

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

**Clonagem e expressão da urease da bactéria diazotrófica  
*Azospirillum brasilense* FP2 e do peptídeo soyuretox, derivado  
da urease ubíqua de soja (*Glycine max*)**

Karine Kappaun

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

Orientação: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini**

Co-orientação: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Irene Silveira Schrank**

Porto Alegre, Abril de 2014

## **Membros da Banca Examinadora**

**Prof. Dr. Felipe dos Santos Maraschin**

(Departamento de Botânica-UFRGS)

**Prof. Dr. Giancarlo Pasquali**

(Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia-UFRGS)

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Zanettini**

(Departamento de Genética-UFRGS)

**Revisor Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Stanisçuaski**

(Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia-UFRGS)

**Suplente: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Stanisçuaski**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Profa. Célia pela oportunidade e atenção, e por sempre ter uma palavra de otimismo nos momentos difíceis do trabalho;

À minha co-orientadora Profa. Irene por ter aberto as portas de seu laboratório e também a sua aluna Franciele, pela atenção dada durante a clonagem da urease;

Aos colegas do LAPROTOX que de alguma forma contribuíram com esse trabalho e pelos momentos de descontração na hora do café;

À Profa. Fernanda Stanisçuaski pela revisão da dissertação;

Aos meus pais, pelo carinho e apoio;

Ao meu namorado Anderson pelo amor e paciência. Te amo!

A todos, que mesmo não citados, colaboraram de alguma forma com esse trabalho.

Obrigada a todos!!!

## RESUMO

Ureases (ureia amido-hidrolases; EC 3.5.1.5) são enzimas níquel dependentes, amplamente distribuídas em bactérias, fungos e plantas, que catalisam a hidrólise da ureia à amônia e a dióxido de carbono. Em plantas e fungos, as ureases são hexâmeros formados por subunidades idênticas. Em bactérias, as ureases são formadas por duas ou três subunidades distintas, como é o caso em *Helicobacter pylori* e *Azospirillum brasilense*, respectivamente. As bactérias do gênero *Azospirillum* são microrganismos diazotróficos (capazes de fixar nitrogênio atmosférico), encontrados no solo e em associação com raízes de plantas como o arroz, o trigo e o milho. A principal função da urease em plantas parece estar relacionada à reciclagem do nitrogênio, mas diversas atividades biológicas que independem da atividade ureolítica têm sido demonstradas, sugerindo que esta possa estar envolvida na defesa da planta contra insetos e fungos. A fim de estudar esta enzima, a primeira parte do trabalho objetivou obter a urease recombinante de *Azospirillum brasilense* FP2. Para isso, o inserto foi clonado no vetor pET-23a por recombinação homóloga *in vivo*. Seis aminoácidos mostraram-se diferentes, em relação a sequência de proteínas predita do *A. brasilense* sp245, o que parece diferença entre as cepas de *A. brasilense* sp245 e FP2. A expressão da enzima recombinante foi otimizada, seguida de purificação feita por cromatografia de afinidade a níquel. No segundo capítulo desse trabalho é apresentada a clonagem, a expressão do gene e a purificação de um peptídeo derivado da urease ubíqua de soja. Esse peptídeo, denominado soyuretox, é colinear com o jaburetox, uma peptídeo recombinante derivado da urease de *Canavalia ensiformis*. Dados prévios do nosso laboratório demonstram diversas propriedades biológicas do jaburetox, tais como atividade inseticida, capacidade de interagir com bicamadas lipídicas, efeito fungitóxico, dentre outras. Estudos comparativos com o soyuretox mostraram que esse peptídeo apresenta toxicidade para duas leveduras testadas, *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

## ABSTRACT

Urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) are nickel-dependent enzymes widely distributed in bacteria, fungi and plants which catalyze the hydrolysis of urea to ammonia and carbon dioxide. In plants and fungi, ureases are hexamers formed by one type of subunit. In bacteria, ureases are formed by two or three distinct subunits, such as in *Helicobacter pylori* and in *Azospirillum brasilense*, respectively. Bacteria of the genus *Azospirillum* are diazotrophic (capable of fixing atmospheric nitrogen), found in the soil and in association with roots of plants such as rice, wheat and corn. The main function of urease in plants appears to be related to nitrogen recycling, but several biological activities that are independent of ureolytic activity have been demonstrated, suggesting that it may be involved in the defense of plants against insects and fungi. In order to study this enzyme, the first part of the study aimed to obtain the recombinant *Azospirillum brasilense* FP2 urease. For this end, the insert was cloned into the vector pET-23a by *in vivo* homologous recombination. Six amino acids were different in relation to the predicted protein sequence of *A. brasilense* sp245, which seems to difference among strains of *A. brasilense* sp245 and FP2. Expression of the recombinant protein was optimized, following purification by nickel affinity chromatography. Cloning, expression of the gene and purification of a peptide derived from soybean ubiquitous urease is presented in the second chapter of this work. This peptide, called soyuretox, aligns with jaburetox, a recombinant peptide derived from *Canavalia ensiformis* urease. Previous data from our laboratory have shown diverse biological properties for jaburetox, such as insecticidal activity, ability to interact with lipid bilayers, fungitoxic effects, among others. Comparative studies with soyuretox, showed that this peptide presents toxicity against yeast, *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

A: absorvância

ADP: adenosina difosfato

BSA: albumina sérica bovina

CNTX: canatoxina

Da: daltons

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxinucleosídeos trifosfatados

GTP: guanosina trifosfato

HPU: urease de *Helicobacter pylori*

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

jbtx-2Ec: jaburetox-2Ec

JBU: urease de *Canavalia ensiformis*

kDa: quilodalton (s) (1000 daltons)

LB: meio Luria-Bertani

m/v: massa/volume

OD: densidade ótica

pb: par (es) de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase

PVDF: fluoreto de polivinilideno

rpm: rotações por minuto

SBU: urease embrião-específica de soja

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida para eletroforese com dodecil-sulfato de amônio

T<sub>m</sub>: melting temperature

Tween 20: polioxietilenosorbitano

v/v: volume/volume

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema da unidade estrutural das ureases. O número de aminoácidos de cada subunidade está indicado e a porcentagem de identidade correspondente em relação à região equivalente da urease de *C. ensiformis* é mostrado nas subunidades bacterianas. Retirado de OLIVERA-SEVERO *et al.*, (2006). ..... 15
- Figura 2. Modelo hipotético de ativação das ureases. As proteínas acessórias se ligam à apoenzima, seguida de carboxilação de resíduo do sítio ativo para a incorporação de níquel. Após a ativação, o complexo de proteínas acessórias se desliga da urease e se dissocia. Figura retirada de WITTE, (2011). ..... 16
- Figura 3. Representação esquemática das sequências da isoforma de urease JBURE-II, do peptídeo jbtX-2Ec e jbtX (sem o epitopo-V5, equivalente a 26 resíduos). Os números indicam a posição, relativa à sequência de aminoácidos da JBURE-IIB, em que se alinham o N- e o C-terminal dos peptídeos. .... 21
- Figura 4. Esquema dos genes estruturais e acessórios da urease de *A. brasilense* sp245. Os genes estruturais são compostos por ureA, ureB e ureC e os genes acessórios são compostos por ureD, ureE, ureF e ureG. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/392380513?report=graph>. ..... 26
- Figura 5. Amplificação dos genes da *ureABC* da urease do DNA genômico de *A. brasilense* FP2 por PCR usado *primers* sem a região flangeadora ao pET-23a. Gel de agarose 1%, M) marcador molecular 1 kb (Invitrogen); 46 °C, temperatura de anelamento. 1) amplicon *ureABC* (com um total de 2356 pb) e 2), controle negativo (água no lugar do molde). ..... 37
- Figura 6. Amplificação dos genes da urease *ureABC* usando o amplicon da primeira PCR. Gel de agarose 1%, M) marcador molecular 1kb (Invitrogen); 54 °C, temperatura de anelamento; 1) amplicon *ureABC* (2356 pb mais 40 pb referentes à região homóloga ao vetor) e 2), controle negativo (água no lugar do molde). ..... 38
- Figura 7. Análise PCR de colônia em gel de agarose 1% da clonagem por recombinação homóloga no vetor pET-23a. M marcador molecular 1Kb (Invitrogen); 1-9, colônias transformantes usadas como molde e 10, controle negativo (sem molde). ..... 39
- Figura 8. Alinhamentos dos aminoácidos entre as subunidades da urease de *A. brasilense* FP2 e *A. brasilense* sp245. *Legenda:* UREA, B, C, sequência de aminoácidos clonada de *A. brasilense* FP2, e URESP245A, B, C, sequência de *A. brasilense* sp254 disponível no GenBank. Os aminoácidos diferentes entre as sequências estão destacados com uma elipse. .... 41
- Figura 9. Análise da expressão da urease UreABC de *A. brasilense* em diferentes linhagens bacterianas. Análise em gel de poliacrilamida a 15%. A. Linhagens BL21 (DE3) RP (poços 1-4) e BL21 (DE3) Rosetta (poços 5-7). M. Marcador molecular (Thermo Scientific); linhas 1 e 4, antes da indução; 2 e 5, indução de 3 h; 3 e 6, indução *overnight*; 7, controle pET-23a vazio. B. Linhagens (BL21 (DE3) STAR (1-4) e ArticExpress (DE3) (5-7) . M. Marcador molecular (Thermo Scientific); linhas 1 e 4, antes da indução; 2 e 5, indução de 3 h; 3 e 6, indução *overnight*; 7, controle pET-23a vazio. As setas indicam as subunidades A e B sobrepostas (de aproximadamente 11 kDa) e a subunidade C (com aproximadamente 62 kDa) da urease de *A. brasilense*. 42



- Figura 10. Purificação da urease de *A. brasilense* por cromatografia de afinidade a níquel. Análise em gel de poliacrilamida a 15%. M. Marcador molecular; 1, extrato bruto; 2 e 3, não retido, extrato circulado na coluna cromatográfica uma e 2 vezes respectivamente; 4, lavado não retido (20 mM imidazol); 5, lavado não retido 50 mM de imidazol; e 6, eluição da urease de *A. brasilense* com 200 mM de imidazol. .... 44
- Figura 11. Análise por Western blot da urease recombinante de *A. brasilense*, com anticorpo primário anti-cadeia  $\alpha$  (painel A) e anti-cadeia  $\beta$  de *H. pylori* (painel B) M, marcador molecular (thermo scientific) 1, urease de *A. brasilense*; 2, controle negativo BSA; 3. Controle positivo, HPU. .... 44
- Figura 12 Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos oriundas de ureases bacterianas. ABFP2 (*A. brasilense* FP2), ABSP (*A. brasilense* sp245), BP (*B. pasteurii*), KA (*K. aerogenes*), BR (*B. japonicum*), HS (*Herbaspirillum seropedicae*), HP (*H. pylori*), PM (*P. mirabilis*). Os aminoácidos que constituem o sítio catalítico das ureases estão identificados com *highlight* verde..... 49
- Figura 13. Sequência de aminoácidos da urease ubíqua (traduzida de *Glycine max* mRNA for urease (ure gene) Accession AJ276866), com sequência do peptídeo interno soyuretox marcada em vermelho. .... 54
- Figura 14. Alinhamento entre a sequência predita do peptídeo derivado de *G. max*, o soyuretox, e o jbtx, derivado da urease JBURE-II de *C. ensiformis*. .... 54
- Figura 15. Amplificação da região codificadora do soyuretox a partir do molde de urease ubíqua de soja. Gel de agarose 1%, MM marcador molecular 1 kb (Invitrogen); 1, amplicon do soyuretox, (temperatura de anelamento 55 °C) e, 2, controle negativo, sem molde da urease ubíqua. .... 61
- Figura 16. PCR de colônia para a identificação dos clones positivos em gel de agarose 1%. M marcador molecular 1Kb (Invitrogen); 1-8, colônias transformantes usadas como molde para a identificação de clones contendo o inserto do soyuretox e 9, controle negativo, contendo apenas água. .... 62
- Figura 17. Perfil cromatográfico do soyuretox em cromatografia de gel filtração S200. O pico correspondente ao peptídeo está indicado com uma seta. .... 63
- Figura 18. Análise por gel de poliacrilamida a 15% em meio redutor, das frações da purificação do peptídeo soyuretox. M. Marcador molecular; 1, extrato bruto; 2 e 3, extrato circulado 1 e 2 vezes respectivamente na coluna de afinidade a níquel; 4, lavado (tampão com 50 mM de imidazol); 5, eluição da amostra (200 mM de imidazol) e 6, amostra após a gel filtração (seta). Corado com Coomassie..... 63
- Figura 19. Análise por Western blot e gel de poliacrilamida 15% do soyuretox. A. Western blot com anticorpo primário anti-jbtx-2Ec. M. marcador molecular (Thermo Scientific); 1, soyuretox após gel filtração; 2, controle negativo BSA. B. Gel de poliacrilamida M. marcador molecular (Thermo Scientific), 1, soyuretox após a gel filtração 2, controle negativo BSA ..... 64
- Figura 20. Efeito do soyuretox no crescimento de leveduras nas doses 9 e 18  $\mu$ M. (A) *C. tropicalis*, e (B) *S. cerevisiae*. Controle negativo, tampão, e controle positivo, 0,1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As barras representam médias de triplicatas. \* indica p < 0,05 em relação ao controle. .... 65
- Figura 21. Alinhamento das sequências de aminoácidos do soyuretox e Jbtx com outras ureases. SOYU (soyuretox), JBTX (jaburetox), CEJIIB (*C. ensiformis*, JBUREII-B),

