seguintes condições reacionais: desnaturação prévia a 94°C por 3 min; 35 ciclos de incubação a 94°C por 30 seg (desnaturação), 41°C por 30 seg (anelamento) e 72°C por 3 min (extensão). A fase de extensão final foi realizada a 72°C por 5 min. O produto da amplificação por PCR foi resolvido por eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo a 0,01 mg/L. O fragmento amplificado de tamanho esperado foi removido do gel e purificado, utilizando-se o Kit de purificação *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences), seguindo-se as recomendações do fabricante.

3.2 **Construção do vetor de expressão:**

3.2.1 Ligação do inserto e transformação de células de *E. coli*

termocompetentes.

O produto de PCR previamente purificado do gel foi fosforilado com a enzima T4-polinucleotídeo quinase (Fermentas). A reação foi realizada nas seguintes condições: 500 ng de DNA (produto de PCR), 1 U de enzima, 1 mM de ATP, tampão

de enzima na concentração final de 1x, volume final de reação de 20 µL. A reação foi incubada a 37°C por 1 h. Após, a enzima foi inativada à temperatura de 65°C durante 15 min.

O vetor de expressão pGEX-4T-2 (GE Healthcare) foi digerido com a enzima de restrição *Sma* I (Fermentas) e defosforilado com a enzima Fosfatase alcalina de camarão (Fermentas). A reação de digestão foi realizada utilizando-se tampão da enzima na concentração de 1x, 500 ng de RNase (GIBCO BRL), 30 U de enzima *Sma* I, 5 µg de plasmídeo pGEX-4T-2 e volume final da reação de 30 µL. A reação foi incubada a 37°C durante 3 horas. A reação de defosforilação foi realizada nas seguintes condições: tampão de enzima na concentração final de 1x, 3 U de enzima Tsap, 3 µg do plasmídeo digerido, e um volume final da reação de 40 µL. Foi incubada a 65°C por 15 min, e inativada com 4 µL de *stop buffer* (GE Healthcare) a 65°C por 15 min.

A reação de ligação foi realizada com 280 ng do produto de PCR e 100 ng do vetor pGEX-4T-2 tratado, 10 U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), tampão da enzima na concentração final de 1x. Procedeu-se incubação à temperatura ambiente por 16 h. Células competentes de *E. coli* DH10B foram transformadas com todo o volume da reação de ligação, por choque térmico.

3.2.2 Seleção das colônias transformadas:

A seleção das colônias contendo o vetor foi realizada por meio da resistência à carbenicilina. Desta forma, as bactérias transformadas foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB ágar e 100 µg/mL de carbenicilina. Somente as bactérias

contendo o vetor formaram colônias nestas condições. Para confirmar a presença do inserto e a correta orientação do mesmo, foi realizada a extração de DNA plasmidial de 6 colônias pelo método de lise alcalina (MANIATIS *et al.*, 1982) e digestão com enzima de restrição *Xho* I (Amersham). Esta enzima possui sítio interno na seqüência da urease e no plasmídeo pGEX-4T-2. A reação de digestão foi realizada utilizando-se: tampão da enzima na concentração final de 1x, 2 µg de DNA plasmidial, 500 ng de RNase e 10 U de enzima. Os produtos da digestão foram resolvidos em gel de agarose a 0,8% sendo que os fragmentos esperados possuem 1700 pb e 5770 pb.

3.2.3. Seqüenciamento do plasmídeo pGEX-4T-2- urease a análise da seqüência

A fim de confirmar os dados de orientação do inserto obtido pela análise de restrição e verificar se houve correção dos erros encontrados anteriormente no cDNA, foram projetados dois pares de *primers* para seqüenciar as extremidades do inserto e internamente a seqüência da urease ubíqua.

O seqüenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol dos *primers* 5'-TGT CAA GTC AAG GTA CTG GAA GA-3' , 5' GTT CAG GTT GAA GCC ACC TT 3', 5'ATG GTG ATC AAA GGT GGT GA 3', 5'AAC TAC CAG CCT TGC CAA AT 3' e 2 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1*

Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no seqüenciador automático. Os dados de seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v1.0.1* (Applied Biosystems) com os parâmetros: *Dye Set* "Z"; *Mobility File* "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"; *BioLIMS Project* "3100_Project1". *Run Module 1* "StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100"; e *Analysis Module 1* "BC-3100SR_Seq_FASTA.saz".

Após seqüenciamento, fizemos análise de toda sequência da urease para verificar se não havia mais qualquer códon de terminação que pudesse comprometer a expressão da proteína recombinante. Para esta análise, utilizamos a ferramenta "Translate a DNA sequence" (www.expasy.ch/tools/dna.html).

3.3 Expressão de urease ubíqua recombinante em *E. coli*:

3.3.1 Transformação das células competentes para expressão

Células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene) foram preparadas para transformação por choque térmico (MANIATIS *et al.*, 1982). Adicionou-se 1 µg do vetor de expressão pGEX-4T-2-urease em 200 µl das células, que foram incubadas no gelo por 30 min. Realizou-se o choque térmico por 2 min a 42° C. As células foram colocadas novamente em gelo e adicionou-se 1 mL de meio de cultura LB (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de cloreto de sódio, em 1L de água destilada, pH 7). A seguir, as células foram colocadas sob agitação de 150 rpm, durante 60 min a 37° C. Após, as células foram semeadas em meio LB ágar, contendo 100 µg/ml de carbenicilina. O controle utilizado foi a *E. coli* BL21 DE3 transformada apenas com o plasmídeo pGEX-4T-2 parental. A transformação foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.3.2 Seleção de colônias recombinantes para expressão da proteína de fusão (GST+urease).

Um total de sete colônias isoladas de *E. coli* BL21:pGEX-4T-2- foram usadas para inocular tubos contendo 2 mL de meio 2x YT (16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura, 5 g de cloreto de sódio, em 1L de água destilada, pH 7,0) contendo carbenicilina (100 mg/L) para verificar a expressão da proteína de fusão GST-urease. As bactérias foram multiplicadas a 37°C, 150 rpm até atingir OD₆₀₀ de 0,7 e, a estas

adicionou-se 1 mM de IPTG. Após 3 h de indução, retirou-se alíquotas de 1 mL, que foram centrifugadas e o sobrenadante desprezado. Adicionou-se aos sedimentos, tampão de amostra suficiente para concentração final de 2x (tampão 6x: 0,35 M de Tris-HCl, pH 6,8, 10% de SDS, 36% de glicerol, 5% de β -mercaptoetanol, 0,012% de azul de bromofenol). As amostras foram fervidas e centrifugadas. Aplicaram-se 20 μ l de cada amostra em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE), posteriormente corado com azul de Coomassie. A bactéria controle foi testada nas mesmas condições descritas acima, mas por possuir o plasmídeo pGEX-4T-2 parental na presença do indutor IPTG expressa apenas GST.

Um clone foi selecionado e feito estoque em glicerol para utilizá-lo na expressão da proteína de fusão. Com este clone, foi realizada otimização das condições de expressão, como descrito a seguir.

3.3.3 Otimização das condições de expressão:

O procedimento realizado foi igual ao descrito no item anterior, com expressão-piloto de 2 mL para a amostra (*E. coli* transformada com o vetor pGEX-4T-2-urease) e 2 mL para controle (*E. coli* transformada com o plasmídeo pGEX-4T-2). Foram retiradas alíquotas de 1 mL após 1, 2, 3 e 16 h de indução da expressão com IPTG nas concentrações de 0,1 mM e 1 mM, e temperaturas de 28 e 37°C. Todas amostras foram igualadas pela mesma quantidade de células por OD₆₀₀. As amostras foram transferidas para microtubos, centrifugadas a 5.000 rpm durante 1 min, e o sobrenadante descartado. Ao sedimento celular foi adicionada quantidade suficiente de tampão de amostra 2x. As amostras foram fervidas por 5 min,

centrifugadas e 20 μ L do sobrenadante foram aplicados a SDS-PAGE 10%, posteriormente corado com azul de Coomassie.

3.3.4 Solubilidade da proteína urease recombinante fusionada a GST

Foram determinadas as melhores condições de expressão para a obtenção de maior rendimento da proteína, na forma solúvel, após a lise das células bacterianas. O procedimento realizado foi igual ao descrito no item anterior, com expressão-piloto de 2 mL de meio de cultura. Foram retiradas alíquotas de 1 mL após 1, 2, 3 e 16 h de indução com IPTG nas concentrações de 0,1 mM e 1 mM, e temperaturas de 28 e 37°C. Todas as amostras foram igualadas para a mesma quantidade de células por OD₆₀₀. As amostras foram transferidas para microtubos, centrifugadas, e o sobrenadante descartado. O sedimento celular foi ressuspendido em 1mL de tampão PBS 1x (140 mM de cloreto de sódio, 2,7 mM de cloreto de potássio, 100 mM de fosfato de sódio, 1,8 mM de fosfato de potássio, pH 7,3), lisado por ultrassom (6 vezes de 30 s com intervalos de 30 s) em gelo, centrifugado a 12.000 rpm por 10 min. Aos sobrenadantes foram aplicados tampão de amostra 2x, e 20 μ L das amostras foram resolvidas em SDS-PAGE 10%, posteriormente corado com azul de Coomassie e as condições de expressão foram analisadas.

3.4 Expressão da urease ubíqua recombinante

Otimizadas as condições de expressão, realizou-se a expressão em maior escala para proceder-se à purificação da proteína recombinante. O meio 2x YTA (200 mL) contendo 100 mg/mL de carbenicilina e 1 μ M de cloreto de níquel foi

inoculado com uma pré-cultura de *E. coli* transformada, na diluição de 1/100, e incubada a 28°C com agitação de 180 rpm. Quando a absorbância em 600 nm alcançou 0,7, a expressão da proteína de fusão foi induzida pela adição de IPTG na concentração final de 0,1 mM. Após 16 h de indução, as células foram centrifugadas por 10 min a 5.000 rpm, o sobrenadante descartado, e o sedimento celular foi suspenso em 10 mL de tampão PBS 1x. As células foram lisadas por ultrassom (6 vezes de 30 s com intervalos de 30 s) em gelo, centrifugadas por 25 min a 12.000 rpm a 5°C. O sobrenadante foi mantido em gelo.

3.4.1 Purificação da proteína de fusão

Utilizaram-se 200 mL de cultura incubada a 28° C com agitação de 180 rpm, indução com 0,1 mM de IPTG durante 16 h. Após a centrifugação e lise celular como descrito no item anterior, o sobrenadante (10 mL) obtido foi submetido à cromatografia de afinidade a glutationa, utilizando 1 mL da resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare), com capacidade de reter 8 mg de proteína recombinante com cauda de GST. A resina foi previamente equilibrada com 20 volumes de PBS 1x. O extrato de *E. coli* foi purificado em filtro com poros de 0,4 µm e incubado com a resina. A amostra foi circulada pela coluna 3 vezes. As proteínas não retidas foram eluídas com 10 mL de PBS 1x. A proteína de fusão retida (GST-urease fusionada) foi eluída da coluna em frações de 0,5 mL de tampão de eluição contendo glutathione reduzida (50 mM de Tris-HCl, 10 mM de glutathione reduzida, pH 8,0). As frações foram quantificadas por absorbância a 280 nm e analisadas por

SDS-PAGE e western-blot. Como controle, nos géis foi utilizada a urease JBU purificada a partir da semente (FOLLMER *et al.*, 2004a), e somente GST.

3.4.2 Purificação e clivagem de proteína de fusão GST-urease

No sistema de expressão pGEX-4T-2, a proteína recombinante possui um sítio para clivagem proteolítica entre a GST e a proteína-alvo. Para se obter a urease livre da GST é necessário fazer-se uma digestão com trombina. Esta digestão pode ser realizada com a proteína fusionada imobilizada na coluna de purificação.