G.ME (*G. max*, embrião específica), G.MU (*G. max*, ubíqua), A.T (*A. thaliana*), S.T (*Solanum tuberosum*), O.S (*Oriza sativa*), C.C (*Cajus cajan*), H.PB (*H. pylori* subunidade B), BPC (*B. pasteurii*, subunidade C), K.AC (*K. aerogenes*, subunidade C). O retângulo destaca a região do jbtx que é ausente em ureases bacterianas. .... 69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> desenhados para a amplificação da urease de <i>A. brasilense FP2</i> . Em negrito, regiões homólogas ao vetor, e sublinhados, os sítios de restrição NdeI e XhoI; o tamanho de cada <i>primer</i> está indicado.....	30
Tabela 2. <i>Primers</i> internos com sobreposição à sequência nucleotídica dos genes estruturais da uréase baseados na sequência genômica de <i>A. brasilense FP2</i> . .....	33
Tabela 3 <i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene codificador do peptídeo interno derivado da urease ubíqua de soja. ....	55

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	UREASES	14
1.2	ATIVACÃO DAS UREASES	15
1.3	UREASES EM PLANTAS	16
1.3.1	<b>Ureases de soja</b> .....	<b>16</b>
1.3.2	<b>Ureases da <i>Canavalia ensiformis</i></b> .....	<b>17</b>
1.4	PEPTÍDEO DERIVADO DA UREASE DE <i>C. ENSIFORMIS</i>	19
1.5	UREASES MICROBIANAS	21
1.6	GÊNERO <i>AZOSPIRILLUM</i> E AS PGPB ( <i>PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA</i> )	24
1.7	UREASE DE <i>A. BRASILENSE</i>	25
	<b>FORMATO E ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO I</b>	<b>28</b>
	<b>Clonagem e expressão heteróloga da apourease da bactéria diazotrófica <i>Azospirillum brasilense</i> FP2.</b> .....	<b>28</b>
2.1	JUSTIFICATIVA	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.3.1	<b>Extração do DNA genômico</b> .....	<b>29</b>
2.3.2	<b>Desenho dos <i>primers</i></b> .....	<b>30</b>
2.3.3	<b>Amplificação do fragmento</b> .....	<b>30</b>
2.3.4	<b>Recombinação homóloga <i>in vivo</i></b> .....	<b>31</b>
2.3.5	<b>Identificação dos recombinantes</b> .....	<b>32</b>
2.3.6	<b>Expressão da proteína recombinante</b> .....	<b>33</b>
2.3.6.1	Transformação por choque térmico	33
2.3.6.2	Otimização das condições de expressão	34
2.3.6.3	Expressão da urease	34
2.3.7	<b>Purificação da proteína</b> .....	<b>35</b>
2.3.8	<b>Análise por gel de poliacrilamida</b> .....	<b>35</b>
2.3.9	<b>Western blot</b> .....	<b>35</b>
2.4	RESULTADOS	36
2.4.1	<b>Amplificação da urease <i>ureABC</i> de <i>A. brasilense</i></b> .....	<b>36</b>
2.4.2	<b>Recombinação homóloga <i>in vivo</i></b> .....	<b>38</b>

<b>2.4.3</b>	<b>Sequenciamento.....</b>	<b>39</b>
<b>2.4.4</b>	<b>Expressão da urease.....</b>	<b>41</b>
<b>2.4.5</b>	<b>Purificação da urease de <i>A. brasilense</i>.....</b>	<b>43</b>
2.5	DISCUSSÃO	45
2.6	PRÓXIMOS PASSOS	51
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO II</b>	<b>52</b>
	<b>Soyuretox: peptídeo recombinante derivado da urease ubíqua de soja</b>	
	<b>(<i>Glycine max</i>).....</b>	<b>52</b>
3.1	JUSTIFICATIVA	53
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	53
<b>3.3.1</b>	<b>Identificação da sequência de interesse .....</b>	<b>53</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Desenho dos <i>primers</i>.....</b>	<b>55</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Amplificação do fragmento .....</b>	<b>55</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Construção do vetor de expressão .....</b>	<b>56</b>
3.3.4.1	Clivagem do inserto e vetor	56
3.3.4.2	Ligação do inserto e transformação em células de <i>E. coli</i>	56
<b>3.3.5</b>	<b>Seleção das colônias transformadas .....</b>	<b>57</b>
<b>3.3.6</b>	<b>Identificação das colônias recombinantes .....</b>	<b>57</b>
<b>3.3.7</b>	<b>Expressão do gene codificador de soyuretox .....</b>	<b>57</b>
<b>3.3.8</b>	<b>Purificação do peptídeo recombinante .....</b>	<b>58</b>
3.3.8.1	Cromatografia de afinidade	58
3.3.8.2	Cromatografia de Gel Filtração	58
<b>3.3.9</b>	<b>Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida .....</b>	<b>59</b>
<b>3.3.10</b>	<b>Western blot.....</b>	<b>59</b>
<b>3.3.11</b>	<b>Quantificação do peptídeo e concentração molar .....</b>	<b>59</b>
<b>3.3.12</b>	<b>Ensaio com leveduras.....</b>	<b>59</b>
3.3.12.1	Análise estatística	60
3.4	RESULTADOS	60
<b>3.4.1</b>	<b>Amplificação do Soyuretox .....</b>	<b>60</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Construção do vetor de expressão .....</b>	<b>61</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Expressão heteróloga do soyuretox em <i>E. coli</i>.....</b>	<b>62</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Purificação do soyuretox .....</b>	<b>62</b>
<b>3.4.5</b>	<b>Western blot.....</b>	<b>64</b>

<b>3.4.6</b>	<b>Ensaio com leveduras.....</b>	<b>65</b>
3.5	DISCUSSÃO	66
3.6	PRÓXIMOS PASSOS	71
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>72</b>
<b>4</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>79</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 UREASES

As ureases (ureia amidohidrolase, EC 3.5.1.5) são enzimas níquel dependentes que catalisam a hidrólise de ureia em amônia e dióxido de carbono. A atividade dessa enzima está relacionada à presença de dois íons de  $\text{Ni}^{2+}$  no sítio ativo, que facilitam o ataque nucleofílico de uma molécula de água, o que libera uma molécula de amônia e uma de carbamato; essa é convertida espontaneamente em  $\text{CO}_2$  e uma segunda molécula de  $\text{NH}_3$  (DIXON *et al.*, 1975).

Ureases são sintetizadas por diversos organismos incluindo bactérias, plantas e fungos, mas não por animais (MOBLEY e HAUSINGER, 1989). Em bactérias, as ureases são formadas por duas (AB) ou três subunidades (ABC) diferentes, como é o caso da urease de *Helicobacter pylori* e de *Azospirillum brasilense*, respectivamente. Já as ureases vegetais e fúngicas, como as de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), de soja (*Glycine max*) e do fungo *Cryptococcus gattii*, são compostas por um único tipo de subunidade, representando uma fusão das cadeias menores de ureases bacterianas. Em sua forma nativa, as ureases se organizam como trímeros do tipo  $\text{A}_3$  ou  $(\text{ABC})_3$  ou hexâmeros correspondentes (Figura 1) (MOBLEY e HAUSINGER, 1989; MOBLEY *et al.*, 1995).

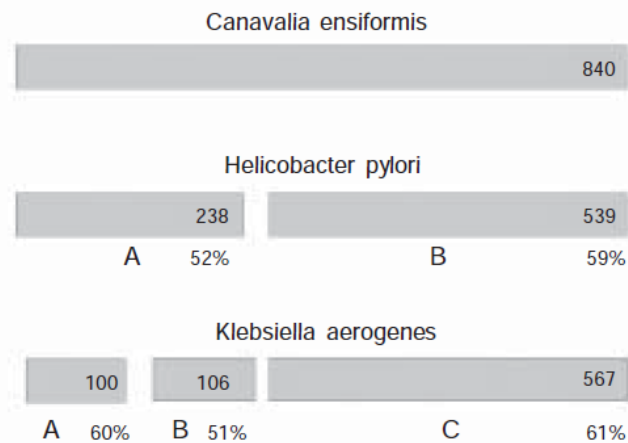


Figura 1. Esquema da unidade estrutural das ureases. O número de aminoácidos de cada subunidade está indicado e a porcentagem de identidade correspondente em relação à região equivalente da urease de *C. ensiformis* é mostrado nas subunidades bacterianas. Retirado de OLIVERA-SEVERO *et al.*, (2006).

## 1.2 ATIVAÇÃO DAS UREASES

A atividade catalítica das ureases está ligada à presença de dois átomos de  $\text{Ni}^{2+}$  no sítio ativo (DIXON *et al.*, 1975). A adição dos átomos de  $\text{Ni}^{2+}$  no sítio ativo das ureases é um processo complexo, dependente de proteínas acessórias.

Um modelo hipotético da ativação (Figura 2) sugere que a ativação das ureases envolve a ligação das proteínas acessórias (UreD, UreF e UreG) à apourease, e a carboxilação de um resíduo de lisina do sítio ativo da apoenzima, precedendo a incorporação específica de dois átomos de  $\text{Ni}^{2+}$  por sítio ativo. A ativação é dependente de GTP, em uma hidrólise mediada pela UreG (WITTE, 2011). A UreE é uma proteína ligadora de  $\text{Ni}^{2+}$ , que facilita a entrega dos átomos ao complexo (SORIANO *et al.*, 2000). Após a ativação, as proteínas acessórias se dissociam do complexo.



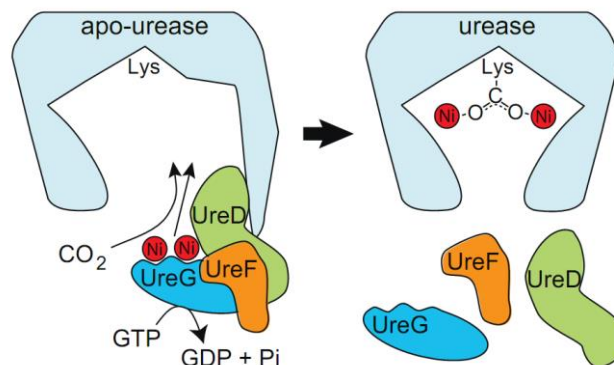


Figura 2. Modelo hipotético de ativação das ureases. As proteínas acessórias se ligam à apoenzima, seguida de carboxilação de resíduo do sítio ativo para a incorporação de níquel. Após a ativação, o complexo de proteínas acessórias se desliga da urease e se dissocia. Figura retirada de WITTE, (2011).

Na soja, as proteínas acessórias são codificadas por dois genes (*Eu2* e *Eu3*). Mutações nesses genes levam à inativação da urease embrião-específica (SBU), e também da urease ubíqua, demonstrando a importância dessas proteínas na atividade ureolítica dessas enzimas (POLACCO *et al.*, 1999).

### 1.3 UREASES EM PLANTAS

#### 1.3.1 Ureases de soja

A soja produz duas isoformas de urease: a SBU e a urease ubíqua, que compartilham 87% de identidade (GOLDRAIJ *et al.*, 2003). A SBU é codificada pelo gene *Eu1* (MEYER-BOTHLING e POLACCO, 1987), sendo expresso apenas no embrião em desenvolvimento e a proteína é acumulada nas sementes maduras (POLACCO e WINKLER, 1984). A urease ubíqua, codificada pelo gene *Eu4*, está

presente em todos os tecidos da planta em concentrações baixas (TORISKY *et al.*, 1994). A SBU é cerca de 1000 vezes mais abundante na semente do que a urease ubíqua (TORISKY e POLACCO, 1990).

Mutantes de soja com lesões no gene da urease ubíqua apresentam anormalidades características do acúmulo de ureia como necroses nas extremidades das folhas e raízes, acúmulo de ureia nas folhas e sementes e retardo na germinação, o que sugere que a urease ubíqua está relacionada à reciclagem de derivados de ureia. Em contraste, em mutantes de soja com ausência da SBU, não houve mudança no fenótipo e nem aumento dos níveis de ureia, sugerindo que essa proteína possa estar envolvida em outro tipo de função, provavelmente relacionada à defesa em plantas (HOLLAND e POLACCO, 1992).

### 1.3.2 Ureases da *Canavalia ensiformis*

A semente de *C. ensiformis*, uma leguminosa conhecida popularmente como feijão-de-porco e que possui grande resistência a insetos, possui três isoformas de urease: a urease clássica (JBU ou JBURE-I), a canatoxina (CNTX), e a JBURE-II. A JBU é constituída por uma cadeia peptídica de 840 aminoácidos, com massa molecular de 90,7 kDa, sendo encontrada na forma nativa como um hexâmero de 540 kDa (ZERNER, 1991) e possui dois átomos de níquel no sítio ativo, cada um coordenado por dois resíduos de histidina (DIXON *et al.*, 1975; ZAMBELLI *et al.*, 2011). Embora tenha sido a primeira enzima a ser cristalizada (SUMNER, 1926), sua estrutura 3D foi resolvida apenas em 2009 (BALASUBRAMANIAN e PONNURAJ, 2009).

Em 1981, CARLINI e GUIMARÃES isolaram de sementes de *C. ensiformis* a proteína neurotóxica CNTX, que foi mais tarde identificada como sendo uma

isoforma de urease (FOLLMER *et al.*, 2001). A CNTX é uma urease dependente de níquel e zinco, com massa molecular de 184 kDa quando analisada por gel-filtração em pH 7,5 e de 95 kDa, quando analisada em meio redutor por SDS-PAGE, sugerindo tratar-se de um dímero (FOLLMER *et al.*, 2001, FOLLMER *et al.*, 2002).

A CNTX possui de 30-40% da atividade ureolítica da JBU e comparações das sequências da CNTX e JBU demonstram aproximadamente 85% de similaridade entre elas (FOLLMER *et al.*, 2001; MULINARI *et al.*, 2011).