Para tanto, o extrato de *E. coli* foi preparado, sonificado, o sobrenadante circulado pela resina e imobilizado com descrito acima. Com a proteína GST-urease imobilizada na coluna, adicionou-se 10 U de trombina (Sigma) em tampão PBS 1x, incubado durante 20 h à temperatura ambiente para ocorrer a clivagem. A urease livre da cauda de GST foi eluída com tampão PBS 1x acrescido de 500 mM de cloreto de sódio, pH 6,5. As amostras foram quantificadas pelo método de BCA (Bio-Rad) e analisadas em SDS-PAGE 10%.

3.5 Atividade ureásica

Para ensaio da atividade ureásica, as amostras foram previamente dialisadas contra o tampão 20 mM de Fosfato de sódio, 1 mM de EDTA, 5 mM de β -mercaptoetanol pH 7,5, que é o tampão utilizado para estabilizar a enzima. Alíquotas de 50 μ L de solução de uréia (100 mM) foram misturadas com amostras de proteína,

e tamponadas com 20 mM de fosfato de sódio, pH 7,5, obtendo volume final de reação de 500 μ L. A reação foi incubada por 30 min a 37 °C e a amônia formada foi determinada colorimetricamente (WEATHERBURN, 1967).

3.6 Determinação de Proteína

A proteína total das frações foi determinada pelo método de BCA (Bio-Rad) de acordo com instruções do fabricante. Para a quantificação de proteínas por BCA, uma alíquota das amostras foi dialisada contra o tampão PBS 1x para se retirar a glutatona reduzida, a qual pode interferir neste ensaio.

Alternativamente, a concentração de proteína nas amostras foi determinada por absorbância a 280 nm em espectrofotômetro.

3.7 SDS-PAGE

As amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida a 10%, contendo 0,1% de SDS, como descrito por LAEMMLI (1970). As eletroforeses foram conduzidas em aproximadamente 90 min, sob voltagem constante de 200 v e temperatura de 4 °C. O gel foi corado com azul de Coomassie. O marcador de massa utilizado foi o BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen).

3.8 Western blot

Depois de separadas por SDS- PAGE, as amostras foram transferidas por gravidade para uma membrana de PVDF em tampão Tris-Glicina-SDS pH 8,3 contendo 20% de metanol. Após a transferência por 16 h à temperatura ambiente, a

membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em tampão TBS (100 mM de Tris-HCl, 1,5 M de cloreto de sódio, pH 7,5) contendo 0,05% de Tween 20 (TTBS). Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpos anti-CNTX produzidos em coelhos (FOLLMER *et al.*, 2001), e anti-GST produzido em rato (Gentilmente cedido pelo grupo do prof. Arnaldo Zaha) em diluição de 1:10000 e 1:2000, (v/v) respectivamente, durante 2 h. Após três lavagens de 2 min cada, a membrana foi incubada com anticorpos secundários anti-IgG de coelho e anti-IgG de rato, respectivamente, ambos conjugados com a fosfatase alcalina (Sigma) em diluição de 1:15000 durante 2 h. A revelação colorimétrica foi feita usando BCIP a 0,015% e NBT a 0,03% em tampão contendo 10 mM de Tris-HCl, pH 9,6, 100 mM de cloreto de sódio e 5 mM de cloreto de magnésio (TOWBIN *et al.*, 1991).

3.9 ELISA

Para realizar este ensaio, a urease recombinante clivada, a fusionada e o GST foram concentrados e dialisados em cartuchos centricon (Millipore), com cortes de 30 kDa para as ureases e de 10 kDa para o GST, por centrifugação de 4 vezes a 1200 rpm durante 15 min, contra tampão TBS.

Placas para ELISA (Nelge) foram sensibilizadas com 50 µL de amostra/poço (5 µg de amostra diluídas em tampão TBS) durante 16 horas a 4°C. Após este período, as placas foram bloqueadas com 5% de caseína em tampão TBS durante 1 h. Após 3 lavagens com TBS, as amostras foram incubadas com anticorpo primário anti-CNTX com diluição de 1:10000 (v/v) durante 1 h. Após 3 lavagens, as amostras foram expostas ao anticorpo secundário anti IgG de coelho, conjugado com fosfatase

alcalina (Sigma) em diluição de 1:15000 durante 1 hora. As amostras foram reveladas com 50 μ L/poço da solução de revelação contendo 1 mM de *p*-nitrofenilfosfato, 10 mM de borato de sódio e 0,25 mM de cloreto de magnésio, pH 9,0. A absorbância foi medida a 405 nm, e comparada 5 μ g de urease de *C. ensiformis* nas mesmas condições, considerada 100%.

4. Resultados

4.1 Amplificação por PCR e subclonagem do cDNA da urease ubíqua

O cDNA da urease ubíqua de soja, clonado no plasmídeo pGPTV-JIT, foi clivado com *EcoRI* e subclonado em plasmídeo SK(+) e seqüenciado. Os dados obtidos no seqüenciamento mostraram que havia dois erros na seqüência de nucleotídeos quando comparada com a seqüência original depositada no Genbank **(No. Acesso AJ276866)**. Foi observada a presença de um códon de terminação antes do códon de início da tradução (ATG) e faltavam três nucleotídeos do códon de terminação da seqüência. Para corrigir estes erros, *primers* foram projetados, e o cDNA foi reamplificado por PCR como pode ser visto na Figura 6. Assim a região codificadora do gene da urease possui tamanho de 2520 pb. O produto de PCR foi purificado a partir de gel de agarose e ligado com sucesso no vetor de expressão pGEX-4T-2 (desenho esquemático do plasmídeo mostrado na figura 4). A orientação do inserto foi verificada por digestão com a enzima de restrição *XhoI*, sendo o tamanho dos fragmentos esperados de 1700 pb e 5770 pb como é mostrado na Figura 7. Os seis plasmídeos minipreparados resultaram positivos, ou seja, os insertos encontravam-se na orientação correta.

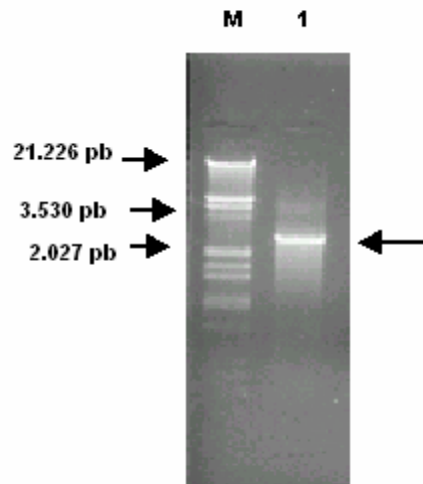


Figura 6. Gel de agarose a 0,8% contendo o fragmento correspondente ao cDNA da urease ubíqua de soja, reamplificado por PCR. **M.** Marcador **1.** Amplificação do cDNA de tamanho de 2.700 pb.

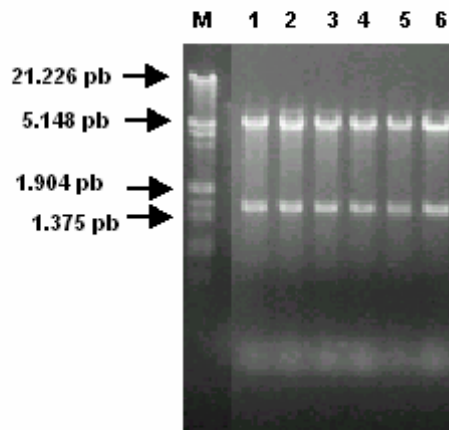


Figura 7. Gel de agarose a 0,8% contendo os dois fragmentos resultantes da digestão do vetor pGEX-4T-2 contendo o cDNA da urease ubíqua de soja. O plasmídeo foi digerido com a enzima de restrição *Xho*I, para checar orientação do inserto. **M.** Marcador, **1-6.** Fragmentos esperados da digestão de 1.700 pb e 5.770 pb.

O produto da preparação de plasmídeos, mostrada na canaleta 2 da Figura 7, contendo pGEX-4T-2-urease, foi utilizada em seqüenciamento para confirmar as correções da seqüência e a fase de leitura. Na figura 8 está apresentada a seqüência de nucleotídeos do inserto e a seqüência deduzida de aminoácidos. Em colorido, está marcado o códon de início de tradução e no final o códon de terminação que foi adicionado na reação de PCR. Esta análise mostrou que os erros anteriormente detectados foram corrigidos com sucesso, que o inserto da urease encontra-se na orientação correta e em fase de leitura com a seqüência de códons do peptídeo da GST codificado no pGEX-4T-2. Esta mesma preparação plasmidial utilizada no seqüenciamento foi usada para transformar células termocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) com vistas à expressão da proteína recombinante.

4.2. Seleção de clones para expressão

Sete colônias de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pGEX4T-2-urease e selecionadas em meio de cultura contendo antibiótico foram utilizadas para inocular 2 mL de meio 2x YT contendo carbenicilina (100 mg/L) e induzidas com 1 mM de IPTG, a fim de selecionar clones para a expressão da proteína de fusão (GST-urease). Após três horas de indução com IPTG em temperatura de 37°C, 1 mL da cultura foi recuperada por centrifugação e tratada com tampão de amostra para SDS-PAGE. Foi obtida uma banda diferencial no perfil da eletroforese do extrato de

células induzidas, em comparação com o controle (sem adição de IPTG), de tamanho correspondente ao esperado para a proteína de fusão, isto é, de 120 kDa, sendo 90 kDa correspondentes à urease e 26 kDa ao GST (Figura 9).

Todos os clones testados expressaram a proteína de fusão, mas o clone da canaleta número 4, indicado com a seta na Figura 9, foi o que expressou a maior quantidade da proteína e foi selecionado para dar continuidade ao trabalho. Com este clone, foram feitas soluções-estoque em glicerol, mantidas em nitrogênio líquido.