Quando administrada intraperitonealmente em ratos e camundongos, a CNTX induz bradicardia, hipertensão e hipotermia, seguida de convulsões e morte ( $DL_{50} = 0,5-2,0$  mg/kg) (CARLINI *et al.*, 1984). O mesmo não ocorre ao se administrar a proteína por via oral provavelmente devido à instabilidade da proteína no pH ácido do estômago (CARLINI e GUIMARÃES, 1991).

Tanto CNTX como JBU apresentam outras atividades biológicas como atividade secretagoga *in vitro* sobre vários sistemas isolados (CARLINI *et al.*, 1985; BARJA-FIDALGO *et al.*, 1991; FOLLMER *et al.*, 2001). Posteriormente, a atividade secretagoga foi analisada em estudos comparando duas ureases vegetais, a JBU e SBU, e a urease de *Bacillus pasteurii*, verificando-se que todas possuem o efeito secretagogo observado com a CNTX, apesar de apresentarem diferenças em relação às doses efetivas (FOLLMER *et al.*, 2004). A urease de *B. pasteurii*, mesmo apresentando maior atividade na hidrólise de ureia do que as enzimas vegetais, é cerca de 20x menos ativa sobre plaquetas, evidenciando a dissociação entre essas propriedades biológicas (OLIVERA-SEVERO *et al.*, 2006).

As ureases vegetais (CNTX, JBU e SBU) apresentam atividade inseticida contra *Callosobruchus maculatus* e *Rhodnius prolixus* (CARLINI *et al.*, 1997;

FERREIRA-DASILVA et al., 2000) *Dysdercus peruvianus* (STANISÇUASKI et al., 2005), *Oncopeltus fasciatus* (DEFFERRARI et al., 2011), e atividade contra fungos filamentosos (OLIVEIRA et al., 1999; BECKER-RITT et al., 2007) e leveduras (POSTAL et al., 2012).

Quando CNTX, JBU ou SBU são tratadas com um inibidor irreversível de urease, o *p*-hidroximercuribenzoato, há a perda da atividade ureolítica mas não de outras atividades biológicas descritas, sugerindo que existem outros domínios proteicos responsáveis por essas atividades (FOLLMER et al. 2004; BECKER-RITT et al., 2007).

Um terceiro gene codificando uma isoforma de urease da *C. ensiformis*, designada JBURE-II, foi clonado, sendo a sua expressão induzida por ácido abscísico (PIRES-ALVES et al., 2003). Um estudo proteômico permitiu a identificação de uma proteína em sementes de *C. ensiformis* em diferentes estádios de desenvolvimento, comprovando que o gene *jbure-II* é funcional na planta (DEMARTINI et al., 2011). A urease recombinante JBURE-II foi produzida em *Escherichia coli*, na ausência das proteínas acessórias que promovem a incorporação de Ni<sup>2+</sup> no sítio ativo, obtendo-se a apourease (MULINARI et al., 2011). Comprovando mais uma vez a existência de propriedades biológicas independentes da atividade enzimática, a apourease JBURE-II apresentou atividade antifúngica e efeitos entomotóxicos equivalente aos da JBU (MULINARI et al., 2011).

#### 1.4 PEPTÍDEO DERIVADO DA UREASE DE *C. ENSIFORMIS*

Estudos do mecanismo de ação permitiram demonstrar que a suscetibilidade dos insetos à CNTX é dependente da sua hidrólise e da formação de peptídeos

entomotóxicos, liberados por enzimas digestivas tipo-catepsina desses insetos (CARLINI e GUIMARÃES, 1991; FERREIRA-DASILVA *et al.*, 2000; PIOVESAN *et al.*, 2008; REAL-GUERRA *et al.*, 2013).

Por meio da hidrólise *in vitro* da CNTX por enzimas digestivas de *C. maculatus*, foi isolado um peptídeo com propriedades inseticidas, denominado Pepcanatox (FERREIRA-DASILVA *et al.*, 2000). Baseado na sequência N-terminal do Pepcanatox e utilizando como molde na PCR a urease JBURE-II (PIRES-ALVES *et al.*, 2003), um peptídeo recombinante análogo foi produzido em *E. coli*, denominado jaburetox-2Ec (jbtx-2Ec) (MULINARI *et al.*, 2007). O jbtx-2Ec mostrou ter potente atividade inseticida contra o lepidóptero *Spodoptera frugiperda* e contra o hemíptero *Dysdercus peruvianus*, apresentando neste uma toxicidade maior do que a observada para a CNTX na mesma dose. Ao contrário da CNTX, que causa convulsão e morte em poucas horas quando injetado intraperitonealmente em ratos e camundongos, o jbtx-2Ec não produziu efeito tóxico nesses animais, mesmo em doses 5 vezes maiores. Quando administrado por via oral nas mesmas doses, o jbtx-2Ec não se mostrou tóxico assim como já observado para a CNTX (MULINARI *et al.*, 2007). Posteriormente, a molécula do jbtx-2Ec foi otimizada para conter somente a sequência peptídica derivada da urease JBURE-II (Figura 3), eliminando-se sequências exógenas introduzidas pelo sistema de expressão, e resultando no peptídeo recombinante jaburetox (jbtx) (POSTAL *et al.*, 2012). Ambos os peptídeos, jbtx-2Ec e jbtx, mostraram as mesmas propriedades entomotóxicas (POSTAL *et al.*, 2012; MARTINELLI *et al.*, 2014).

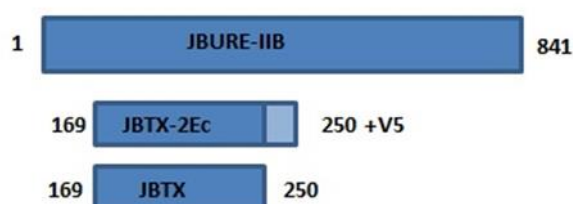


Figura 3. Representação esquemática das sequências da isoforma de urease JBURE-II, do peptídeo jbtX-2Ec e jbtX (sem o epitopo-V5, equivalente a 26 resíduos). Os números indicam a posição, relativa à sequência de aminoácidos da JBURE-IIB, em que se alinham o N- e o C-terminal dos peptídeos.

Além da atividade inseticida, o jbtX apresenta efeito antidiurético em túbulos de Malpighi isolados de *R. prolixus* (STANISÇUASKI *et al.*; 2009; MARTINELLI *et al.*, 2014); afeta a permeabilidade de lipossomos formando poros (BARROS *et al.*, 2009; MARTINELLI *et al.*, 2014); tem efeitos neurotóxicos em preparações neuromusculares de insetos (MARTINELLI *et al.*, 2014) e induz a formação de canais iônicos cátion-seletivos em membranas lipídicas planares (PIOVESAN *et al.*, 2014). A permeabilização de membranas de células de leveduras também foi observada, acompanhando o efeito antifúngico promovido pelo peptídeo (POSTAL *et al.*, 2012).

## 1.5 UREASES MICROBIANAS

As ureases microbianas são importantes na transformação de certos compostos nitrogenados no meio ambiente, no metabolismo de ruminantes e na patogênese de doenças em humanos e animais. A atividade ureásica está amplamente distribuída em microrganismos do solo e em ambientes aquáticos onde exerce papel importante no metabolismo do nitrogênio, associado a processos

degradativos, envolvendo *turnover* de proteínas e nucleotídeos (MOBLEY e HAUSINGER, 1989; KRAJEWSKA, 2009). Ureases bacterianas também estão envolvidas em muitas condições clínicas, sendo consideradas fatores de virulência. No caso do *Proteus mirabilis*, a hidrólise da ureia presente na urina alcaliniza o pH do meio, favorecendo a colonização do trato urinário (JONES *et al.*, 1990); em *Helicobacter pylori*, a atividade enzimática da urease possibilita com que a bactéria sobreviva no pH ácido do estômago, contribuindo na patogênese da úlcera péptica e gástrica (KAVERMANN *et al.*, 2003; POSSELT *et al.*, 2013), além de apresentar propriedades proinflamatórias e de ativação plaquetária, de maneira independente da atividade ureolítica (WASSERMANN *et al.*, 2010; UBERTI *et al.*, 2013). A urease também está relacionada à patogênese de fungos como leveduras do complexo *Cryptococcus* causadoras da criptococose, participando da interação patógeno-hospedeiro já que mutantes nulos para a urease apresentaram virulência diminuída em camundongos (COX *et al.*, 2000; FEDER, 2012).

Nosso grupo mostrou que a urease da bactéria de solo *B. pasteurii* é capaz de induzir a ativação de plaquetas sanguíneas. Ativadas pela urease, estas fazem excitose, liberando ADP de seus grânulos densos, e este ADP reforça a resposta de agregação, ativando outras plaquetas (OLIVERA-SEVERO *et al.*, 2006).

A habilidade de secretar uma vasta gama de compostos é uma característica metabólica marcante das raízes de plantas, sendo que pelo menos 20% do carbono fixado na fotossíntese é transferido para a rizosfera nos exudatos radiculares (WALKER *et al.*, 2003). Assim, (OLIVERA-SEVERO *et al.*, 2006) sugeriram que a urease de *B. pasteurii* extracelular, presente na rizosfera, poderia ativar células de raízes na sua proximidade, induzindo ou potencializando a secreção de mucilagem e

outros compostos orgânicos pelas raízes e, também, afetando a disponibilidade mineral pelo aumento do pH do solo (OLIVERA-SEVERO *et al.*, 2006). Dessa forma, cresceu o interesse do nosso laboratório em entender o papel de ureases na comunicação entre plantas e bactérias.

O suprimento de nitrogênio para a planta por meio da fixação biológica de nitrogênio é um fenômeno bastante estudado. Este processo é realizado por organismos procariotos diazotróficos que possuem o complexo enzimático da nitrogenase, que reduz o  $N_2$  atmosférico tornando-o assimilável na forma de  $NH_3$  (LAM *et al.*, 1996; FRANCHE *et al.*, 2009). Em um estudo recente do nosso laboratório, investigou-se o papel das ureases na interação de *Bradyrhizobium japonicum* e plantas de soja. Como resultado de uma bem sucedida simbiose, a bactéria do solo *B. japonicum* forma nódulos fixadores de nitrogênio nas raízes de plantas de soja. Esse microrganismo, bem como a planta de soja, produzem ureases. O papel destas enzimas na simbiose entre *B. japonicum* e a planta de soja, e na fixação biológica de nitrogênio foi investigado utilizando-se bactérias e plantas mutantes para genes de urease, que não produziam a proteína, ou expressavam a proteína inativa como enzima. Os resultados mostraram que a urease da soja é quimiotática para *B. japonicum*, e que o desenvolvimento do nódulo e a fixação biológica de nitrogênio requerem a urease da soja, de forma independente de sua atividade ureolítica. A propriedade enzimática de urease não é relevante nesse fenômeno, uma vez que, em plantas selvagens em que toda atividade ureolítica foi suprimida pelo inibidor fenilfosforodiamidato, não se observou as alterações típicas da ausência da proteína urease nas plantas mutantes. A urease de *B. japonicum* aparentemente não participa desses processos (MEDEIROS-SILVA *et al.*, 2014).



## 1.6 GÊNERO *AZOSPIRILLUM* E AS PGPB (*PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA*)

O gênero *Azospirillum*, subdivisão  $\alpha$  das proteobactérias (YOUNG, 1992) é composto por bactérias diazotróficas, ou seja, capazes de fixar nitrogênio atmosférico. São bactérias gram-negativas, aeróbicas, curvas, móveis e endofíticas facultativas. Apresentam vida livre ou associadas a raízes de plantas como milho, trigo e arroz, em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (GUNARTO *et al.*, 1999; CRUZ *et al.*, 2001), podendo algumas espécies colonizar não apenas a rizosfera, mas o interior das raízes (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

A rizobactéria *A. brasilense* vive em associação com raízes de plantas, exercendo efeito benéfico no crescimento da planta e no rendimento de culturas de interesse agrônômico (OKON e LABANDERA-GONZALEZ, 1994; OKON e VANDERLEYDEN, 1997).

As bactérias promotoras do crescimento em plantas (PGPB) são benéficas para as plantas por meio do aumento da disponibilidade de nutrientes, da produção de fito-hormônios ou pela redução dos efeitos negativos de patógenos (VESSEY, 2003; AHMAD e KIBRET, 2014). Essas bactérias se associam às plantas em diferentes graus de especificidade, podendo ser classificadas como diazotróficas de vida livre, que fixam  $N_2$  para seu próprio uso; diazotróficas associativas, que contribuem para o crescimento da planta, sem o estabelecimento de estruturas diferenciadas; e diazotróficas simbióticas, que apresentam relação estreita com o hospedeiro e, em muitos casos, são formadores de nódulos (HUNGRIA *et al.*, 2007).

As PGPB têm sido amplamente utilizadas na agricultura, e são consideradas uma forma alternativa e sustentável de aumentar a produção de alimentos, sem o uso de fertilizantes, que podem poluir a água e o solo (FREITAS *et al.*, 2007; MARKS *et al.*, 2013). Em muitos casos, a inoculação dessas bactérias reduz a utilização de fertilizantes, em especial os nitrogenados, de 20-50% (BASHAN *et al.*, 2004).

Entre os mecanismos pelos quais as PGPB promovem o crescimento vegetal estão várias substâncias produzidas pelas bactérias que atuam inibindo os patógenos e herbívoros nas plantas (LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009). Esse mecanismo indireto poderia estar relacionado com a urease produzida pelas bactérias diazotróficas, uma vez que essas proteínas apresentam diversas atividades biológicas relacionadas à defesa de plantas como inibição de fungos fitopatogênicos e letalidade para insetos praga, como mencionado anteriormente nessa dissertação.

### 1.7 UREASE DE *A. BRASILENSE*

O operon da urease de *A. brasilense* é composto por 3 genes estruturais (*ureA*, *ureB* e *ureC*) que codificam as subunidades  $\gamma$ ,  $\beta$  e  $\alpha$ , compostos por 100, 101 e 569 aminoácidos, respectivamente (Figura 4), e mais os genes *ureD*, *ureE*, *ureF* e *ureG*, que codificam proteínas acessórias necessárias para a incorporação do  $\text{Ni}^{2+}$  na proteína, para torná-la enzimaticamente ativa.

Os genes estruturais codificam 2 subunidades de aproximadamente 11 kDa, UreA e UreB, e uma subunidade de aproximadamente 62 kDa, designada UreC (<http://web.expasy.org/protparam/>).

## Azospirillum brasilense Sp245, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC\_016617.1

[GenBank](#) [FASTA](#)



Figura 4. Esquema dos genes estruturais e acessórios da urease de *A. brasilense* sp245. Os genes estruturais são compostos por ureA, ureB e ureC e os genes acessórios são compostos por ureD, ureE, ureF e ureG. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/392380513?report=graph>.

## FORMATO E ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação é composta por dois capítulos com dados experimentais, além da introdução geral já apresentada. Cada capítulo contém justificativa, objetivos específicos, materiais e métodos, resultados e discussão, e próximos passos do trabalho.

### CAPÍTULO I

Clonagem e expressão heteróloga da apourease da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* FP2.

### CAPÍTULO II

Soyuretox: peptídeo recombinante derivado da urease ubíqua de soja (*Glycine max*).

## 2 CAPÍTULO I

Clonagem e expressão heteróloga da apourease da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* FP2.

## 2.1 JUSTIFICATIVA

As ureases são proteínas multifuncionais que apresentam potencial biotecnológico como agentes antifúngicos e/ou inseticidas. A clonagem do gene e a produção da urease de *A. brasilense* recombinante são as primeiras etapas para possibilitar o estudo comparativo desta urease.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolamento dos genes estruturais da urease de *A. brasilense* FP2;
- b) Clonagem, por recombinação homóloga *in vivo*, dos genes *ureABC* que codificam as proteínas estruturais da urease UreABC de *A. brasilense* FP2 em vetor pET-23a;
- c) Expressão da apourease recombinante em *E.coli*;
- d) Purificação da proteína recombinante.

## 2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.3.1 Extração do DNA genômico

A bactéria *A. brasilense* FP2 foi gentilmente cedida ao nosso grupo pelo Dr. Fábio Oliveira Pedrosa, do Núcleo de Fixação de Nitrogênio da UFPR; essa cepa apresenta resistência ao antibiótico estreptomicina (Sm 80 µg/mL) e ácido nalidíxico (NAL 5 µg/mL).

A partir de cultura *overnight* em meio LB, a extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega), seguindo instruções do fabricante.

### 2.3.2 Desenho dos *primers*

Os *primers* foram desenhados utilizando-se o programa Vector NTI Advance 10.0 baseados no genoma de *A. brasilense* *sp245* depositado no GenBank (número de acesso, NC\_016617.1, em anexo) já que o genoma de *A. brasilense* *FP2* não está disponível. Um par de *primers* (*ureFrec* e *ureRrec*, tabela 1) continha, além dos nucleotídeos específicos para a amplificação do gene da urease, 20 nucleotídeos adicionados com homologia ao vetor pET-23a, para possibilitar a posterior recombinação homóloga *in vivo*; a cauda de seis histidinas foi introduzida na região C-terminal da subunidade maior da urease, *UreC*.

Tabela 1. *Primers* desenhados para a amplificação da urease de *A. brasilense* *FP2*. Em negrito, regiões homólogas ao vetor, e sublinhados, os sítios de restrição *NdeI* e *XhoI*; o tamanho de cada *primer* está indicado.

<i>Primer</i>	Sequência	Tamanho (pb)
<i>UreFrec</i>	<b>AAC</b> <u>TTTAAGAAGGAGATAT</u> <u>CATATG</u> <b>AACCTGACACCG</b>	38
<i>UreRrec</i>	<b>CAGTGGTGGTGGTGGTGGT</b> <u>GCTCGAGGAACAGGAAG</u>	36
<i>UreF</i>	<u>CATATG</u> <b>AACCTGACACCG</b>	18
<i>UreR</i>	<u>GCTCGAGGAACAGGAAG</u>	16

### 2.3.3 Amplificação do fragmento

A amplificação de um único fragmento correspondente aos genes estruturais (*ureA*, *ureB* e *ureC*) foi feita por PCR em duas etapas: na primeira PCR, o DNA genômico de *A. brasilense* *FP2* foi usado como molde, em volume final de reação de 50 µL, contendo aproximadamente 100 ng de molde, 100 ng de cada *primer*, 200 µM de dNTPs, 0,02 U/mL DNA Polimerase Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific), DMSO 3% e tampão da enzima (5x Phusion GC buffer), 1x na concentração final, específico para genomas ricos em GC. A amplificação foi realizada em termociclador

nas seguintes condições de reação: desnaturação inicial a 98 °C por 30 s, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 s, anelamento por 30 s a 51 °C e extensão a 72 °C por 90 s, e extensão final por 7 min.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% adicionado de GelRed Nucleic Acid Stain (BIOTIUM), seguida de remoção e purificação da banda do gel, utilizando-se o kit de extração de gel (GeneJET Gel Extraction Kit-Thermo Scientific), seguindo a recomendação do fabricante. A banda purificada dessa primeira amplificação foi usada como molde em uma segunda PCR, usando-se os *primers* adicionados de regiões flanqueadoras específicos para a posterior recombinação, como referido anteriormente. As condições e a enzima utilizadas nessa segunda PCR são as mesmas da primeira, porém o número de ciclos foi diminuído para 30 e a temperatura de anelamento elevada para 54 °C. Essa segunda amplificação foi resolvida por eletroforese em gel de agarose a 1%, e a banda de interesse foi purificada com o mesmo kit da primeira PCR.

#### 2.3.4 Recombinação homóloga *in vivo*

A clonagem foi feita pelo método de recombinação homóloga *in vivo* (BUBECK *et al.*, 1993). O vetor pET-23a (Novagen) foi clivado com as endonucleases NdeI e XhoI (ThermoScientific) seguindo o protocolo do fabricante (esse vetor adiciona cauda de histidina, na região C-terminal da proteína, visando purificação por cromatografia de afinidade, e tem marcas de seleção para o antibiótico ampicilina (mapa do plasmídeo Anexo 4.4).



O vetor clivado foi purificado com o Kit de purificação de produto de PCR em coluna (Ludwig). Para a clonagem, foi utilizada a linhagem *E. coli* KC8. A transformação das células bacterianas foi feita com 50 ng de produto de PCR e 50 ng de vetor linearizado em 25 µL de tampão KCM 2x (0,5 M de KCl, 150 mM CaCl<sub>2</sub> e 250 mM MgCl<sub>2</sub>), incubando-se as células competentes por 30 min em banho de gelo. Transcorrido o tempo, as células foram colocadas por 10 min à temperatura ambiente, e depois incubadas em meio LB por 2 h à 37 °C. As células bacterianas foram plaqueadas em meio LB com os antibióticos ampicilina 100 µg/mL e canamicina 10 µg/mL, e incubadas em estufa *overnight* à 37 °C.

#### 2.3.5 Identificação dos recombinantes

Colônias bacterianas foram escolhidas aleatoriamente para serem usadas como molde da PCR de colônia, utilizando-se a enzima Go Taq (Promega) em volume final de reação de 25 µL, contendo 100 ng de cada primer, 0,2 mM de dNTPs 1,25 U da enzima Go Taq DNA Polimerase, DMSO 3% e tampão da enzima 1x, na concentração final. A amplificação foi realizada em termociclador nas seguintes condições de reação: desnaturação inicial a 98 °C por 30 s, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 98 °C por 1 min, anelamento por 1 min à 46 °C, extensão à 72 °C por 4 min e extensão final por 5 min.

A extração dos plasmídeos foi feita através do Kit de extração de DNA plasmidial (Ludwig). Para o sequenciamento dos clones, foram utilizados primers internos e com sobreposição na sequência da urease (Tabela 2), em sequenciador automático ABI Prism 3100 (ACTGene Ltd, Centro de Biotecnologia, UFRGS). As sequências nucleotídicas foram convertidas em sequências de aminoácidos através

do ExPaSy (<http://web.expasy.org/translate/>). A comparação entre as sequências de aminoácidos predita disponível da urease de *A. brasilense* sp245 e a sequência clonada de *A. brasilense* FP2 foi feita através de alinhamento no software BioEdict Sequence Alignment Editor.

Tabela 2. *Primers* internos com sobreposição à sequência nucleotídica dos genes estruturais da uréase baseados na sequência genômica de *A. brasilense* FP2.

Primer	Sequência	Tamanho (pb)
UreA F	CCCATGAACCTGACACCGC	19
UreAB R	GTTGAAGCCGATGACCACGC	20
UreB F	GACAGCGGTGCGTTTCGAG	19
UreBC R	GCGGCGATGGTGTCTCC	18
UreC F	GCTGTTGGAGCAGATCGCCG	20
UreC R	CACTCAGAACAGGAAGTACCGCTG	24

### 2.3.6 Expressão da proteína recombinante

#### 2.3.6.1 Transformação por choque térmico

Células *E. coli* BL21 (DE3) STAR, BL21 (DE3) RP códon plus, BL21 (DE3) Rosetta e ArticExpress (DE3) foram tornadas competentes (SAMBROOK *et al.*, 1986). Um clone positivo para o inserto, confirmado por sequenciamento, foi selecionado para transformação por choque térmico. Colocou-se em contato as células competentes com 100 ng do plasmídeo em gelo. A seguir, o tubo foi colocado em banho a 42 °C por 2 min, e então adicionou-se meio SOC (anexo 4.3) sob agitação durante 1 h. As células foram plaqueadas em meio LB contendo Ampicilina 100 µg/L. Uma colônia foi escolhida aleatoriamente para os testes de expressão.

### 2.3.6.2 Otimização das condições de expressão

Uma colônia bacteriana foi selecionada para inocular em 5 mL de LB e o antibiótico adequado, para cultura *overnight*.

Em meio LB novo, 20% da cultura *overnight* de *E. coli* foi adicionada com os respectivos antibióticos; as bactérias foram multiplicadas até a cultura bacteriana atingir OD<sub>600</sub> 0,4-0,6, quando foi adicionado 1 mM de IPTG; a indução foi feita durante 3 h a 37 °C, ou *overnight* a 25 °C. As células foram centrifugadas e os sobrenadantes descartados. O sedimento celular foi suspenso em tampão (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 7,5) e tampão redutor de amostra para SDS-PAGE. Essas amostras foram fervidas por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida 15%, como será explicado posteriormente.

### 2.3.6.3 Expressão da urease

Feita a otimização, a colônia que mostrou maior expressão da urease de *A. brasilense* foi escolhida para realizar a purificação da proteína recombinante em maior escala.

Para isso, 200 mL de meio LB foram inoculados com 2 mL de cultura *overnight* contendo os antibióticos adequados. As células foram mantidas sob agitação a 200 rpm até que a OD<sub>600</sub> entre 0,6-0,7 fosse atingida. Então IPTG foi adicionado em concentração final de 1 mM. Após cultura *overnight*, as células foram centrifugadas durante 15 min a 5000 rpm (Sorvall RC 5C plus, rotor GSA); o sobrenadante foi descartado e as células foram congeladas para posterior purificação.

### 2.3.7 Purificação da proteína

O sedimento celular foi suspenso em tampão de lise (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 7,5) e as células lisadas por ultrassom; 10 ciclos com potência 90 durante 1 min, seguida de centrifugação 12.000 rpm por 15 min (Sorvall RC 5C plus, rotor SS43).

A purificação foi feita por cromatografia de afinidade, em coluna com 1 mL de resina Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), carregada com NiCl<sub>2</sub>, pré-equilibrada com Tampão de equilíbrio (50 mM Tris.HCl, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 7,5).

Após introduzir o sobrenadante na coluna cromatográfica, a resina foi lavada em duas etapas, com mesmo tampão contendo 20 mM, e depois, 50 mM de imidazol. A proteína retida foi eluída em tampão de lise contendo 200 mM de imidazol.

### 2.3.8 Análise por gel de poliacrilamida

As frações foram resolvidas em gel de poliacrilamida 15%, na presença de SDS (LAEMMLI, 1970) em Sistema Power Pac HC Bio-Rad. Antes de serem aplicadas no gel, as amostras foram fervidas por 5 min em tampão de amostra redutor (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% (m/v) SDS, 5% (v/v) glicerol, 100 mM β-mercaptoetanol e 0,02% (m/v) azul de bromofenol). O gel foi corado com Coomassie blue ou Coomassie blue coloidal (G-250 Sigma) (DYBALLA e METZGER, 2009).

### 2.3.9 Western blot

O Western blot foi feito de acordo com TOWBIN *et al.*, (1979). Resumidamente, as proteínas resolvidas por SDS-PAGE foram transferidas por

capilaridade para membrana de PVDF (Millipore), embebida em tampão de corrida (125 mM Tris, 960 mM glicina e SDS 0,5%) acrescido de 20% de metanol. A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio (5% de leite desnatado em pó em TBS (100 mM Tris, NaCl 1,5 M, pH 7,5) durante 2 h.

A membrana foi lavada 3 vezes por 2 min, sob leve agitação. Então incubou-se por mais 2 h com solução contendo anticorpo anti-cadeia  $\alpha$  ou cadeia  $\beta$  da urease de *H. pylori* (Santa Cruz), com diluição 1:20.000 em tampão TTBS (TBS e Tween 0,1%) com 2% leite desnatado em pó. Seguiu-se nova lavagem e incubação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho acoplado à fosfatase alcalina (Zymed), em diluição 1:20.000, no mesmo tampão do anticorpo primário. A reação colorimétrica foi desenvolvida com NBT (nitroblue tetrazolium) e BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolil-fosfato) em tampão de revelação (20mM Tris.HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,0) Como controle positivo, utilizou-se a urease de *H. pylori* purificada como descrito por (WASSERMANN *et al.*, 2010), e como controle negativo, utilizou-se BSA para o controle na detecção.

## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 Amplificação da urease *ureABC* de *A. brasilense*

A amplificação dos genes estruturais da urease de *A. brasilense* FP2 foi feita em duas etapas. O produto da primeira PCR (Figura 5), no qual são usados *primers* para a amplificação da urease; esse primeiro par de *primers* não contém a *tag* de homologia ao vetor; o amplicon dessa primeira PCR foi usado como molde em uma segunda PCR (Figura 6), utilizando-se os *primers* com a região adicional de

homologia ao vetor; assim conseguiu-se a amplificação dos três genes estruturais *ureABC* adicionado de tag para a recombinação homóloga *in vivo*.

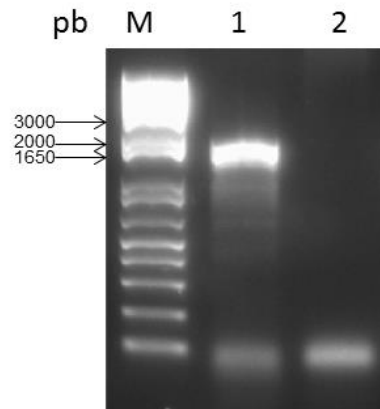


Figura 5. Amplificação dos genes da *ureABC* da urease do DNA genômico de *A. brasilense FP2* por PCR usado *primers* sem a região flanqueadora ao pET-23a. Gel de agarose 1%, M) marcador molecular 1 kb (invitogen); 46 °C, temperatura de anelamento. 1) amplicon *ureABC* (com um total de 2356 pb) e 2), controle negativo (água no lugar do molde).

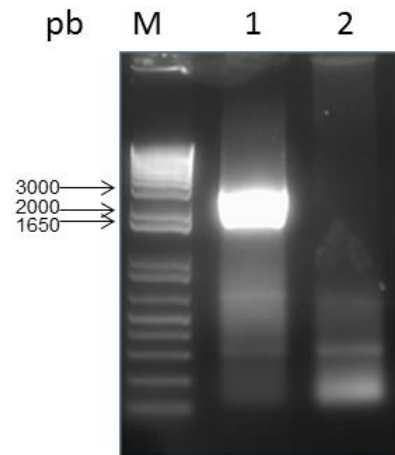


Figura 6. Amplificação dos genes da urease *ureABC* usando o amplicon da primeira PCR. Gel de agarose 1%, M) marcador molecular 1kb (Invitrogen); 54 °C, temperatura de anelamento; 1) amplicon *ureABC* (2356 pb mais 40 pb referentes à região homóloga ao vetor) e 2), controle negativo (água no lugar do molde).

#### 2.4.2 Recombinação homóloga *in vivo*

O produto de amplificação da segunda PCR foi purificado e usado para a recombinação homóloga *in vivo* em *E. coli* linhagem KC8, em vetor pET-23a.

A clonagem por recombinação homóloga resultou em 9 colônias transformantes, sendo que quatro dessas recombinantes continham o inserto do tamanho esperado, de 2356 nucleotídeos, correspondentes aos genes *ureABC* (Figura 7).

Após a identificação, minipreparações das colônias recombinantes foram feitas, e duas dessas foram encaminhadas para confirmação por sequenciamento, usando-se *primers* internos para a sequência da urease.

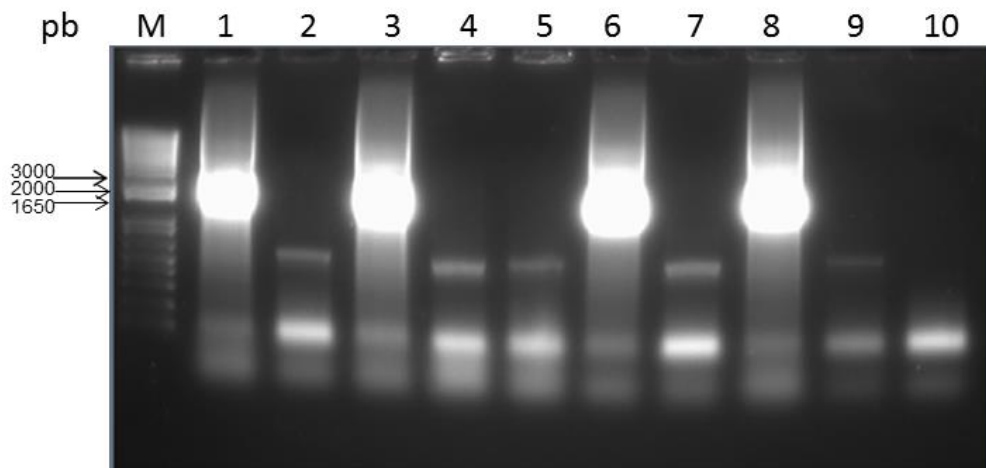


Figura 7. Análise PCR de colônia em gel de agarose 1% da clonagem por recombinação homóloga no vetor pET-23a. M marcador molecular 1Kb (Invitrogen); 1-9, colônias transformantes usadas como molde e 10, controle negativo (sem molde).

#### 2.4.3 Sequenciamento

A clonagem da urease *ureABC* de *A. brasilense* FP2 foi confirmada por sequenciamento do inserto e pelo alinhamento com a urease de *A. brasilense* sp245, sendo cada uma das subunidades da urease alinhadas separadamente.

As sequências das duas cepas de *A. brasilense* FP2 e sp245 apresentaram identidade de 99% entre as subunidades A, de 98% entre as subunidades B e de 99% entre as subunidades C. Seis resíduos de aminoácidos mostraram-se diferentes, em relação às sequências de proteínas predita do *A. brasilense* sp245. Aparentemente, esta é uma diferença entre as cepas de *A. brasilense* sp245 e FP2, pois esses seis aminoácidos diferentes mostraram-se idênticos nas colônias sequenciadas (Figura 8). Na subunidade A, uma metionina é substituída por uma leucina; na subunidade B, uma treonina é substituída por uma lisina, e uma alanina



por valina. Já na subunidade C, uma isoleucina está no lugar de uma leucina, uma leucina é substituída por treonina e uma metionina por isoleucina.

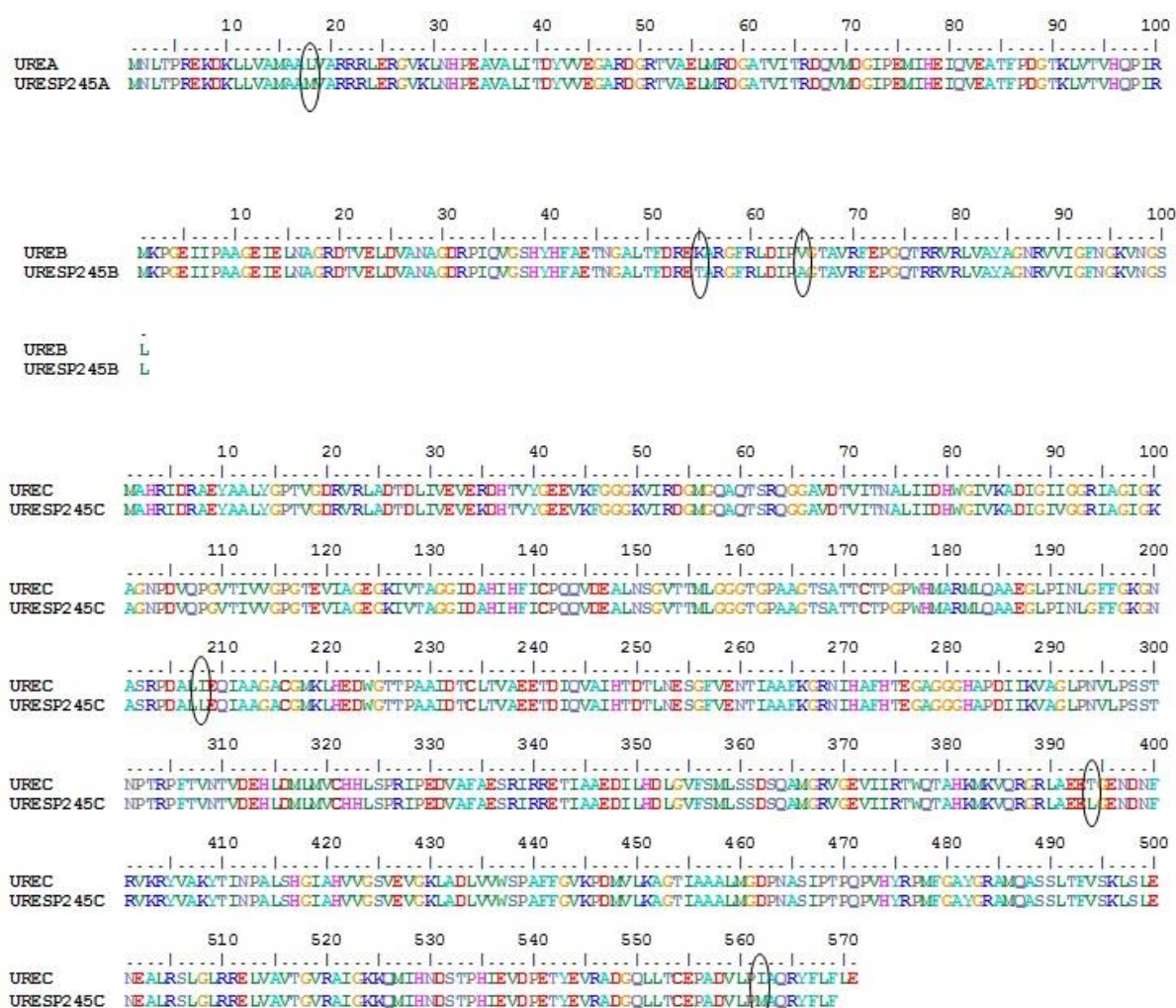


Figura 8. Alinhamentos dos aminoácidos entre as subunidades da urease de *A. brasilense* FP2 e *A. brasilense* sp245. Legenda: UREA, B, C, sequência de aminoácidos clonada de *A. brasilense* FP2, e URES245A, B, C, sequência de *A. brasilense* sp254 disponível no GenBank. Os aminoácidos diferentes entre as sequências estão destacados com uma elipse.

#### 2.4.4 Expressão da urease

Células competentes das linhagens de *E. coli*, BL21 (DE3) STAR, BL21 (DE3) RP, BL21 (DE3) Rosetta e ArticExpress (DE3) foram transformadas por choque térmico e selecionadas em meio contendo os antibióticos adequados para cada cepa bacteriana, para o teste de expressão. Houve diferença na expressão de

UreABC entre as linhagens testadas (Figuras 9 A e 9 B), e entre os tempo de expressão testados.

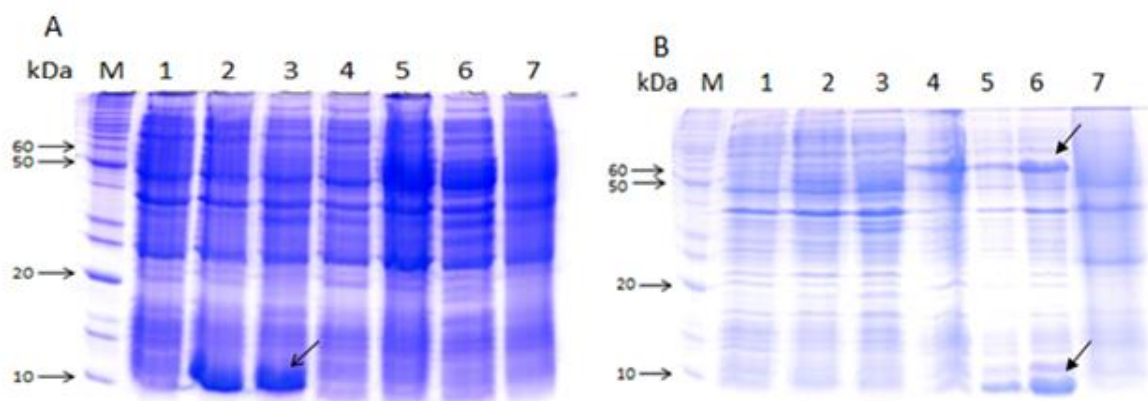


Figura 9. Análise da expressão da urease UreABC de *A. brasilense* em diferentes linhagens bacterianas. Análise em gel de poliacrilamida a 15%. A. Linhagens BL21 (DE3) RP (poços 1-4) e BL21 (DE3) Rosetta (poços 5-7). M. Marcador molecular (Thermo Scientific); linhas 1 e 4, antes da indução; 2 e 5, indução de 3 h; 3 e 6, indução *overnight*; 7, controle pET-23a vazio. B. Linhagens (BL21 (DE3) STAR (1-4) e ArticExpress (DE3) (5-7) . M. Marcador molecular (Thermo Scientific); linhas 1 e 4, antes da indução; 2 e 5, indução de 3 h; 3 e 6, indução *overnight*; 7, controle pET-23a vazio. As setas indicam as subunidades A e B sobrepostas (de aproximadamente 11 kDa) e a subunidade C (com aproximadamente 62 kDa) da urease de *A. brasilense*.

A linhagem mais adequada foi a ArticExpress (DE3), para a qual foi possível verificar a expressão das subunidades menores da urease de *A. brasilense* e maior expressão da proteína, com a indução *overnight* (figura 9B). Segundo os fornecedores, as células ArticExpress (DE3) são mais eficientes em auxiliar o *foldig* da proteína (<http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/230191A.pdf>).