1 L K K L S P R E I E K L D L H N A G Y
1 T T A A A A T G A A A C T G A G T C C A A G G G A G A T C G A G A A A C T A G A C C T G C A T A A T G C A G G C T A C
21 L A Q K R L A R G L R L N Y V E T V A L
61 C T T G C A C A G A A A C G C C T T G C T C G T G G T T T A A G G C T C A A T T A T G T T G A A A C T G T G G C T C T C
41 I A T Q I L E F V R D G E K T V A Q L M
121 A T A G C A A C A C A G A T T T T G G A A T T T G T T C G T G A T G G T G A A A A G A C T G T T G C A C A G C T A A T G
61 C I G R E L L G R K Q V L P A V P H L V
181 T G C A T T G G G A G A G A A C T T C T G G G A A G A A A C A A G T T C T T C C A G C T G T C C T C A T C T T G T T
81 E S V Q V E A T F R D G T K L V T I H D
241 G A A A G T G T T C A G G T T G A A G C C A C C T T T C G A G A T G G T A C T A A G T T A G T C A C C A T T C A T G A C
101 L F A C E N G N L E L A L F G S F L P V
301 C T A T T T G C T T G C G A G A A T G G A A A C C T T G A A C T A G C A T T A T T T G G T T C T T T T C T T C C A G T A
121 P S L D K F T E N E E D H R T P G E I I
361 C C T T C A C T T G A C A A G T T T A C A G A G A A C G A A G A A G A T C A T A G A A C T C C A G G T G A A A T C A T A
141 C R S E N L I L N P R R N A I I L R V V
421 T G T A G A A G T G A A A A T C T G A T T C T T A A C C C C A G A A G G A A T G C A A T A A T T C T C A G A G T T G T C
161 N K G D R P I Q V G S H Y H F I E V N P
481 A A C A A G G G A G A C A G A C C A A T T C A G G T T G C C A G C C A C T A T C A T T T T A T G A A G T A A A T C C T
181 Y L T F D R R K A Y G M R L N I A A G N
541 T A T T T A A C C T T T G A T C G A A G G A A A G C A T A T G G C A T G C G C C T C A A T A T A G C T G C T G G G A A T
201 A T R F E P G E C K S V V L V S I G G N
601 G C C A C A C G C T T T G A G C C A G G G A A T G T A A A A G C G T T G T G C T T G T A A G C A T T G G A G G T A A C
221 K V I R G G N N I A D G P V N D S N C R
661 A A A G T C A T C A G A G G A G T A A T A A C A T T G C C G A T G G T C C A G T T A A T G A T T C T A A T T G C A G A
241 A A M K A V V T R G F G H V E E E N A R
721 G C A G C C A T G A A A G C T G T G G T C A C A A G G G A T T T G G A C A T G T G G A A G A G G A A A A T G C T A G G
261 E G V T G E D Y S L T T V I S R E E Y A
781 G A A G G T G T T A C T G G A G A A G A C T A T T C A T T A A C T A C A G T A A T T T C T C G A G A G G A A T A T G C T
281 H K Y G P T T G D K I R L G D T D L F A
841 C A C A A G T A T G G C C T A C A A C T G G T G A C A A A A T C C G T C T T G G T G A T A C T G A C T T G T T T G C T
301 E I E K D F A V Y G D E C V F G G G K V
901 G A A A T T G A A A A A G A T T T T G C T G T C T A T G G T G A T G A A T G T G T T T T T G G A G G T G G G A A G T C
321 I R D G M G Q S S G H P P E G S L D T V
961 A T A A G A G A C G G A A T G G G T C A A T C A A G T G G C C A T C C A C T G A G G G C T C C T T G G A T A C T G T T
341 I T N A V I I D Y T G I I K A D I G I K
1021 A T A A C A A A T G C T G T G A T C A T T G A T T A T A C T G G A A T T A T C A A A G C A G A T A T C G G T A T T A A A
361 D G L I I S T G K A G N P D I M N D V F
1081 G A T G G A C T G A T C A T C T C A A C A G G A A A A G C A G G A A A T C C A G A C A T T A T G A A T G A T G T A T T T
381 P N M I I G A N T E V I A G E G L I V T
1141 C C T A A T A T G A T A A T T G G G G C T A A T A C C G A A G T T A T T G C T G G A G A G G G C T T G A T T G T G A C A
401 A G A I D C H V H F I C P Q L V Y D A V
1201 G C T G G G G C T A T A G A T T G T C A T G T C A T T T T A T A T G T C C T C A A T T A G T A T A T G A T G C C G T A
421 T S G I T T L V G G G T G P A D G T R A
1261 A C A A G T G G T A T C A C A A C A T T A G T G G G A G A G A A C A G G A C C A G C T G A T G G A A C A C G T G C T
441 T T C T P A P N Q M K L M L Q S T D D M
1321 A C A A C T T G T A C A C C A G C A C C A A A T C A G A T G A A A T T G A T G C T A C A A T C A A C A G A T G A C A T G
461 P L N F G F T G K G N S A K P D E L H E

```

1381 CCTTTAAACTTTGGTTTCACTGGAAAAGGAATAGTGCCAAACCTGATGAACTGCATGAA
481 I I R A G A M G L K L H E D W G T T P A
1441 ATAATCAGGGCTGGAGCTATGGGACTGAAGCTGCATGAGGACTGGGGAACACACCGGCT
501 A I D S C L T V A D Q Y D I Q V N I H T
1501 GCAATAGACAGTTGTTTGACAGTTGCAGACCAATATGATATCCAGGTAAACATACATACT
521 D T L N E S G F V E H T I A A F K G R T
1561 GACACCTTAAACGAATCTGGATTGTTGAAACATACAATTGCTGCATTTAAAGGAAGAACT
541 I H T Y H S E G A G G G H A P D I I K V
1621 ATTCATACCTACCACAGTGAAGGAGCTGGTGGTGGCCATGCTCCAGATATCATAAAAGTA
561 C G E K N V L P S S T N P T R P Y T H N
1681 TGTGGTGAGAAGAATGTCCTACCCTCATCAACAAATCCCACACGTCCTTATACACATAAT
581 T I D E H L D M L M V C H H L N K N I P
1741 ACCATAGATGAGCATCTCGACATGTTGATGGTCTGCCATCATCTTAATAAGAATATCCCA
601 E D V A F A E S R I R A E T I A A E D I
1801 GAAGATGTAGCTTTTGTGTAATCAAGAATAAGAGCTGAAACAATGCTGCTGAAGATATT
621 L H D K G A I S I I S S D S Q A M G R I
1861 TTACATGACAAGGGGCAATTAGCATTATATCATCTGATTCACAGGCTATGGGTGCAATT
641 G E V I S R T W Q T A D K M K S Q R G P
1921 GGAGAGGTGATAAGCAGAACCTGGCAAACCTGCTGATAAGATGAAGTCACAAAAGAGACCA
661 L Q P G E D N D N F R I K R Y V A K Y T
1981 CTGCACCTGGTGAAGACAATGACAACCTTCGGATCAAGCGTTATGTTGCAAAGTATACC
681 I N P A I A N G L S Q Y V G S V E A G K
2041 ATAAATCCAGCTATAGCGAATGGTTTGTGCAATATGTTGGTTCAGTTGAGGCGGGTAAG
701 L A D L V L W K P S F F G A K P E M V I
2101 TTGGCTGATCTTGTATTATGGAAGCCGTCATTTTTTGGAGCAAACCAGAAATGGTGATC
721 K G G E V A Y A N M G D P N A S I P T P
2161 AAAGGTGGTGAAGTTGCATATGCTAACATGGGTGACCCAAATGCAAGCATCCCAACACCT
741 E P V I M R P M F G A F G K A G S S H S
2221 GAACCGGTGATTATGAGGCTATGTTCCGAGCATTGGCAAGGCTGGTAGTTCACACTCC
761 I A F V S K A A L D E G V K A S Y G L N
2281 ATTGCTTTTGTGAGCAAGCAGCTTTGGACGAAGGGGTGAAAGCTTCATATGGACTTAAC
781 K R V E A V K N V R K L T K R D M K L N
2341 AAGAGGTGGAAGCTGTGAAGAATGTGAGGAAGCTCACAAACGAGACATGAACTGAAT
801 D T L P Q I T V D P E T Y T V T A D G E
2401 GACACTCTCCACAAATCACTGTGGACCCAGAAACATACACAGTTACAGCAGATGGAGAG
821 V L T C T A A K T V P L S R N Y F L F
2461 GTTCTCACCTGCACCGCAGCCAAGACTGTTCTCTTTCTCGAAATTACTTCTCTTTTAA

```

Figura 8. Seqüência do cDNA da urease ubíqua de soja. Na figura, está representada a sequéncia de 2.520 nucleotídeos amplificada por PCR, para adicionar os nucleotídeos que estavam faltando. Em amarelo está mostrado o nucleotídeo que foi trocado (G por T) para eliminar o códon de terminação, em verde está marcada a primeira metionina (codificada por ATG) e, em vermelho, o códon de terminação da sequéncia. Para esta análise, foi utilizada a ferramenta disponível na página de internet: www.expasy.ch/tools/dna.html.

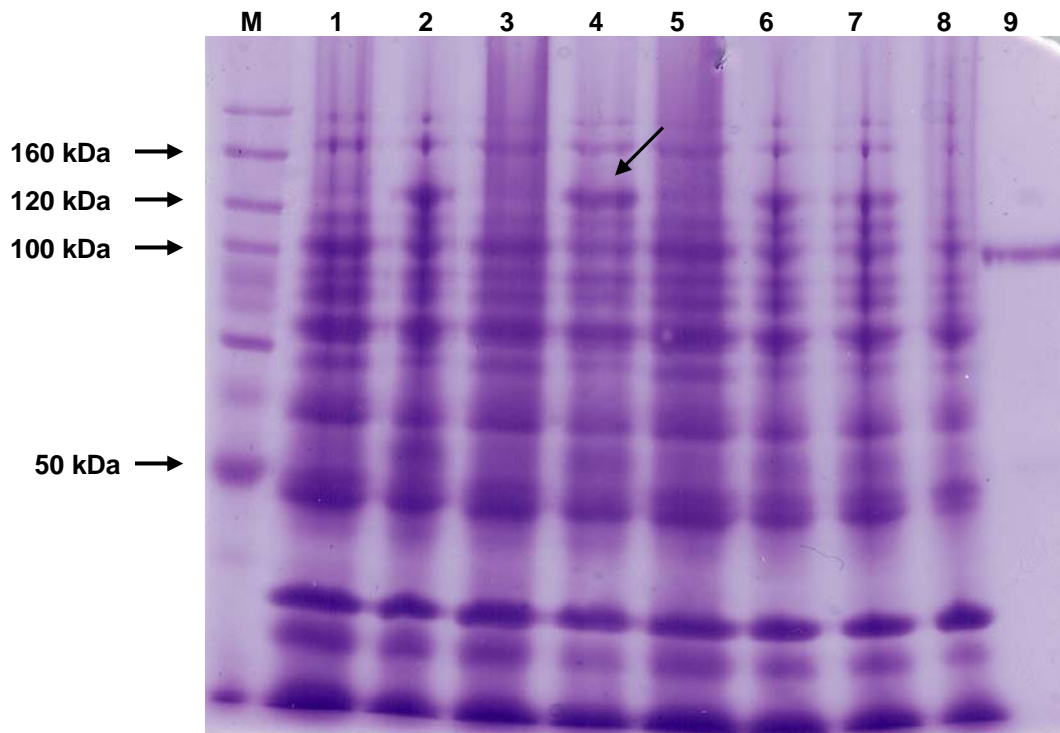


Figura 9. Gel de poliacrilamida a 10% em condições desnaturantes (SDS) para análise da expressão da urease recombinante a partir de colônias de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pGEX-T-2-urease. Legenda: **M.** marcador de massa molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen); **1,3,5 e 8.** Controle (sem indução com IPTG); **2,4,6 e 7.** Amostras induzidas com 1 mM de IPTG durante 2 horas a 37 °C; **9.** 20 µg da Urease de *Canavalia ensiformis* (JBU). A seta indica a banda de 120 kDa correspondente à proteína de fusão (GST+urease) e ao clone selecionado para expressão desta proteína.

4.3 Otimização da expressão da urease ubíqua recombinante de soja

Diversas condições de expressão foram testadas, como pode ser visualizado na Figura 10 (a e b). Não houve diferença significativa na quantidade de proteína expressa nas diferentes condições testadas sem a lise das células bacterianas. Entretanto, quando as células bacterianas foram rompidas por ultrassom, a urease recombinante encontrou-se na fração solúvel (sobrenadante) apenas na condição de indução da expressão com 0,1 mM de IPTG durante 16 h a 28 °C. A proteína de fusão apresentou tamanho aproximado de 120 kDa, o qual corresponde exatamente ao tamanho esperado: urease (~90 kDa) e GST (~26 kDa). A proteína recombinante foi confirmada por Western-blot utilizando como anticorpo primário IgG anti-GST (Figura 11, a e b). O western blot mostra que a bactéria está expressando, além da urease inteira fusionada a GST, também fragmentos da proteína fusionados a GST. Isto pode ocorrer por alguns motivos: se ocorrer falhas durante o processo de tradução de proteínas, a fusão da cauda de GST à porção N- terminal da proteína alvo favorecerá a tradução de fragmentos de urease fusionados a GST. Além disto, o tempo de 16 h de indução, otimizado para expressão da proteína na forma solúvel, também pode favorecer este efeito. Outra explicação provável ou possível é a degradação por proteases, uma vez que, ao lisado de bactérias não foram adicionados inibidores de proteases para se evitar a inibição da trombina no passo posterior de clivagem da proteína de fusão.

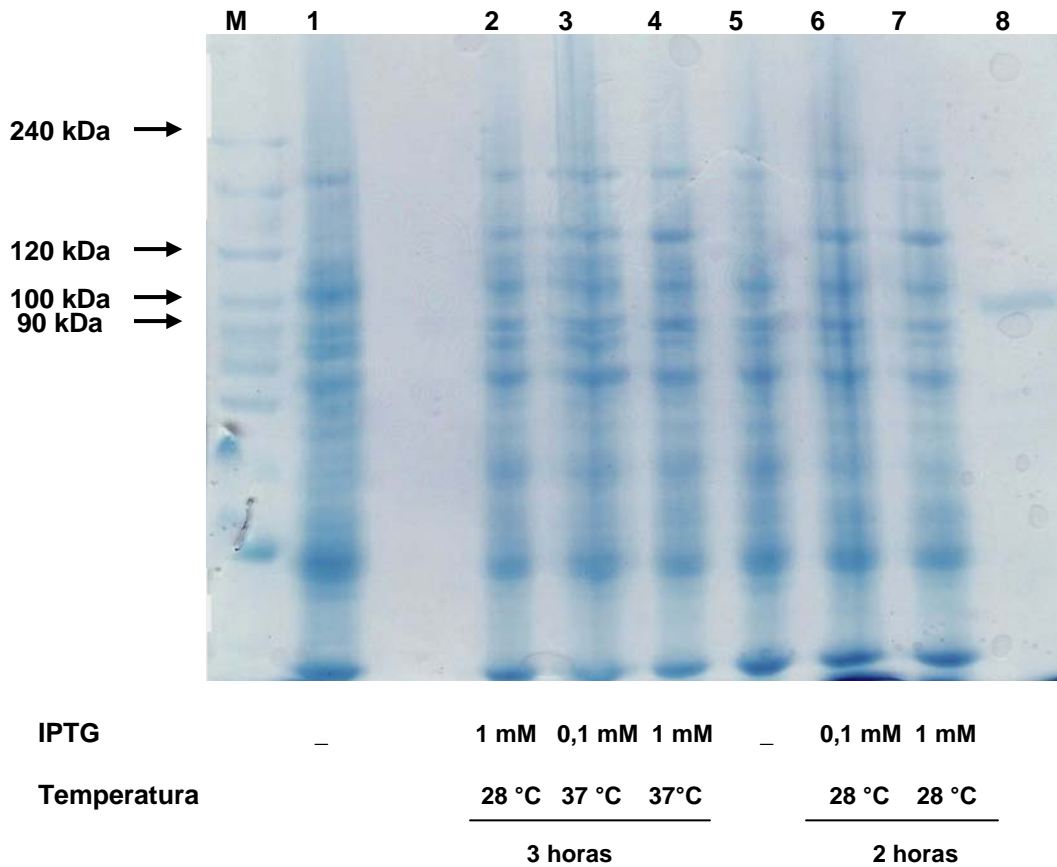


Figura 10a. Análise em SDS-PAGE a 10% da urease ubíqua recombinante em diferentes tempos de indução com IPTG. Legenda: **M.** Marcador de massa molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen); **1 e 5.** Controle negativo (*E. coli* carregando apenas o plasmídeo vazio); **2.** Três horas após indução com 1mM de IPTG a 28 °C; **3.** Três horas após indução com 0,1 mM de IPTG a 37 °C; **4.** Três horas de indução com 1mM de IPTG a 37°C; **6.** Duas horas de indução com 0,1 mM de IPTG a 28 °C; **7.** Duas horas de indução com 1 mM de IPTG a 28 °C, **8:** Urease de *Canavalia ensiformis* (JBU).

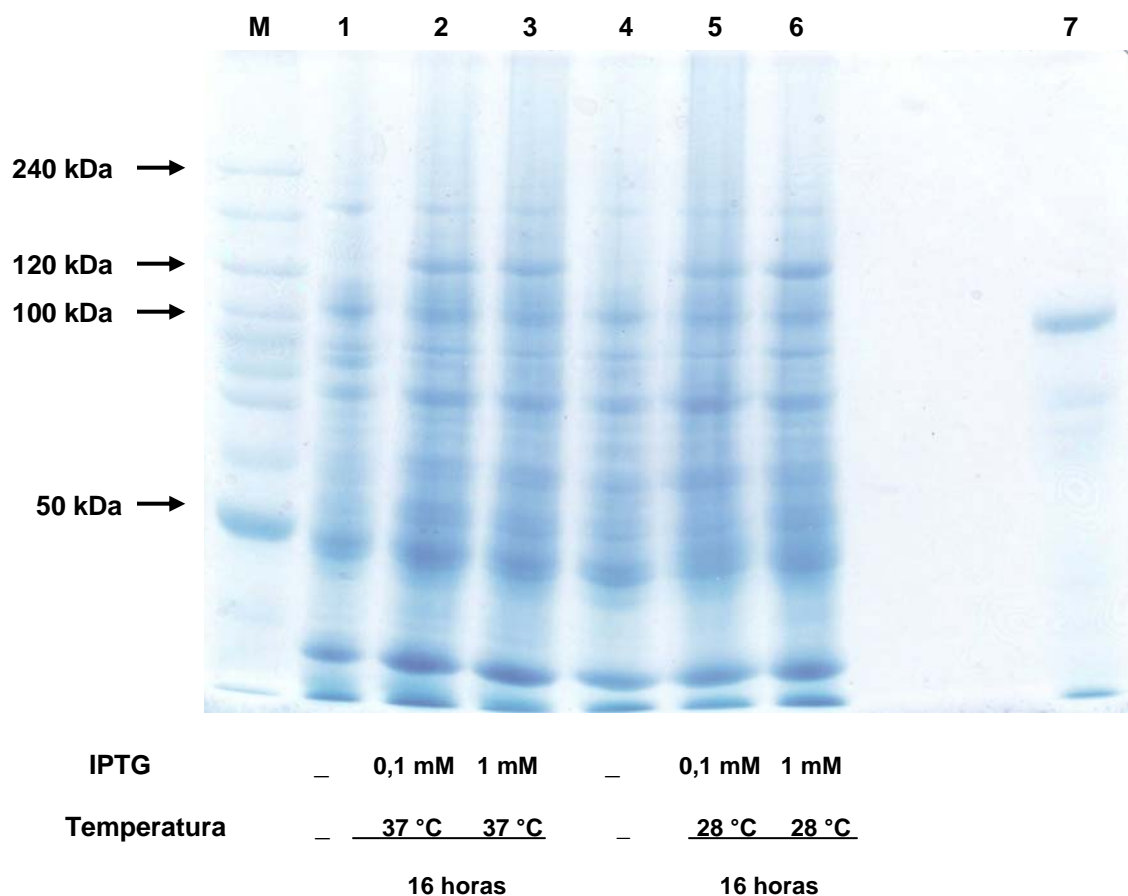
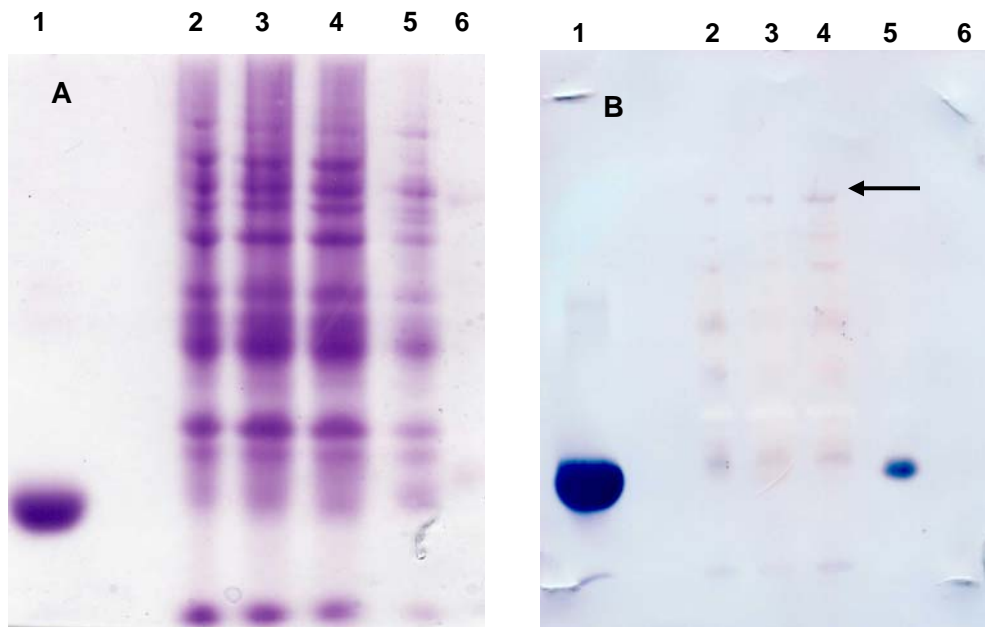


Figura 10 b. Análise em SDS-PAGE a 10% de urease ubíqua recombinante em diferentes tempos de indução com IPTG. **M:** Marcador de massa molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen); **1 e 4:** Controle negativo (*E. coli* carregando apenas o plasmídeo vazio); **2:** Dezesesseis horas após indução com 0,1mM de IPTG a 37 °C; **3:** Dezesesseis horas após indução com 1 mM de IPTG a 37 °C; **5:** Dezesesseis horas de indução com 0,1mM de IPTG a 28°C; **6:** Dezesesseis horas de indução com 1 mM de IPTG a 28 °C; **7:** Urease de *Canavalia ensiformis* (JBU).



IPTG	0,1 mM	0,1 mM	1 mM	_	0,1 mM	0,1 mM	1 mM	_
Temperatura	37 °C	28 °C	37 °C	_	37 °C	28 °C	37 °C	_
	3 horas	16 horas			3 horas	16 horas		

Figura 11. Análise em SDS-PAGE a 10%, da proteína recombinante GST-urease produzida em diferentes condições de expressão. **(A)** Amostras contendo extratos protéicos totais de células de *E. coli* foram resolvidas em gel de poliacrilamida 10% e coradas com azul de Coomassie. Legendas: 1. GST purificado; 2. Três horas de indução com 0,1 mM de IPTG a 37 °C; 3. Dezesesseis horas de indução com 0,1 mM e IPTG a 28 °C; 4. Dezesesseis horas de indução com 1 mM de IPTG a 37 °C; 5. Controle negativo (*E. coli* carregando o plasmídeo vazio), 6. JBU. **(B)** Amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida 10% e as proteínas trasferidas para membrana de PVDF. A membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-GST e com IgG anti-rato conjugado com Fosfatase alcalina. As canaletas são as correspondentes da Figura 11 (A). A seta indica a urease fusionada com tamanho de 120 kDa.

4.3 Purificação da proteína de fusão

A purificação da proteína de fusão GST-urease ubíqua foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando-se a resina Glutathiona Sepharose. A partir da expressão-piloto em 200 mL de meio de cultura, utilizando as condições de expressão padronizadas, as células foram lisadas e o sobrenadante aplicado na resina. As frações enriquecidas com a urease fusionada foram eluídas com tampão de eluição contendo glutathiona reduzida. Em paralelo, foi realizada também expressão em 200 mL de cultura da *E. coli* BL21 (DE3) carregando o plasmídeo pGEX vazio capaz de permitir a expressão das proteínas da bactéria e GST. A multiplicação e a expressão foram realizadas nas mesmas condições utilizadas no item anterior. As células bacterianas também foram lisadas, centrifugadas e o sobrenadante aplicado na coluna contendo a resina Glutathiona Sepharose. As frações das duas purificações foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 12).