#### 2.4.5 Purificação da urease de *A. brasilense*

A expressão e purificação da urease *A. brasilense* foi feita em maior escala a partir das condições de expressão otimizadas, ou seja, células ArticExpress (DE3), indução *overnight* 25 °C com 1 mM de IPTG. A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade a níquel. No gel de poliacrilamida 15%, aparece uma banda de aproximadamente 70 kDa, o que aparenta ser um complexo da cadeia C, com a A ou com a B. Duas outras bandas, que foram também reconhecidas pelos anticorpos anti-cadeia  $\beta$  da urease de *H. pylori* (equivalente a cadeia C da urease de *A. brasilense*), provavelmente sejam produtos de degradação ou a cadeia C truncada (Figura 10). As bandas sobrepostas de 11 kDa, referentes as subunidades A e B, não aparecem no SDS-PAGE da fração eluída, porém a presença destas subunidades foi revelada por Western blot utilizando anticorpos anti-cadeia  $\alpha$  da urease de *H. pylori*, esta representando uma fusão das cadeias A e B da urease de *A. brasilense* (Figura 11).

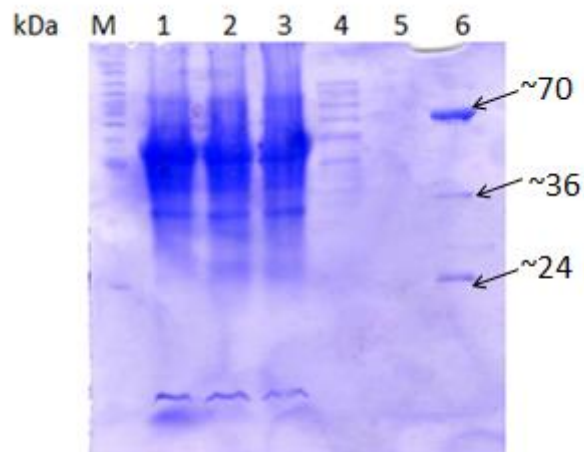


Figura 10. Purificação da urease de *A. brasilense* por cromatografia de afinidade a níquel. Análise em gel de poliacrilamida a 15%. M. Marcador molecular; 1, extrato bruto; 2 e 3, não retido, extrato circulado na coluna cromatográfica uma e 2 vezes respectivamente; 4, lavado não retido (20 mM imidazol); 5, lavado não retido 50 mM de imidazol; e 6, eluição da urease de *A. brasilense* com 200 mM de imidazol.

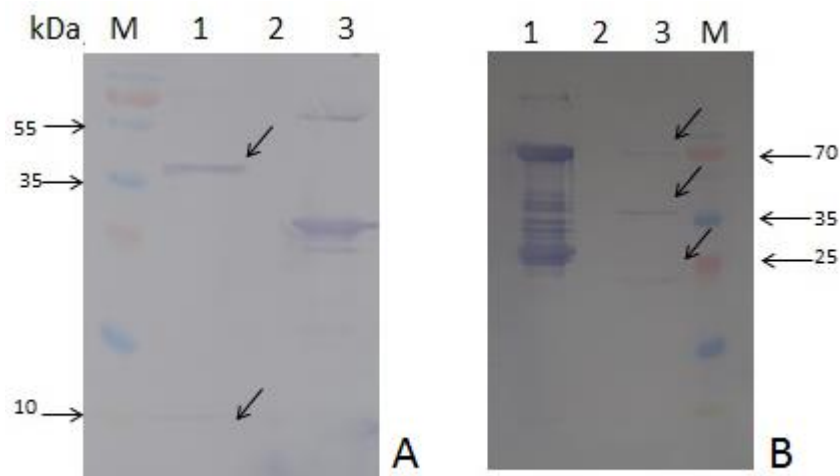


Figura 11. Análise por Western blot da urease recombinante de *A. brasilense*, com anticorpo primário anti-cadeia  $\alpha$  (painel A) e anti-cadeia  $\beta$  de *H. pylori* (painel B) M, marcador molecular (thermo scientific) 1, urease de *A. brasilense*; 2, controle negativo BSA; 3. Controle positivo, HPU.

## 2.5 DISCUSSÃO

Ureasas já foram isolados de vários microrganismos; o operon da bactéria uropatogênica *Proteus mirabilis* foi clonado por MOBLEY e WARREN, (1987), de isolados clínicos de *P. mirabilis*. Esse operon é composto por 3 genes estruturais (*ureA*, *ureB* e *ureC*), 4 genes acessórios (*ureD*, *ureF*, *ureG*, *ureE*), e inclui, também, o gene que codifica a proteína reguladora (UreR) do operon, responsivo à ureia. *B. pasteurii* também teve o operon de urease clonado (KIM e SPIZIZEN, 1985). Para o patógeno gástrico *H. pylori*, o operon da urease é composto por sete genes: *ureA* e *ureB* codificam as subunidades estruturais, e os genes *ureE*, *ureF*, *ureG* e *ureH*, que codificam as enzimas responsáveis pela incorporação de  $Ni^{2+}$  no sítio ativo. Além destes, *ureI* codifica uma proteína canal, ativada por prótons, na membrana externa da bactéria, que atua ligando e transportando ureia, e o gene *nix A*, que codifica uma proteína transportadora de  $Ni^{2+}$ . O operon da urease de *H. pylori* foi clonado e expresso em *E. coli*, resultando em uma proteína recombinante com atividade ureolítica semelhante à selvagem (HU e MOBLEY, 1993). O isolamento dos genes de urease tem permitido caracterizar o complexo mecanismo de montagem do metalocentro da proteína, bem como investigar o papel da enzima na patogênese de doenças causadas por microrganismos produtores de urease, como no caso *P. mirabilis* e *H. pylori* ou da levedura *Cryptococcus gattii* (FEDER, 2012).

A clonagem de uma urease derivada de planta em *E. coli* foi descrita primeiramente por WITTE *et al.*, (2005). Os autores conseguiram coexpressar o gene estrutural da urease de *Arabidopsis thaliana*, juntamente com os genes de três proteínas acessórias, obtendo uma urease cataliticamente ativa. Associando o gene estrutural com diferentes proteínas acessórias, *AtureD*, *AtureF* ou *AtureG*, foi

possível investigar detalhes do processo de ativação da urease de *A. thaliana* (WITTE *et al.*, 2005). No nosso laboratório, o cDNA *jbure-IIb* derivado de *C. ensiformis* foi clonado em *E. coli* para produção da urease JBURE-IIb recombinante, sem as proteínas acessórias. Embora sem atividade ureolítica, a JBURE-IIb produziu efeitos entomotóxicos como os descritos para a isoforma majoritária JBU, como ação anti-diurética em túbulos de Malpighi, e inibição do crescimento do fungo *Penicillium herguei*, efeitos que são independentes da atividade ureolítica (MULINARI *et al.*, 2011).

No presente trabalho, fizemos a amplificação e a clonagem somente dos genes estruturais da bactéria do solo *A. brasilense*. A primeira estratégia para o clonagem dos genes estruturais da urease foi pela triagem desse gene em uma biblioteca de genes de *A. brasilense*, buscando bactérias que expressassem atividade ureolítica em “urea agar segregation”, que modifica sua coloração para vermelho na presença de amônia. Por essa técnica, os genes da urease de *Streptococcus vestibularis* foram isolados. Os transformantes positivos de urease de uma biblioteca genômica foram identificados em placas de Petri contendo meio contendo urea (Christensen urea agar); nesse caso, com a presença da atividade ureásica há a modificação do meio para coloração rosa. Os genes estruturais juntamente com os genes acessórios foram clonados e a proteína purificada e caracterizada (KIM e LEE, 2006). No caso da clonagem da urease de *A. brasilense* não foram identificadas colônias com atividade ureolítica e essa estratégia foi abandonada. É provável que algum dos genes de urease estivesse interrompido, assim a sua atividade enzimática não foi detectada.

A seguir, a extração do DNA total foi feita para ser usada na PCR como molde. Assim, o DNA genômico foi usado na PCR, usando os *primers* desenvolvidos para uma posterior recombinação, adicionado de *tag* homóloga ao vetor de expressão; não foi observada nenhuma amplificação usando diretamente esses *primers* para a recombinação homóloga, embora tenham sido feitas muitas modificações nas condições da PCR. Isso provavelmente ocorreu pelo fato da bactéria possuir o genoma rico em GC, o que pode dificultar o anelamento dos *primers*. Então foi adicionado DMSO 5% à PCR, fazendo-se a amplificação em duas etapas. O produto de uma primeira PCR, obtido com *primers* sem os nucleotídeos homólogos ao vetor, foi usado como molde em uma segunda PCR, utilizando-se os *primers* com a região adicional de homologia ao vetor; essa estratégia foi eficiente para a amplificação dos três genes estruturais da urease de *A. brasilense*. Esse amplicon foi clonado eficientemente por recombinação homóloga *in vivo*.

Com o resultado do sequenciamento observou-se que seis resíduos de aminoácidos codificados pelo amplicon de *A. brasilense FP2* mostraram-se diferentes, em relação às sequências das proteínas preditas para *A. brasilense sp245* e usada para o desenho dos *primers*. Aparentemente, essa é uma diferença entre as cepas de *A. brasilense sp245* e *FP2*, pois esses seis aminoácidos diferentes mostraram-se idênticos nas colônias *FP2* sequenciadas. Esses aminoácidos podem implicar em diferenças nas propriedades enzimáticas/biológicas da urease de *A. brasilense FP2*, pois há mudanças nas características físico-químicas dos aminoácidos. MOBLEY *et al.*, (1995), destacaram 6 resíduos que são considerados essenciais para a catálise das ureases nas sequências analisadas,



que são His407, His409, Lys490, His519, His545, Asp633. Esses resíduos foram destacados em verde na Figura 12.

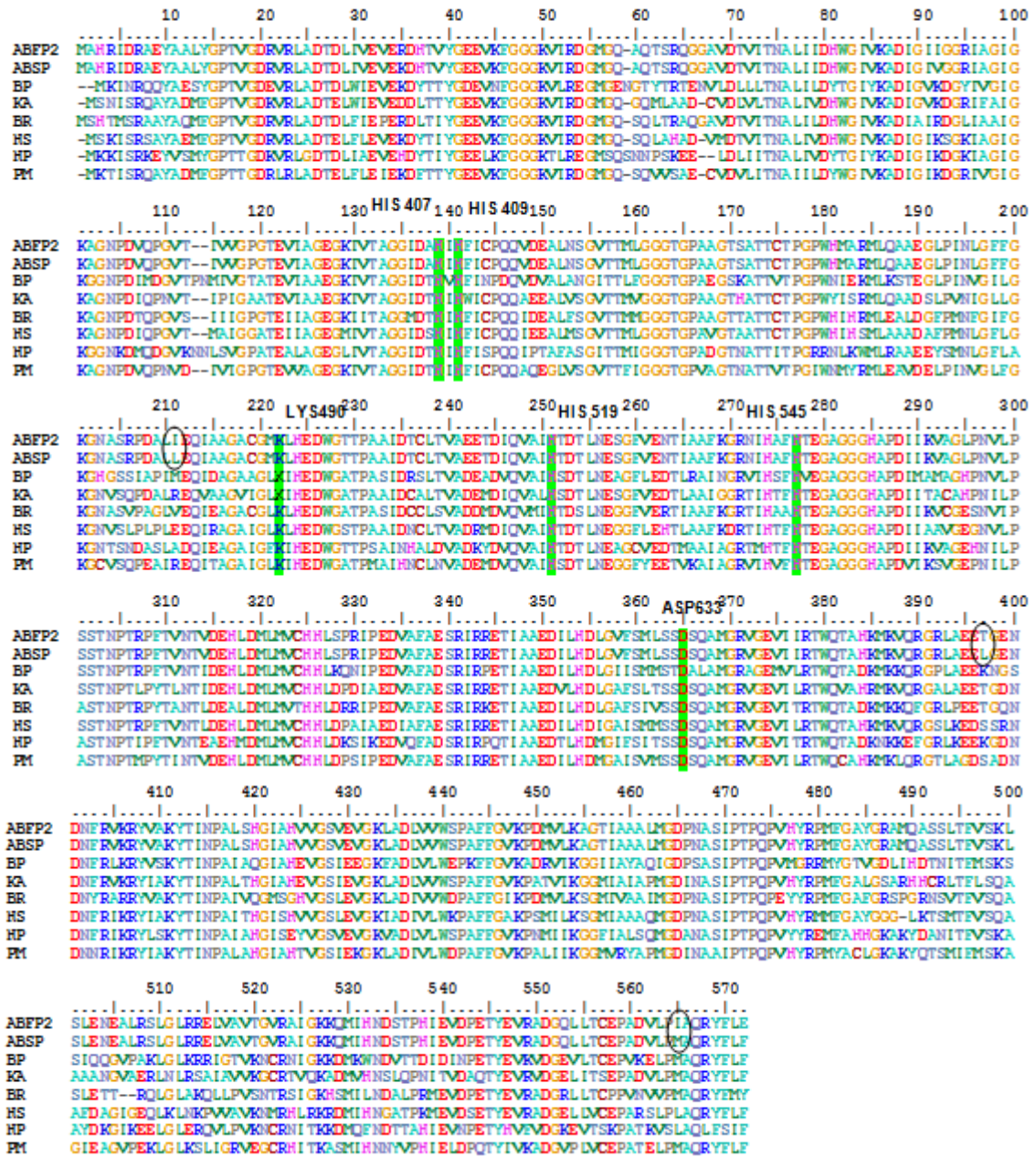


Figura 12 Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos oriundas de ureases bacterianas. ABFP2 (*A. brasilense* FP2), ABSP (*A. brasilense* sp245), BP (*B. pasteurii*), KA (*K. aerogenes*), BR (*B. japonicum*), HS (*Herbaspirillum seropedicae*), HP (*H. pylori*), PM (*P. mirabilis*). Os aminoácidos que constituem o sítio catalítico das ureases estão identificados com *highlight* verde.