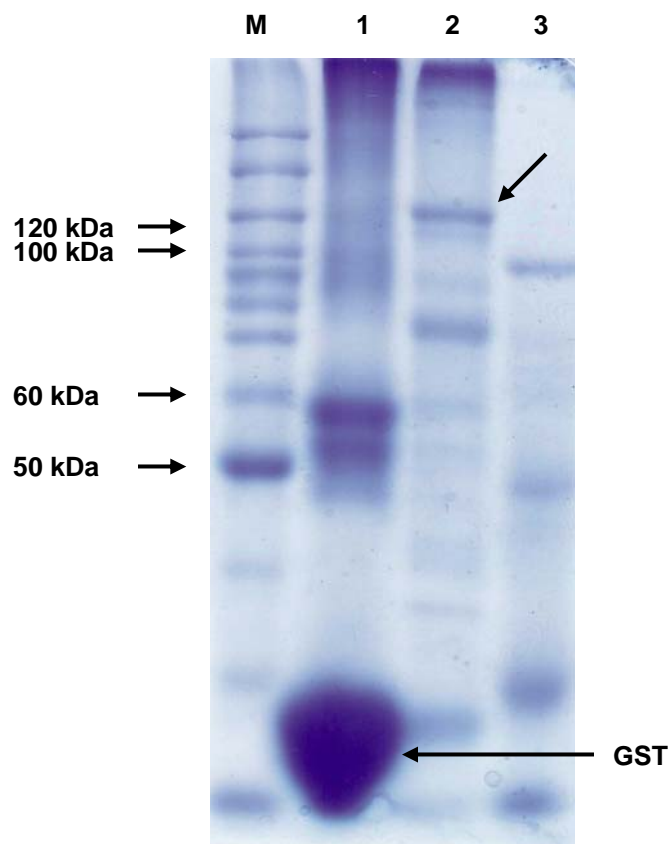


Figura 12. Análise da purificação da proteína de fusão a partir da cultura em 200 mL de meio de cultivo. As células de *E. coli* foram sonicadas, centrifugadas e o sobrenadante submetido à purificação em cromatografia de afinidade, com a resina Glutathione Sepharose. Legendas: **M.** Marcador de massa molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen); **1.** 20 µg da fração eluída da coluna contendo GST, **2.** 20 µg da fração contendo GST-urease eluída da coluna, **3.** 20 µg de JBU purificado da semente.

4.4 Clivagem da proteína de fusão GST-urease com trombina

Para o ensaio foi realizada cultura de *E. coli* BL21 (DE3) em 200 mL de meio de cultivo, nas condições de crescimento otimizadas anteriormente. As células foram sonicadas, centrifugadas e o sobrenadante aplicado na resina Glutathione Sepharose. A resina foi lavada com tampão para remoção de proteínas não-retidas. Foram adicionadas à resina 10 U de trombina (Sigma) e a digestão foi deixada a temperatura ambiente por 20 h. Após este período, a urease clivada foi eluída da coluna com tampão PBS acrescido de cloreto de sódio para que a proteína se desligasse da coluna. Como pode ser visto na Figura 13, após a clivagem, a urease ubíqua recombinante apresentou o tamanho esperado de 90 kDa, o qual pode ser comparado com o da urease de *C. ensiformis*.

As frações eluídas da coluna foram misturadas e o “pool” foi quantificado pelo método de BCA. Foi obtida da cultura em 200 mL de meio de cultivo uma quantidade final de 500 µg da proteína recombinante, sendo este um rendimento aproximado de 2,5 mg/L de meio de cultivo.

A identidade da urease após a clivagem, foi novamente analisada por SDS-PAGE e Western blot, utilizando-se anticorpos anti-CNTX, para as frações contendo a mistura de proteínas fusionada a GST e para a urease após a clivagem com trombina. Como controle positivo utilizamos a urease de *C. ensiformis*. (Figura 14,a e b). O Western blot confirmou a identidade da banda de ~120 kDa que representa a

urease fusionada a GST, e a da banda de ~90 kDa, representando a urease pós-clivagem. O anticorpo também reconheceu bandas menores que devem corresponder a fragmentos da urease fusionada, que mesmo após a cromatografia de afinidade, permaneceram na mistura com a proteína-alvo, devido à fusão com a cauda de GST, que possui afinidade pela glutatona imobilizada na resina. Estes dados confirmaram resultados obtidos no primeiro Western blot com anticorpo anti-GST, o qual mostrou fragmentos de diferentes tamanhos que foram reconhecidos pelo anticorpo.

4.5 Atividade enzimática

Ensaio de atividade enzimática foram feitos para a proteína recombinante fusionada a GST e, também, da urease pós-clivagem, ou seja, livre da cauda de GST. Em nenhuma das duas situações foi detectada atividade ureásica da proteína. Isto provavelmente ocorreu porque a *E. coli* BL21 (DE3) não possui as proteínas acessórias necessárias para a montagem correta da proteína e/ou para promover a inserção do níquel em seu sítio catalítico.

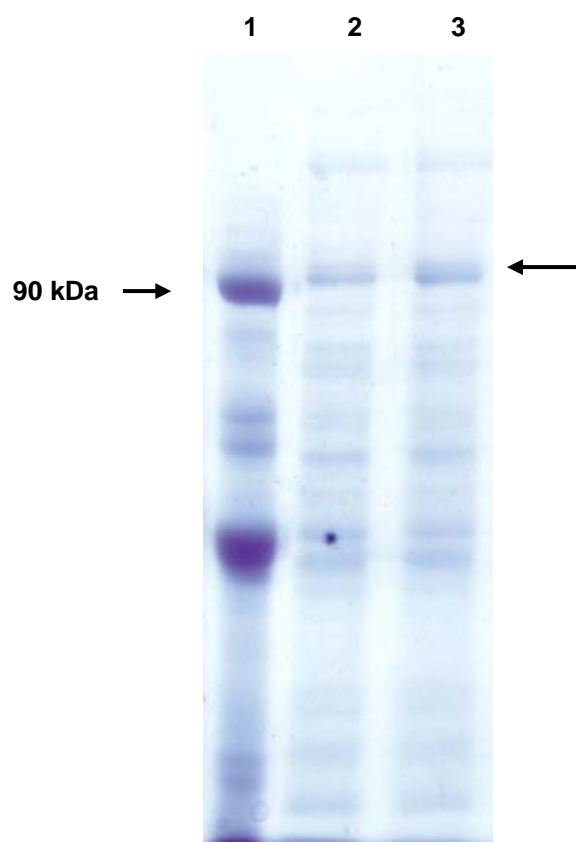


Figura 13. Análise da reação de clivagem da urease fusionada a GST, com trombina, para liberar a urease recombinante. A reação de clivagem foi realizada com as amostras imobilizadas na coluna de afinidade. Após 20 horas de reação à temperatura ambiente, as amostras foram eluídas da resina e analisadas em gel de poliacrilamida a 10%. Legenda: **1.** 20 µg de urease de *C.ensiformis*; **2 e 3.** 20 µg da fração contendo urease ubíqua recombinante após clivagem com trombina. A proteína clivada apresenta após a clivagem o tamanho esperado de ~90 kDa.

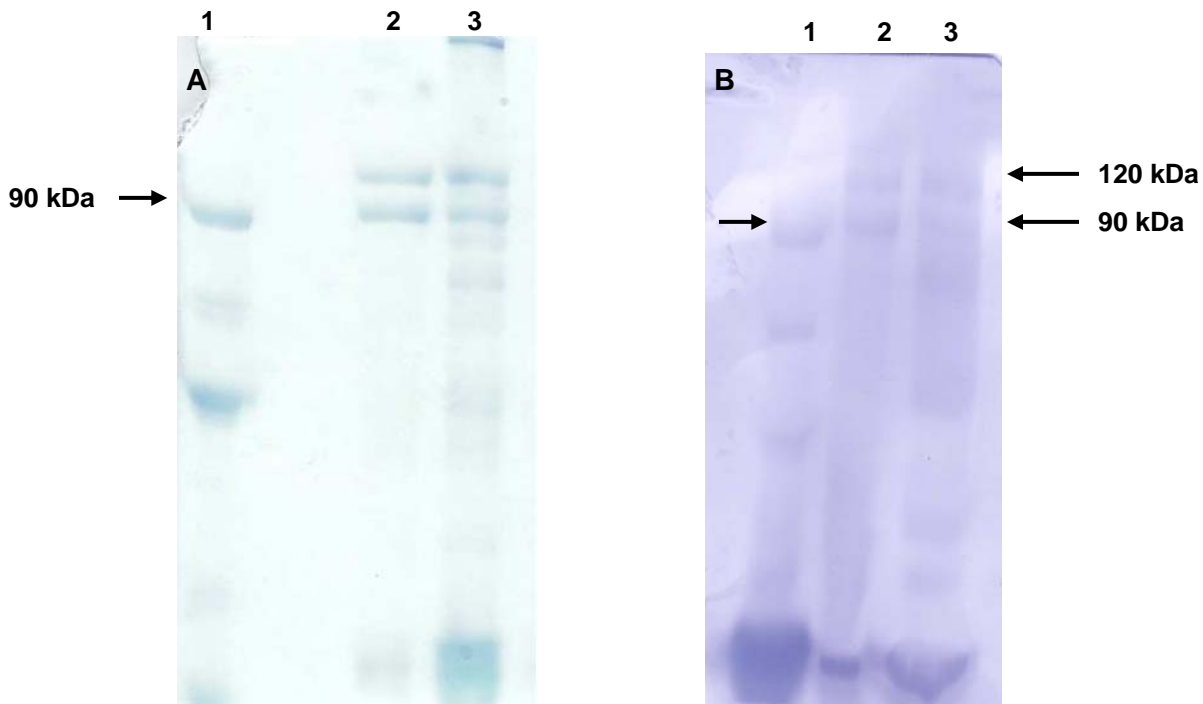


Figura 14. Análise por SDS-PAGE e Western-blot da proteína recombinante após clivagem com trombina. **(A).** Gel de poliacrilamida a 10%. Legenda: **1.** 20 µg urease de *C. ensiformis* (JBU); **2 e 3.** 20 µg das frações contendo a mistura da urease fusionada a GST e da urease ubíqua após clivagem. **(B).** Amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida a 10% e as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF. A membrana foi incubada com anticorpo policlonal anti-CNTX e com IgG anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina. As canaletas são as correspondentes da figura 14 (A). As setas indicam a urease fusionada com tamanho de 120 kDa, a urease clivada com tamanho de 90 kDa e a urease de *Canavalia ensiformis* com tamanho de 90 kDa.

4.5 ELISA

ELISA foi realizado para comparar a imunoreatividade das ureases purificadas a partir da semente, que estão em seu dobramento protéico correto e possuem atividade enzimática, em relação a urease ubíqua recombinante produzida em *E. coli*. O resultado está mostrado nas Figuras 15 e 16. Na Figura 15, é mostrado em gel de poliacrilamida a 10% a urease recombinante fusionada, a urease clivada, bem como a GST livre após concentração e diálise em Centricon (Millipore) com cortes de 30 kDa e 10 kDa, respectivamente. Como foi utilizado anticorpo anti-urease de *C. ensiformis* nos ensaios, o sinal obtido no ensaio para JBU foi considerado como 100%, e as demais amostras tiveram seu sinal calculado em relação a ela.

Como pode ser visto na Figura 16, todas as ureases apresentaram imunoreatividade, inclusive a recombinante, reforçando sua identidade em relação as ureases encontradas na semente. Outro dado importante foi que a urease recombinante, após clivagem com trombina e retirada da cauda de GST, aumentou significativamente sua imunoreatividade, mostrando que esta cauda estava interferindo na sua conformação e na exposição de seus epítomos.

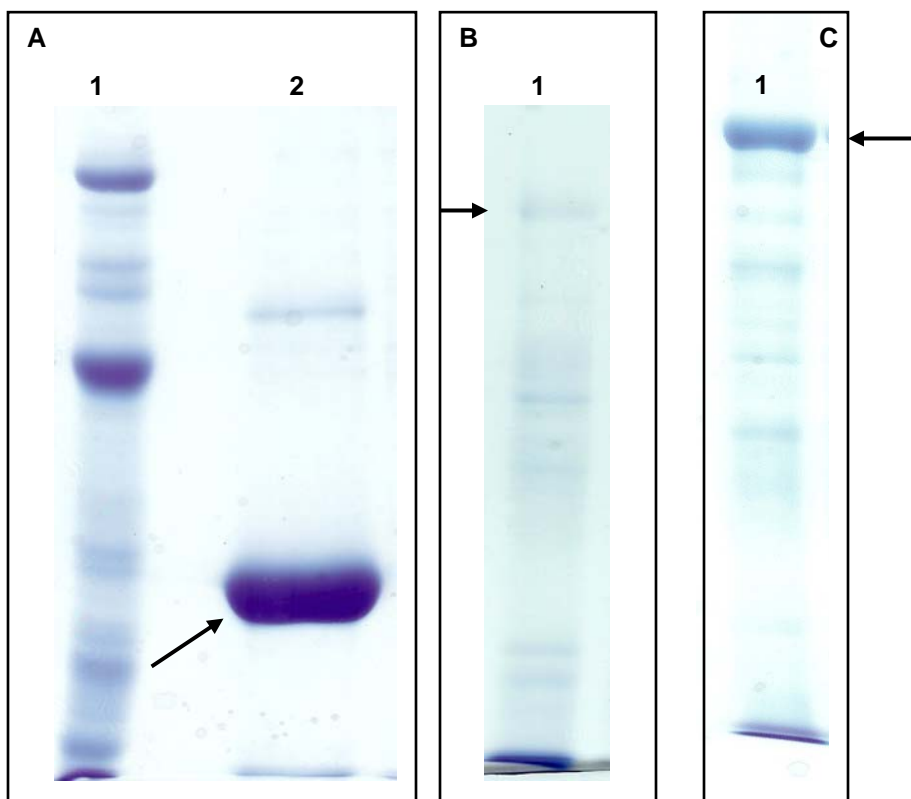


Figura 15. Amostras concentradas e dialisadas em centricon (Millipore) e resolvidas em gel de poliacrilamida a 10%. Legenda: **A:** 1. 20 μ g urease de *C. ensiformis*, 2. Fração contendo GST concentrado em centricon contendo membrana de 10 kDa. **B:** 1. Urease ubíqua recombinante clivada e concentrada em centricon com membrana de 30 kDa. **C:** 1. Urease ubíqua recombinante fusionada a GST, concentrada em centricon contendo membrana de 30 kDa.

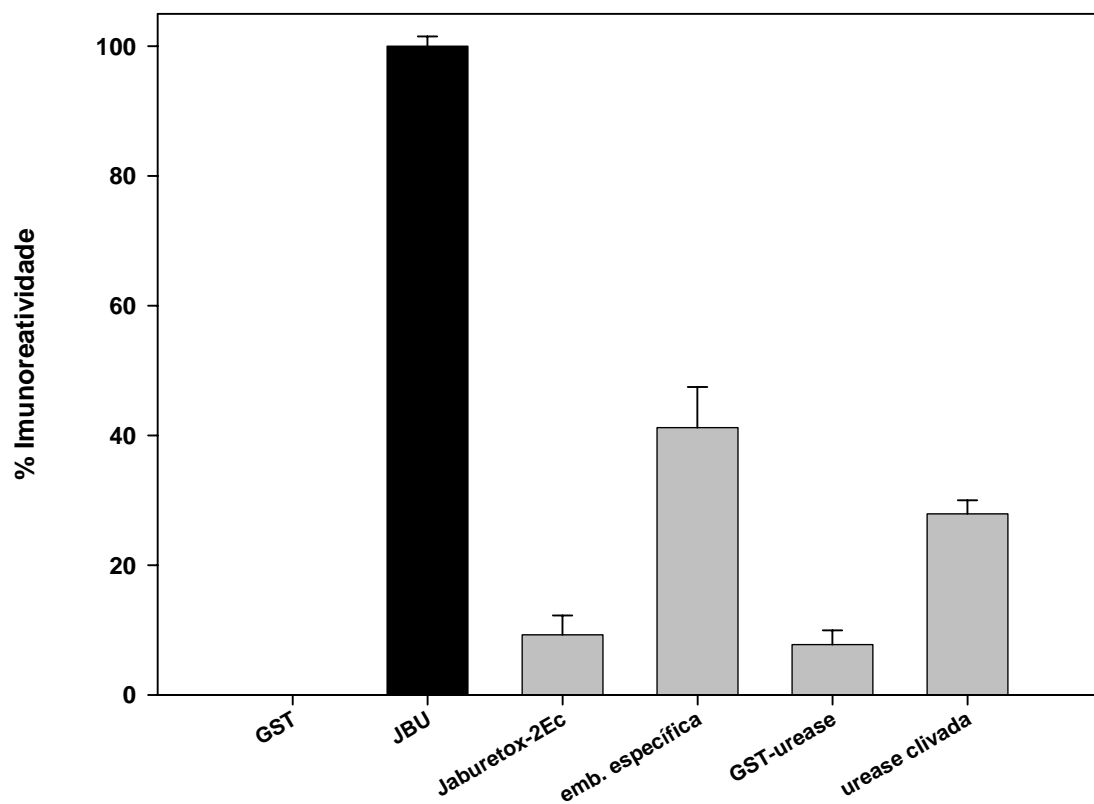


Figura 16. ELISA para comparar a imunoreatividade das ureases vegetais purificadas a partir de sementes, com a urease ubíqua recombinante. Para o ensaio foi utilizado 5 μ g de cada uma das amostras: **(JBU)** urease de *Canavalia ensiformis*, **(emb. específica)** urease embrião-específica de soja. Para calcular a imunoreatividade, a urease de *Canavalia ensiformis* foi considerada 100% e as demais foram calculadas em relação a ela.

5. Discussão

Neste trabalho descrevemos a expressão da urease ubíqua de soja em *Escherichia coli* utilizando um sistema de expressão com fusão à GST. Por meio dele, foi possível realizar a clonagem, a expressão e a padronização de um protocolo capaz de permitir a obtenção de quantidades suficientes da proteína recombinante para sua caracterização bioquímica e permitir a realização de estudos posteriores de atividades biológicas e estruturais. A urease ubíqua recombinante não está enzimaticamente ativa, mas será utilizada em testes de atividades biológicas como atividade inseticida e fungicida, que são independentes da atividade ureolítica.

Estudos de correlação entre estrutura e função de proteínas são centrais no processo de elucidação do mecanismo de ação e identificação de regiões importantes para atividade biológica de proteínas. As ureases são enzimas com seqüências de aminoácidos muito conservadas, desde as isoformas de um mesmo organismo, até aquelas descritas em reinos distintos, como em bactérias, fungos e plantas. O mecanismo de ação da atividade inseticida das ureases é dependente da clivagem proteolítica da urease por enzimas digestivas do inseto, para ocorrer liberação do peptídeo tóxico. Por outro lado, a urease de *Bacillus pasteurii* foi testada (FOLLMER *et al.*, 2004), e não apresentou toxicidade ao inseto *Dysdercus peruvianus*. Entretanto, a urease embrião-específica da soja e JBU, que possuem a região do peptídeo tóxico, apresentam toxicidade contra este mesmo inseto (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; STANISÇUASKI *et al.*, 2005).

Entretanto, esta região do peptídeo tóxico não é responsável pela atividade

fungicida, como foi determinado para a urease de *C. ensiformis*, para a urease embrião-específica da soja e urease de *Helicobacter pylori* (RITT *et al.*, no prelo). Confirmando esta hipótese, o peptídeo recombinante tóxico, derivado da JBU, Jaburetox-2Ec (MULINARI *et al.*, 2004), não apresentou atividade fungicida sobre diferentes fungos testados (dados não publicados). Estes dados sugerem que existe outra região da molécula da urease, não correspondente à do peptídeo, responsável pela atividade contra fungos. Testes com a urease ubíqua recombinante para verificar se esta apresenta as atividades descritas para outras ureases, corroborarão com a idéia de que estas enzimas podem estar envolvidas na proteção da planta.

MONCRIEF & HAUSINGER (1996) obtiveram a clonagem e a expressão das diferentes proteínas acessórias e realizaram estudos de suas funções na montagem e na ativação da urease de *Klebsiella aerogenes*. MCGEE *et al.*, (1999) relataram a expressão da urease de *H. pylori* com as próprias proteínas acessórias, que modulam a atividade enzimática, utilizando o plasmídeo pHP8080, e a cepa de *E. coli* SE5000. Em relação a ureases vegetais, foi realizado o estudo e identificação das proteínas acessórias AtUreD, AtUreF, AtUreG, necessárias para ativação da urease de *Arabidopsis thaliana* (WITTE *et al.*, 2005).

Nesse trabalho, o cDNA da urease ubíqua foi amplificado por PCR, clonado em pGEX-4T-2 e inserido em *E. coli* BL21 (DE3). Os clones transformantes foram testados e as condições de expressão foram otimizadas. A melhor condição de expressão foi obtida com indução da cultura bacteriana com 1 mM de IPTG durante 16 h a 28 °C. Nas demais condições testadas, a proteína de fusão (GST-urease) apresentou-se insolúvel após a lise das células bacterianas, formando agregados ou

corpos de inclusão.

Uma técnica recomendada para limitar a agregação de proteínas recombinantes *in vivo*, consiste no cultivo das bactérias em temperaturas reduzidas (SCHEIN, 1989). A reação de agregação é, em geral, favorecida pelas interações hidrofóbicas e estas são fortemente dependentes de temperaturas altas (KIEFHABER, 1991). A consequência direta da redução de temperatura é a eliminação parcial de proteases “heat shock” induzidas em condições de super-expressão, além do aumento da atividade e expressão de chaperonas em temperaturas próximas de 30 °C (MOGK *et al.*, 2002). Logo, o aumento da estabilidade e do correto dobramento da proteína recombinante sob baixas temperaturas pode ser explicado por estes fatores (SORENSEN *et al.*, 2005).

Na descrição original do sistema de expressão pGEX, foi sugerido que a maioria das proteínas fusionadas a GST ficariam na fração solúvel após a lise, quando em presença de detergentes não-iônicos, como Triton X-100 (SMITH *et al.*, 1988). FRANGIONI *et al.*, (1992) mostraram que muitas proteínas fusionadas a GST podem ser solubilizadas com o detergente sarcosil, sendo que o tratamento subsequente com detergente não-iônico, permite que a proteína de fusão ligue-se com maior afinidade à resina Glutathione~Sepharose. No entanto, no presente trabalho, quando as células bacterianas foram lisadas em presença de tampão PBS contendo Triton X-100, a proteína GST-urease ficou na fração insolúvel na maioria das condições testadas.

Outra variável importante que afetou a ligação da proteína de fusão à resina é o tempo de sonicação. Um tempo longo de sonicação pode levar à desnaturação da

GST e comprometer a sua ligação a Glutathiona-Sepharose (FRANGIONI *et al.*, 1992). A melhor condição de lise por ultrassom neste trabalho foi a de 6 ciclos de 30 s com intervalos de 30 s, em gelo.

Após a lise das células bacterianas, a fração solúvel contendo a proteína de fusão foi aplicada na resina Glutathiona-Sepharose visando sua purificação. A presença da cauda de fusão na região N-terminal da proteína permite sua purificação com apenas um passo cromatográfico. Como apresentado na Figura 12, a cromatografia de afinidade foi insuficiente para se obter a proteína GST-urease purificada. Provavelmente isto ocorreu devido à expressão de fragmentos da urease fusionados à GST, favorecido pela fusão na porção N-terminal da proteína recombinante, e/ou por clivagem de proteases produzidas pela bactéria.