Como os aminoácidos que diferiram na sequência clonada de *A. brasilense* FP2 não fazem parte do sítio ativo da enzima, pode-se supor que a proteína predita seja ativa como enzima.

Quatro linhagens de *E. coli* foram testadas para a expressão da urease recombinante: BL21 (DE3) STAR, BL21 (DE3) RP, BL21 (DE3) Rosetta e ArticExpress (DE3). A melhor expressão foi obtida com célula ArticExpress, e a expressão mais adequada foi obtida incubando-se overnight a 25 °C.

A purificação foi feita por cromatografia de afinidade a níquel, sendo que a cauda polihistidina foi introduzida na cadeia C da urease de *A. brasilense*. O reconhecimento pelo anticorpo no Western blot foi feito com o uso de anticorpos anti-HPU, anti cadeia  $\alpha$  e anti cadeia  $\beta$ , já que as ureases são altamente conservadas (ver alinhamentos na Figura 12). O Western blot da proteína eluída da coluna de afinidade confirmou a montagem do trímero ABC da urease de *A. brasilense* recombinante, mesmo na ausência das proteínas acessórias UreD, UreF e UreG. Em relação ao Western blot é importante destacar que apesar de algumas linhagens de *E. coli* serem urease-positivas, o genoma da *E. coli* BL21 não contém sequências de uréase (COLLINS e GUTMAN, 1992).

A análise em SDS-PAGE mostrou que aparentemente houve oligomerização das cadeias menores, UreA e UreB, formando uma banda de aproximadamente 35 kDa, bem como de UreC, com a UreA ou UreB, formando uma banda de 70 kDa. Também há evidência de proteólise cadeia C ou o truncamento da cadeia, havendo reconhecimento de uma banda na região dos 25 kDa. Essas hipóteses deverão ser confirmadas posteriormente, bem como estado de oligomerização da proteína recombinante em solução.

Com a otimização das condições de expressão e do protocolo de purificação da urease de *A. brasilense* FP2, outras análises dessa apoproteína poderão ser feitas para estudos de suas características físico-químicas e atividades biológicas independentes de ureólise.

## 2.6 PRÓXIMOS PASSOS

- a) Identificar por MS/MS as subunidades da urease de *A. brasilense*, e as outras bandas imunorreativas;
- b) Determinar a massa molecular e o estado de oligomerização da urease de *A. brasilense* recombinante, por técnicas de gel-filtração e espalhamento de luz;
- c) Investigar quais das atividades biológicas descritas para ureases vegetais, como JBU e SBU, e ureases microbianas como a HPU e de *B. japonicum*, estão presentes na apourease recombinante de *A. brasilense*.

### 3 CAPÍTULO II

Soyuretox: peptídeo recombinante derivado da urease ubíqua de soja  
(*Glycine max*)

### 3.1 JUSTIFICATIVA

Estudos em nosso laboratório mostraram que peptídeos derivados de sequências internas de ureases são biologicamente ativos, apresentando várias atividades como atividade inseticida e antifúngica. A clonagem e a expressão de um novo gene codificador de peptídeo derivado da urease ubíqua de soja, equivalente ao peptídeo jbtx derivado de *C. ensiformis*, além de fornecer uma “prova de conceito”, possibilitará comparar os dois peptídeos e estudar atividades biológicas com possíveis aplicações biotecnológicas.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar a sequência equivalente ao jbtx (peptídeo derivado da urease JBURE-II de *C. ensiformis*) a partir da sequência da urease ubíqua de *G. max* (soja);
- b) Clonar em vetor pET-23a;
- c) Expressar o peptídeo recombinante em *E. coli*;
- d) Purificar a proteína recombinante;
- e) Verificar atividade biológica em leveduras.

### 3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.3.1 Identificação da sequência de interesse

A identificação da sequência interna da urease ubíqua de soja colinear com a sequência interna da JBURE-II que resultou no jbtx, foi feita através do alinhamento entre os aminoácidos componentes do jbtx e a sequência de aminoácidos correspondente na urease ubíqua (*Glycine max* mRNA for urease (*ure* gene))

Accession AJ276866) (Figura 13). O peptídeo da urease ubíqua da soja, chamado soyuretox, apresenta 72% de identidade com o jbtx (Figura 14).

```

1 MKLSPREIEK LDLHNAGYLA QKRLARGLRL NYVETVALIA TQILEFVRDG EKTVAQLMCI
61 GRELLGRKQV LPAPPHLVES VQVEATFRDG TKLVTIHDLF ACENGNLELA LFGSFLPVPS
121 LDKFTENEED HRTFGEIICR SENLILNPRR NAILLRVVNK GDRPIQVGSY YHFIEVNPYL
181 TFDRRKAYGM RLNIAAGNAT RFEPGECKSV VLVSIGGNKV IRGGNNIADG PVNDSNCRAA
241 MKAVVTRGFG HVEEENAREG VTGEDYSLTT VISREEYAHK YGPTTGDKIR LGDTDLFAEI
301 EKDFAVYGDE CVFGGGKVIK DGMGQSSGHP PEGSLDVTIT NAVIIDYGTI IKADIGIKDG
361 LIISTGKAGN PDIMNDVFPN MIIGANTEVI AGEGLIVTAG AIDCHVHFIC PQLVYDAVTS
421 GITTLLVGGT GPADGTRATT CTPAPNQMKL MLQSTDDMPL NFGFTGKGNK AKPDELHEII
481 RAGAMGLKLH EDWGTTPAAI DSCLTVADQY DIQVNIHTDT LNESGFVEHT IAAFKGRTHI
541 TYHSEGAGGG HAPDIIKVCV EKNVLPSSN PTRPYTHNTI DEHLDMLMVC HHLNKNIPED
601 VAFESRIRA ETIAAEDILH DKGAISSISS DSQAMGRIGE VISRTWQTAD KMKSQRGPLQ
661 PGEDNDFRI KRYVAKYTIN PAIANGLSQY VGSVEAGKLA DLVLWKPSFF GAKPEMVIK
721 GEVAYANMGD PNASIPTPEP VIMRPMFGAF GKAGSSHSIA FVSKAALDEG VKASYGLNKR
781 VEAVKNVRKL TKRDMKLNDT LPQITVDPET YTVTADGEVL TCTAAKTVPL SRNYFLFstop

```

Figura 13. Sequência de aminoácidos da urease ubíqua (traduzida de *Glycine max* mRNA for urease (ure gene) Accession AJ276866), com sequência do peptídeo interno soyuretox marcada em vermelho.

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
SOYURETOX MGEVND SNCR AAMKAVVTRGFGHVEEENAREGV TG--EDYSLTTVVISREEYAHKYGPTTGDKIRLGD TDLFAEIEKDFAVYGDECVFGGGKVAAL EHHH
JABURETOX MGEVNEANCKAAMEIVCRREFGHKEEEDASEGVTTGDPDCPFTKAI PREEYANKYGPTTGDKIRLGD TDLIAEIEKDFALYGDES VFGGGKVI--LEHHH