São encontradas no mercado diversas enzimas proteolíticas usadas para a clivagem de proteínas de fusão. Entretanto, há um grande número de problemas associados a seus usos, por exemplo, a clivagem pode ser incompleta e causar a diminuição do rendimento da proteína. Pode ainda deixar aminoácidos indesejados na extremidade N- ou C- terminal, ou ocorrer clivagem interna da proteína recombinante (HUNT, 2005). Em outros casos, a clivagem proteolítica é realizada com sucesso, mas a proteína recombinante não permanece solúvel após a remoção da cauda de fusão (ESPOSITO *et al.*, 2006). Neste trabalho, a clivagem e a eluição da proteína recombinante ainda podem ser otimizados, pois houve clivagem incompleta da cauda GST da urease ubíqua recombinante. Assim, após a eluição com PBS, obtivemos a urease ainda fusionada e a urease sem a cauda GST na mesma fração. Um melhor resultado foi obtido aumentando-se o tempo de clivagem de 16 h para 20 h além de alterações na condição de eluição, com a diminuição do

pH do tampão de 7,3 para 6,5, além da adição de 500 mM de cloreto de sódio, resultando em frações distintas contendo a urease clivada e a fusionada. O rendimento da urease clivada foi de aproximadamente 2,5 mg/L de cultura. FANG *et al.*, (2004) obtiveram um rendimento de 3-4 mg/L de cultura para a proteína TFF3 (31 kDa) de humanos em *E. coli* com plasmídeo pGEX-4T-1.

Após a clivagem com trombina, a urease ubíqua recombinante foi testada quanto à sua atividade ureolítica. Nenhuma atividade foi detectada, sugerindo que a urease não está ativa como enzima. Isto aconteceu, provavelmente, porque uma ativação pós-traducional é necessária para todas as ureases (POLACCO & HOLLAND, 1993) e a bactéria *E. coli* BL21 (DE3) não possui estas proteínas acessórias necessárias para esta ativação. Este processo é bem conhecido para as ureases de origem bacteriana, como as de *Klebsiella aerogenes* e de *Helicobacter pylori*. A urease bacteriana mais bem caracterizada do ponto de vista estrutural é a da *K. aerogenes*. Os seis genes que constituem o operon da urease nesta bactéria foram clonados e seqüenciados. Os genes *ureA*, *ureB* e *ureC* codificam as cadeias polipeptídicas A, B e C que compõem essa enzima (formada por três subunidades) e os genes *ureD*, *ureE*, *ureF* e *ureG* codificam as proteínas acessórias D, E, F, e G, respectivamente, importantes para a incorporação dos átomos de níquel e ativação da apoenzima urease (MULROONEY & HAUSINGER, 1990; MOBLEY *et al.*, 1995). A UreD parece ter função de chaperona, inserindo níquel na apourease (PARK *et al.*, 1994). A UreG contém o nucleotídeo de ligação ao “P-loop” essencial para a ativação *in vivo*, enquanto a UreE contém uma região C-terminal rica em histidinas, sendo capaz de ligar níquel, com ou sem o segmento rico em histidinas (BRAYMAN *et al.*, 1996). A urease de *H. pylori* possui massa molecular de aproximadamente 540

kDa. É uma metaloenzima níquel-dependente e hexamérica. O monômero desta proteína é composto por duas cadeias polipeptídicas (UreA e UreB) em proporção de 1:1 (DUNN *et al.*, 1990). Pelo menos sete genes estão envolvidos na produção desta urease: os genes *ureA* e *B* codificam as duas subunidades que compõem a enzima, enquanto que os genes *ureE*, *F*, *G*, *H* codificam proteínas acessórias responsáveis pela incorporação do níquel no centro ativo da urease. O gene *ureI* codifica uma proteína que atua como um canal na membrana externa, agindo na internalização da uréia. Além desses genes, uma proteína transportadora de níquel é expressa a partir do gene *nixA* (MOBLEY *et al.*, 1995).

Em plantas, este processo ainda está pouco elucidado, em parte porque os genes acessórios não estão em agrupamentos e, na maioria dos casos, não foram identificados ou isolados. Em batata, foi caracterizado o gene da proteína acessória da urease (*ureG*), demonstrando a sua capacidade de substituir o gene *ureG* de bactéria, implicando em um envolvimento direto do gene *ureG* na ativação da urease de planta (WITTE *et al.*, 2001). Na soja, *Eu2* e *Eu3* foram identificados como genes acessórios da urease. O gene *Eu3* codifica a proteína de ligação de níquel, e apresenta considerável identidade com o gene *ureG* de bactérias (FREYERMUTH *et al.*, 2000). A função da proteína codificada pelo gene *Eu2* permanece desconhecida, mas os parálogos UreD e UreF são possíveis candidatos para sua função (BACANAMWO *et al.*, 2002).

A obtenção de apourease (sem níquel) e sem atividade enzimática solúvel e estável ao armazenamento era um dos objetivos desse trabalho. Estudos posteriores para investigar quais atividades biológicas independentes de atividade ureolítica a apourease eventualmente apresentará, facilitará estudos de estrutura frente a

função e o mapeamento de domínios responsáveis por essas atividade da proteína.

No teste de Elisa, a urease embrião-específica nativa apresentou ~ 45% do reconhecimento da urease de *C.ensiformis* para o anticorpo policlonal anti-canatoxina, sendo que essas ureases compartilham 80 % de identidade. Apesar de poder ocorrer imunodominância do anticorpo a diferentes epitopos expostos na proteína, o fato da urease ubíqua recombinante, desprovida de níquel, apresentar cerca de 60% da imunorreatividade apresentada pela urease embrião específica frente ao mesmo anticorpo, indica que a proteína recombinante adquiriu parte do *fold*ing da proteína nativa. Como dito na introdução, as isoformas de urease da soja têm 85 % de identidade na seqüência primária. Para realizar o ensaio de ELISA, foi necessário concentrar as amostras utilizando o Centricon (Millipore). As duas formas da proteína recombinante mostraram-se instáveis nesse processo de concentração, e precipitaram quando mantidas em concentrações maiores do que 1mg/mL. Este dado é interessante, pois a urease recombinante comportou-se de forma semelhante às ureases purificadas a partir das plantas. (FOLLMER et al., 2001), mostraram que a CNTX, isoforma da urease de *C. ensiformis*, é inativada no processo de congelamento e descongelamento, e é instável se mantida em solução em concentrações maiores do que 1mg/mL.

Por fim, o método de expressão da proteína recombinante, desenvolvido neste trabalho, permitirá a obtenção em pequena e média escala da urease ubíqua da soja, possibilitando estudos que antes eram inviáveis, devido à grande dificuldade de obtenção e purificação desta isoforma a partir da planta. Assim poderão ser realizados ensaios de toxicidade a fungos e insetos, agregação plaquetária, determinação da presença de metais, além de estudos de cristalografia com a

proteína recombinante, tendo sido atingidos, desta forma, todos os objetivos propostos para o presente trabalho.

6. Perspectivas

- Ensaio biológicos, com a urease ubíqua de soja recombinante, que são independentes da atividade enzimática:
 - Atividade inseticida;
 - Atividade fungicida e/ou fungistática;
 - Agregação plaquetária.
- Análise da estrutura tridimensional da proteína recombinante através de ensaio de Dicroísmo circular, e cristalografia para comparação da estrutura da proteína recombinante com as demais ureases vegetais (JBU de *C. ensiformis* e urease embrião-específica da soja).
- Avaliação da presença de metais (níquel) na proteína recombinante, através de ensaio de PIXE.

7. Referências

ARNAU, J.; LAURITZEN, C.; PETERSEN, G.E.; PEDERSEN, J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* 48: 1-13, **2006**.

BACANAMWO, M.; WITTE, C.P.; LUBBERS, M.W. Activation of the urease of *Schizosaccharomyces pombe* by the UreF accessory protein from soybean. *Mol. Genet. Genomics.* 268: 525-534, **2002**.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 411-421, **1999**.

BARCELLOS, G. B. S.; ALMEIDA, L. M.; MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S., OLIVEIRA, J. T. A.; CARLINI, C. R. Canatoxin, concanavalin A and canavalin-cross-reactive materials during maturation of *Canavalia brasiliensis* seeds. *Planta* 189: 397-402, **1993**.

BECKER-RITT, A.B.; MARTINELLI, A.H.S.; MITIDIERI, S.; FEDER, V.; WASSERMANN, G.E.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M.H.; OLIVEIRA, J.T.A.; FIUZA, L.M.; PASQUALI, G.; CARLINI, C.R. Antifungal Activity of Plant and Bacterial Ureases. *Toxicon*, no prelo.

BRAYMAN, T.G. & HAUSINGER, R.P. Purification, characterization, and functional analysis of a truncated *Klebsiella aerogenes* UreE urease accessory protein lacking the histidine-rich carboxyl terminus. *J. Bacteriol.* 178: 5410-5416, **1996**.

CARLINI, C. R. & GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon* 19: 667-676, **1981**.

CARLINI, C. R. & GUIMARÃES, J. A. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon* 29: 791-806, **1991**.

CARLINI, C. R. & UDEDIBIE, A. B. I. Comparative effects of processing methods on hemagglutinating and antitryptic activities of *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* seeds. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4372-4377, **1997**.

CARLINI, C. R.; OLIVEIRA, A. E.; AZAMBUJA, P.; XAVIER-FILHO, J.; WELLS, M. A. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. *J.Econ.Entomol.* 90: 340-348, **1997**.

CARLINI, C.R. & GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40: 1515-1539, **2002**.

CARLINI, C.R.; GOMES, C.B.; GUIMARÃES, J.A. Central nervous effects of the convulsant-protein canatoxin. *Acta Pharmacol Toxicol.* 54: 161-166, **1984**.

CHANT, A.; KRAEMER-PECORE, C.M.; WATKIN, R.; KNEALE, G.G. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformation change at the DNA-binding site. *Protein Exp. Purif.* 39: 152-159, **2005**.

CONNELL, S.R.; TRACZ, D.M.; NIERHAUS, K.H.; TAYLOR, D.E. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3675-3681, **2003**.

DIXON, N. E.; GAZZOLA, C.; WATTERS, J. J.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Inhibition of jack bean urease (EC 3.5.1.5) by acetohydroxamic acid and by phosphoramidate. An equivalent weight for urease. *J.Am.Chem.Soc.* 97, 4130-4131, **1975**.

DUNN, B.E. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J.Biol.Chem.* 265: 9464-9469, **1990**.

ESPOSITO, D. & CHATTERJEE, D.K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr. Opin. Biotech.* 17: 353-358. **2006**.

FANG, M.; WANG, W.; WANG, Y.; RU, B. Bacterial expression and purification of biologically active human TFF3. *Peptides*, 25: 785-792, **2004**.

FERREIRA-DASILVA, C.T.; GOMBAROVITS, M. E. C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C. M.; CARLINI, C. R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44 (4): 162-171, **2000**.

FOLLMER, C.; BARCELLOS, G. B. S.; ZINGALI, R. B.; MACHADO, O. L. T.; ALVES, E. W.; BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J. A.; CARLINI, C. R. Canatoxin, a toxic protein of jackbeans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5). Biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem J.* 360: 217-224, **2001**.

FOLLMER, C., WASSERMANN, G. E., CARLINI, C. R. Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Science* 167: 241-246, **2004a**.

FOLLMER, C.; REAL-GUERRA, R.; WASSERMAN, G. E.; OLIVEIRA-SEVERO, D.; CARLINI, C. R. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases. Biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur. J. Biochem.* 271, 1357-1363, **2004**.

FRANGIONI, J.V. & NEEL, B.G. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione-S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Bioch.*, 210: 179-187, **1993**.

FREYERMUTH, S.K.; BACANAMWO, M.; POLACCO, J.C. The soybean EU3 gene encodes an Ni-binding protein necessary for urease activity. *Plant J.* 21: 53-60, **2000**.

HANNING, G.; MAKRIDES, S.C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.*, 16: 54-60, **1998**.

HUNT, I. From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. *Protein Exp. Purif.* 40: 1-22. **2005**.

KIEFHABER, T; RUDOLPH, R.; KOHLER, H.H.; BUCHNER, J. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology*, 9: 825-829, **1991**.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, **1970**.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAM BROOK, J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory, **1982**.

MCGEE, D.J.; MAY, C.A.; GARNER, R.M.; HIMPSL, J.M.; MOBLEY, H.L.T. Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. *J. Bacteriol.* 181: 2477-2484, **1999**.

MEYER-BOTHLING, L. E.; POLACCO, J. C. Mutational analysis of the embryo specific urease locus of soybean. *Mol. Gen. Genet.* 209: 439-444. **1987.**

MOBLEY, H. L.; ISLAND, M. D; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev.* 59: 451-480, **1995.**

MOGK, A.; MAYER, M.P.; DEUERLING, E. Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology. *Chem. Biochem.*, 3: 807-814, **2002.**

MONCRIEF, M.B.C. & HAUSINGER, R.P. Purification and activation properties of UreD-UreF-urease apoprotein complexes. *J. Bacteriol.* 178: 5417-5421, **1996.**

MULINARI, F. Jaburetox-2Ec: um peptídeo recombinante derivado de urease de *Canavalia ensiformis* com potencial bioinseticida. Dissertação de Mestrado, UFRGS, **2004.**

MULROONEY, S.B. & HAUSINGER, R.P. Sequence of the *Klebsiella aerogenes* urease genes and evidence for accessory proteins facilitating nickel incorporation. *J. Bacteriol.* 172: 5837-5843, **1990.**

OLIVEIRA, A. E. A.; GOMES, V. M.; SALES, M. P.; FERNANDES, K. V. S.; CARLINI, C. R; XAVIER-FILHO, J. The toxicity of jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC.] canatoxin to plant pathogenic fungi. *Rev. Brasil. Biologia* 59: 59-62, **1999.**

PARK, I.S.; CARR, M.B.; HAUSINGER, R.P. In vitro activation of urease apoprotein and role of ureD as a chaperone required for nickel metallocenter assembly. *Proc.Natl Acad. Sci. USA*, 91: 3233-3237, **1994**.

POLACCO J.C. & HOLLAND, M. A. Roles of urease in plant cells. *International Review of Cytology*. 145: 56-103, **1993**.

POLACCO, J. C. & SPARKS, J. R, R. B. Patterns of urease synthesis in developing soybeans. *Plant Physiol*. 70: 189-194, **1982**.

POLACCO, J. C. & WINKLER. R. G. Soybean leaf urease: a seed enzyme? *Plant Physiol*. 74:800-803, **1984**.

POLACCO, J.C.; JUDD, A.K.; DYBING, J.K.; CIANZIO, S.R. A new mutant class of soybean lacks urease in leaves but not in leaf-derived callus or in roots. *Mol. Gen. Genet.*, 217:257-262, **1989**.

SALUTA, M. & BELL, P.A. Troubleshooting GST fusion protein expression in *E. coli*. *Amersham Biosciences*. **1998**.

SCHEIN, C.H. Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Biotechnology* 7: 1141-1148, **1989**.

SIRKO, A. and BRODZIK, R. Plants ureases: roles and regulation. *Acta Biochim. Pol.* 47, 1189-1195, **2000**.

SMITH, D.B. & JOHNSON, K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. *Gene* 67: 31-40. **1988**.

SORENSEN, H.P. & MORTENSEN, K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 1-16, **2004**.

SORENSEN, H.P. & MORTENSEN, K.K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb. Cell fact.* 4: 1-8, **2005**.

STANISQUASKI, F.; FERREIRA-DASILVA, C.T.; MULINARI, F.; PIRES-ALVES, M.; CARLINI, C.R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Toxicon.* 45: 753-760, **2005**.

SUMNER, J. B. & HOWELL, S. F. Identification of the hemagglutinin of jackbean with Con A. *J. Bacteriol.* 32: 227-240, **1936**.

SUMNER, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.* 69: 435-441, **1926**.

TERPE, K. Overview of bacterial expression system for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial system. *Appl. Microbial Biotechnol.* 72: 211-222, **2006**.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C; GARCIA, E.S. Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochem.* 18: 423-434, **1988**.

TORISKI R. S.; GRIFFIN, J. D.; YENOFKY R. L.; POLACCO, J. C. A single gene (*Eu4*) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. *Mol. Gen. Genet.* 242:404-414, **1994**.

TOWBIN, W.T.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: a procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. of Sci. USA*, 76 (9): 4350-4353, **1979**.

VILLAVERDE, A.; CARRIO, M.M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.*, 25: 1385-395, **2003**.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39: 971-974, **1967**.

WITTE, C. P.; TILLER, S. A.; TAYLOR, M. A.; DAVIES, H. V. Leaf urea metabolism in potato: urease activity profile and patterns of recovery and distribution of 15 N after foliar urea application in wild type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiol.* 128: 1129–1136, **2002**.

WITTE, CP.; ISIDORE, E.; TILLER, S.A.; DAVIES, H.V.; TAYLOR, M.A. Functional characterization of urease accessory protein G (ureG) from potato. *Plant Mol. Biol.* 45: 169-179, **2001**.

WITTE, CP.; ROSSO, M.G.; ROMEIS, T. Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 1155-1162, **2005**.

ZERNER, B. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, Urease. *Rus. J. Bioorg. Chem.* 19: 116-131, **1991**.

Anexos

Anne Helene Souza Martinelli
Curriculum Vitae

Agosto/2007

Anne Helene Souza Martinelli

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Anne Helene Souza Martinelli
Nascimento 05/10/1981 - PORTO ALEGRE/RS - Brasil
CPF 00368497070

Formação Acadêmica/Titulação

- 2005** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Expressão da Urease Ubíqua de Soja em Escherichia coli.
Orientador: Célia Regina Carlini
- 1999 - 2004** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, Sao Leopoldo, Brasil
Título: "Toxicidade de Urease de Soja [Glycine max (L.) Merrill] a Fitopatógenos"
Orientador: Lidia mariana Fiuza e Célia Regina Carlini
- 2000 - 2002** Ensino Profissional de nível técnico em Curso técnico em Biotecnologia.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

- 2001 - 2003** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial
- 2003 - 2004** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial
- 2004 - Atual** Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Técnico de Laboratório- área Biologia , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

- 02/2001 - 06/2003** Estágio, Centro de Biotecnologia
Estágio:
Fermentação com microrganismos
- 06/2003 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Biociências
Linhas de Pesquisa:
Expressão heteróloga de ureases de soja em Escherichia coli. Efeito fungicida das ureases de soja.

Linhas de pesquisa

1. Expressão heteróloga de ureases de soja em Escherichia coli. Efeito fungicida das ureases de soja.

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Espanhol Compreende Bem , Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Razoavelmente

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. MITIDIARI, S., MARTINELLI, A. H. S., VAINSTEIN, M.
Enzymatic detergent formulation containing amylase from Aspergillus niger: A comparative study with commercial detergent formulations. Bioresource Technology. , v.97, p.1217 - 1224, 2005.
2. MARTINELLI, A. H. S., MITIDIARI, S., VAINSTEIN, M.
Detergentes biológicos biodegradáveis. Avaliação das formulações do mercado. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. , v.26, p.56 - 60, 2002.

Artigos aceitos para publicação

1. BECKER-RITT, A. B., MARTINELLI, A. H. S., MITIDIARI, S., FEDER, V., WASSERMANN, G., SANTI, L., VAINSTEIN, M., OLIVEIRA, T., FIUZA, L. M., PASQUALI, G., CARLINI, C. R.
Antifungal Activity of Plant and Bacterial Ureases. Toxicon. , 2007.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

1. BECKER-RITT, A.B., MARTINELLI, A. H. S., MITIDIARI, S., SOARES, V. F., WASSERMANN, G., PASQUALI, G., CARLINI, C. R.
Antifungal activity of ureases from Glycine max and Canavalia ensiformis seeds and a recombinant Helicobacter pylori urease In: Plant Biology and Botany 2007 Joint Congress, 2007, Chicago.
Plant Biology and Botany 2007 Joint Congress. , 2007.
2. MARTINELLI, A. H. S., BECKER-RITT, A.B., PASQUALI, G., CARLINI, C. R.
Expressão de urease ubíqua de soja em Escherichia coli e avaliação de suas atividades biológicas In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2006, Porto Alegre.
VIII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. , 2006.

3. MARTINELLI, A. H. S., FERREIRA, T.B., BECKER-RITT, A.B., PASQUALI, G., CARLINI, C. R.
Expressão da urease de soja em Escherichia coli e avaliação da sua toxicidade a fungos fitopatogênicos In: VII Reunião Anual do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do centro de Biotecnologia, 2005, Porto Alegre.
VII Reunião Anual do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do centro de Biotecnologia. , 2005.
4. BECKER-RITT, A.B., MARTINELLI, A. H. S., PASQUALI, G., CARLINI, C. R.
Expression of soybean [Glycine max (L) Merrill] ubiquitous urease in tobacco (Nicotiana tobacum) and antifungal activity of soybean ureases In: XXXIV Reunião Anual SBBq, 2005, Águas de Lindóia.
XXXIV Reunião Anual SBBq. , 2005.
5. MARTINELLI, A. H. S., BECKER-RITT, A.B., CARLINI, C. R.
Obtenção e purificação de urease de soja [Glycine max (L) Merrill] e avaliação da sua toxicidade a microrganismos fitopatogênicos. In: Mostra de Iniciação Científica da Unisinos, 2004, São Leopoldo.
Mostra de Iniciação Científica da Unisinos. , 2004.
6. BECKER-RITT, A.B., MARTINELLI, A. H. S., MITIDIERI, S., PASQUALI, G., CARLINI, C. R.
Soybean (Glycine max (L.) Merril) ureases: expression in tobacco (Nicotiana tobacum) In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBq, 2004, Caxambu.
XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq. , 2004.
7. BECKER-RITT, A.B., MARTINELLI, A. H. S., MITIDIERI, S., PASQUALI, G., CARLINI, C. R.
UREASE DE SOJA [Glycine Max (L) Merril]: SUPER EXPRESSÃO EM TABACO (Nicotiana Tobacum) In: V Reunião Anual do Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS., 2003, Porto Alegre.
V Reunião Anual do Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS.. , 2003.
8. MARTINELLI, A. H. S., MITIDIERI, S., VAINSTEIN, M.
Produção de amilase para formulação de detergentes bioativos. In: IV Reunião Anualdo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2002, Porto Alegre.
V Reunião Anualdo Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. , 2002.
9. MARTINELLI, A. H. S., MITIDIERI, S., VAINSTEIN, M.
Produção de amilase para formulação de detergentes biodegradáveis In: Salão de Iniciação Científica, 2002, Porto Alegre.
XIII Salão de Iniciação Científica. , 2002.
10. MARTINELLI, A. H. S., MITIDIERI, S., VAINSTEIN, M.
Produção de amilases para formulação de detergentes biodegradáveis. In: ENZITEC 2002, BRASÍLIA.
5 SEMINARIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. BRASÍLIA: , 2002. v.5.
11. MARTINELLI, A. H. S., MITIDIERI, S., VAINSTEIN, M.
Produção e caracterização de uma amilase para formulação de detergentes biodegradáveis. In: Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2002, Porto Alegre.
XIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS. , 2002.

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXXIV Reunião Anual SBBq**, 2005. (Congresso)
Expression of soybean [Glycine max (L) Merrill] ubiquitous urease in tobacco (Nicotiana tabacum) and antifungal activity of soybean ureases.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Entomologia**, 2004. (Congresso)
Expressão de Ureases de Soja em Tabaco Nicotiana tabacum. Análise de Resistência a Insetos e Fitopatógenos.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **ENZITEC 2002**, 2002. (Congresso). Produção de amilases para formulação de detergentes biodegradáveis

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicado em periódico2
Artigos aceitos para publicação 1
Comunicações em anais de congressos e periódicos (proceedings e suplementos)..11

Eventos

Participações em eventos (congresso).....3