SOYURETOX ...
JABURETOX HHH

```

Figura 14. Alinhamento entre a sequência predita do peptídeo derivado de *G. max*, o soyuretox, e o jbtx, derivado da urease JBURE-II de *C. ensiformis*.

### 3.3.2 Desenho dos *primers*

O desenho dos *primers* para a amplificação do soyuretox foi baseado na sequência alvo, com adição de um códon de iniciação (ATG) e a sequência CCAA na região 5' do *primer*. A região sublinhada refere-se aos sítios de restrição (Tabela 3). A  $T_m$  (*melting temperature*) e a formação de estruturas secundárias dos *primers* foram analisadas por ferramentas disponíveis no *site*

(<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>)

Tabela 3 *Primers* utilizados na amplificação do gene codificador do peptídeo interno derivado da urease ubíqua de soja.

<i>Primer</i>	Sequência	Tamanho (pb)
5'soy	CCAAC <u>CATATGGGT</u> CCAGTTAATGATTCTAATTGC	34
3'soy	CCAAG <u>CGGCCGCG</u> ACTTTCCACCTC	26

### 3.3.3 Amplificação do fragmento

A PCR foi realizada em volume final de 50  $\mu$ L contendo 400 nM de cada oligonucleotídeo, 200 mM de dNTPs, 1x do tampão para *pfu*, 2,5 U de *pfu* DNA polimerase (Thermo Scientific) e 100 ng do plasmídeo contendo a urease ubíqua recombinante pEGEX-4-T2 molde (MARTINELLI, 2007), como controle negativo o molde de urease ubíqua foi omitido e substituído por água.

A amplificação foi realizada em termociclador e teve as seguintes condições: desnaturação prévia a 95 °C por 2 min; 35 ciclos a 95 °C de desnaturação por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min. A extensão final foi realizada a 72 °C por 5 min.



O produto da amplificação por PCR foi resolvido por eletroforese em gel de agarose 1%, adicionado de GelRed Nucleic Acid Stain (BIOTIUM).

### 3.3.4 Construção do vetor de expressão

#### 3.3.4.1 Clivagem do inserto e vetor

O vetor pET-23a e o inserto foram clivados com as enzimas de restrição NdeI e Not I (Thermo Scientific) conforme protocolo do fabricante. Após a inativação da reação de clivagem do pET-23a, o vetor foi desfosforilado com a enzima FAST AP (Fermentas) na seguinte condição de reação: DNA clivado, tampão 1x, fosfatase 1 U/ $\mu$ L e água ultrapura para completar a reação de 50  $\mu$ L. A reação foi mantida em banho à 37 °C por 10 min e a reação foi inativada por 5 min à 75 °C.

#### 3.3.4.2 Ligação do inserto e transformação em células de *E. coli*

A reação de ligação foi realizada conforme protocolo da enzima T4 ligase (Ludwig). Resumidamente, um excesso molar de 3 vezes do inserto em relação ao vetor, juntamente com tampão de enzima em volume final de 20  $\mu$ L, foi mantido a 4 °C *overnight*.

Células competentes *E. coli* BL21 (DE3) RIL foram transformadas por choque térmico com todo o volume de reação de ligação, por incubação em banho de gelo por 30 min, seguida de 30 s a 42 °C e novamente banho de gelo. Então foi adicionado meio SOC à transformação e essa foi mantida sob agitação por 1 h à 37 °C.

### 3.3.5 Seleção das colônias transformadas

A seleção das células bacterianas transformadas foi realizada através de resistência aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol. As bactérias *E. coli* transformadas foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB ágar adicionado de 100 µg/mL de ampicilina e 40 µg/mL de cloranfenicol; dessa forma, somente as bactérias contendo o vetor cresceram nestas condições.

### 3.3.6 Identificação das colônias recombinantes

Para identificar as colônias recombinantes foi realizada PCR de colônia para verificar a presença do inserto nos vetores, nas mesmas condições de amplificação do soyuretox. As colônias escolhidas aleatoriamente serviram de molde, utilizando-se a enzima Go Taq (Promega), em reação de volume final de 25 µL, contendo 100 ng de cada primer, 0,2 mM de dNTPs, 1,25 U da enzima e tampão da enzima 1x. A amplificação foi realizada em termociclador nas mesmas condições descritas para amplificação do soyuretox. O produto da reação foi resolvido em eletroforese em gel de agarose 1 %, contendo *Gel Red Nucleic Acid Stain* (BIOTIUM) para visualização da banda correspondente ao peptídeo.

Minipreparações das colônias positivas foram feitas usando o Kit de extração plasmidial comercial Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen). Os plasmídeos foram encaminhados ao sequenciamento para confirmação da sequência clonada.

### 3.3.7 Expressão do gene codificador de soyuretox

A expressão do gene codificador de soyuretox foi adaptada da utilizada para o jbtx (MARTINELLI *et al.*, 2014). Resumidamente, 200 mL de meio LB foram inoculados com 2 mL de cultura *overnight*, na presença dos antibióticos ampicilina e

cloranfenicol. As células de *E. coli* foram mantidas sob agitação a 200 rpm até atingir OD<sub>600</sub> entre 0,6-07. Então IPTG foi adicionado em concentração final de 1 mM. Após a indução de 3 h, as células bacterianas foram centrifugadas por 15 min a 5000 rpm (Sorvall RC 5C plus, rotor GSA); o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi congelado, para posterior purificação.

### 3.3.8 Purificação do peptídeo recombinante

#### 3.3.8.1 Cromatografia de afinidade

A purificação do soyuretox foi feita seguindo os protocolos descritos para o jbtx (MARTINELLI et al., 2014; POSTAL et al., 2012), com algumas modificações. O sedimento celular foi suspenso em tampão de lise (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 7,5) e as células foram rompidas por ultrassom (potência 90), por 10 ciclos de 1 min cada. Após a lise, seguiu-se centrifugação a 12.000 rpm (Sorvall RC 5C plus, rotor SS43) por 15 min, e o sobrenadante (extrato total) foi aplicado em coluna com 1 mL de resina *Chelating Sepharose* (GE Healthcare), contendo NiCl<sub>2</sub> imobilizado, pré-equilibrada com tampão de equilíbrio (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 7,5). Após aplicação do extrato bruto, a coluna foi lavada com mesmo tampão contendo 50 mM de imidazol, para retirada das proteínas não retidas na resina de afinidade. Uma fração retida, enriquecida no peptídeo, foi eluída em tampão de lise contendo 200 mM imidazol.

#### 3.3.8.2 Cromatografia de Gel Filtração

A cromatografia de gel filtração da fração eluída na coluna de Ni foi feita em sistema AKTA utilizando a coluna Superdex 200 26/60-pg, equilibrada em 50 mM fosfato, 1 mM EDTA, 1 mM tris(2-carboxietil)-fosfina (TCEP), pH 7,5, com fluxo de 2,5 mL/min, e monitorada por absorvância a 280 nm.

### 3.3.9 Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise da cromatografia por gel de poliacrilamida, em meio redutor, foi feita de acordo com o descrito no Capítulo I, item 2.3.8.

### 3.3.10 Western blot

A análise por Western blot foi feita de acordo com o Capítulo I, item 2.3.9. O anticorpo primário utilizado foi o anti-jbtx-2Ec (MULINARI *et al.*, 2007), produzido em coelho, na diluição 1:7.500. Como controle negativo foi usado BSA.

### 3.3.11 Quantificação do peptídeo e concentração molar

A concentração proteica foi avaliada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A massa molar predita do peptídeo foi obtida pela análise na ferramenta ProtParam, disponível do site ExPaSy (<http://web.expasy.org/protparam/>). A concentração molar do peptídeo foi calculada assumindo a forma monomérica em solução.

### 3.3.12 Ensaio com leveduras

As leveduras *Candida tropicalis* (CE017) e *Saccharomyces cerevisiae* (1038) foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Valdirene Gomes, do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, da Universidade Estadual do Norte Fluminense. As leveduras foram mantidas em meio ágar Sabouraud (1% de peptona, 2% de glicose e 1,7% de agar).

Os ensaios foram realizados segundo POSTAL *et al.*, (2012), com modificações. As leveduras foram inoculadas em meio Sabouraud *overnight* a 28 °C. Após a cultura *overnight*, suspensões de leveduras foram diluídas em solução salina (NaCl 0,85%), contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma

concentração de  $1 \times 10^4$  células/mL. O ensaio foi feito em placa de 96 poços com fundo em U, contendo 100  $\mu$ L da suspensão de leveduras e o peptídeo soyuretox (após diálise contra tampão 10 mM Tris, pH 7,0) nas doses de 9 e 18  $\mu$ M. Como controle negativo foi utilizado o tampão da diálise e como controle positivo, foi usado  $H_2O_2$  0,1%. Após a incubação das leveduras com o soyuretox por 24 h foi feita a análise de unidades formadora de colônia (UFC) pela técnica de drop plate (POSTAL *et al.*, 2012) para verificar o número de células viáveis. As leveduras foram diluídas em série ( $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ) em salina livre do peptídeo e 20  $\mu$ L de cada diluição foram plaqueados e mantidas 24 h a 28 °C. A contagem é feita na diluição que possui entre 3 e 300 colônias e o cálculo da UFC é considerado em UFC/ mL. O ensaio foi feito em triplicata, e os resultados foram apresentados como média e o respectivo desvio padrão.

#### 3.3.12.1 Análise estatística

Os dados foram avaliados usando *one way* ANOVA, seguidos pelo teste de Tukey, usando o software GraphPrism (versão 5.0 para Windows). Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### 3.4 RESULTADOS

#### 3.4.1 Amplificação do Soyuretox

A sequência codificadora do soyuretox foi amplificada por PCR, obtendo-se um fragmento único e do tamanho esperado de 303 pb (Figura 15), utilizando como molde o gene de urease ubíqua de soja previamente clonado em pGEX-4T-2. A temperatura ótima de anelamento para a amplificação foi 55 °C.

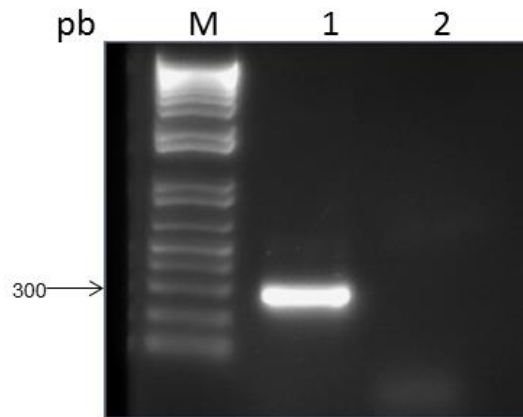


Figura 15. Amplificação da região codificadora do soyuretox a partir do molde de urease ubíqua de soja. Gel de agarose 1%, MM marcador molecular 1 kb (Invitrogen); 1, amplicon do soyuretox, (temperatura de anelamento 55 °C) e, 2, controle negativo, sem molde da urease ubíqua.

#### 3.4.2 Construção do vetor de expressão

Após a purificação do amplicon e do vetor pET-23a, esses foram clivados com as enzimas de restrição NdeI e NotI (Fermentas), e então ligados com a enzima T4 ligase (Fermentas).

Para a confirmação dos clones positivos, oito colônias foram analisadas por PCR de colônia, sendo que cinco colônias recombinantes foram confirmadas por conterem o inserto (Figura 16). Os plasmídeos positivos na PCR de colônia foram encaminhados para sequenciamento.

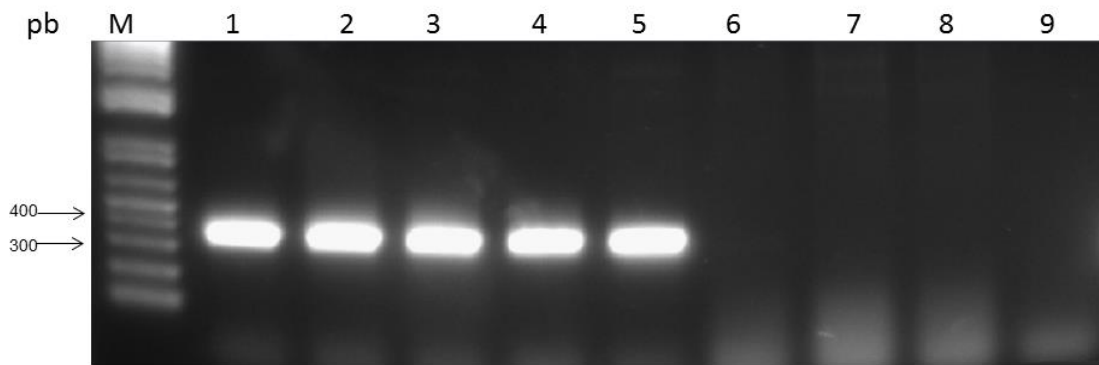


Figura 16. PCR de colônia para a identificação dos clones positivos em gel de agarose 1%. M marcador molecular 1Kb (Invitrogen); 1-8, colônias transformantes usadas como molde para a identificação de clones contendo o inserto do soyuretox e 9, controle negativo, contendo apenas água.

#### 3.4.3 Expressão heteróloga do soyuretox em *E. coli*

Utilizando o vetor pET-23a, o peptídeo foi expresso com cauda de seis histidinas, situada na região C-terminal do peptídeo, visando permitir a purificação por cromatografia de afinidade. A *E. coli* BL21(DE3)-RIL foi escolhida por expressar códons raros, como ocorrem na sequência do peptídeo, comuns em organismos superiores. As células *E. coli* para expressão heteróloga, transformadas com a construção pET-23a/soyuretox, foram inoculadas no meio seletivo LB contendo ampicilina e cloranfenicol para expressão do peptídeo recombinante, tendo-se um rendimento de expressão de 2,5 mg/L cultura).

#### 3.4.4 Purificação do soyuretox

A purificação de soyuretox foi feita por cromatografia de afinidade a Ni e cromatografia de gel filtração (Figura 17), e verificada em gel de poliacrilamida 15% (Figura 18).

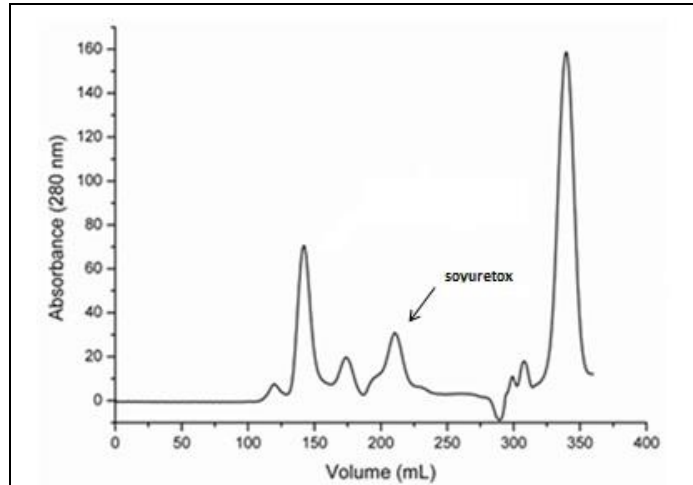


Figura 17. Perfil cromatográfico do soyuretox em cromatografia de gel filtração S200. O pico correspondente ao peptídeo está indicado com uma seta.

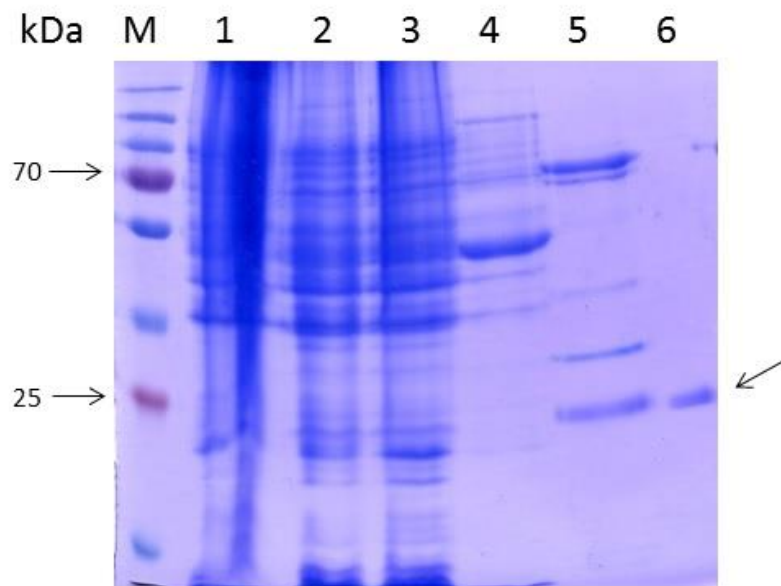


Figura 18. Análise por gel de poliacrilamida a 15% em meio redutor, das frações da purificação do peptídeo soyuretox. M. Marcador molecular; 1, extrato bruto; 2 e 3, extrato circulado 1 e 2 vezes respectivamente na coluna de afinidade a níquel; 4, lavado (tampão com 50 mM de imidazol); 5, eluição da amostra (200 mM de imidazol) e 6, amostra após a gel filtração (seta). Corado com Coomassie.

No gel de poliacrilamida, observou-se que soyuretox comporta-se como um dímero de 23,2 kDa após a gel filtração, mesmo em condições redutoras. Já na



cromatografia de gel filtração, o volume de eluição do soyuretox correspondeu a de um trímero. A tendência de oligomerizar também foi observada para o jbtx em diferentes condições (KAPPAUN, 2011), especialmente para o mutante N-terminal do peptídeo jbtx (MARTINELLI *et al.*, 2014).

#### 3.4.5 Western blot

Para verificar a identidade do soyuretox, foi realizado Western-blot com anticorpos anti-jbtx, uma vez que os peptídeos apresentam 72% de identidade (Figura 19). Observou-se o reconhecimento de uma banda correspondente ao soyuretox (11,6 kDa) e também a sua forma dimérica (23,2 kDa).

O reconhecimento mais intenso da banda na forma monomérica, contrastando com sua menor proporção no gel corado com Coomassie (Figura 18), provavelmente se deve à maior exposição dos epítopos nessa forma.

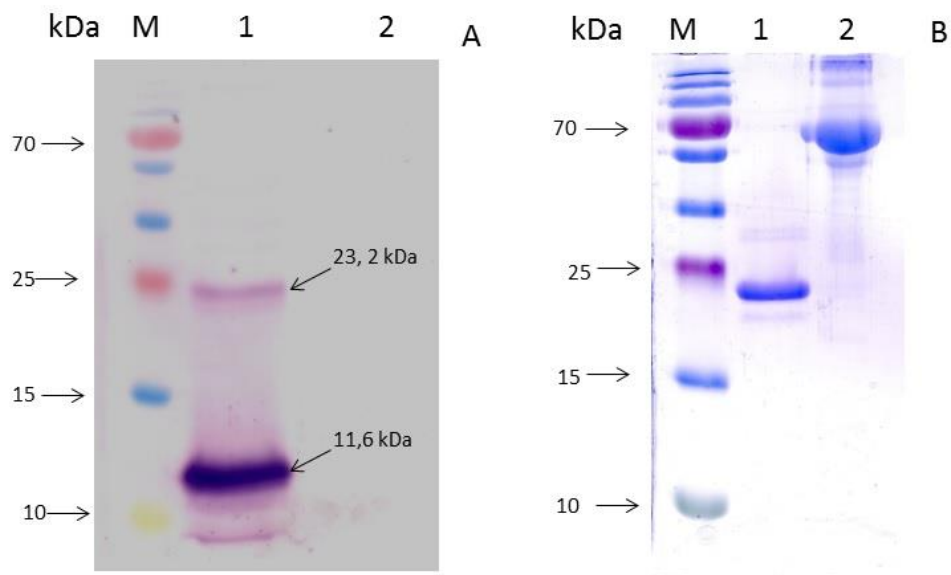


Figura 19. Análise por Western blot e gel de poliácridamida 15% do soyuretox. A. Western blot com anticorpo primário anti-jbtx-2Ec. M. marcador molecular (Thermo Scientific); 1, soyuretox após gel filtração; 2, controle negativo BSA. B. Gel de

poliacrilamida M. marcador molecular (Thermo Scientific), 1, soyuretox após a gel filtração 2, controle negativo BSA

### 3.4.6 Ensaio com leveduras

Estudos demonstraram que o soyuretox inibe a multiplicação das duas leveduras testadas, *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*, nas doses de 9 e 18 $\mu$ M. Após a incubação com o peptídeo por 24 h as leveduras foram diluídas em série em meio sem o peptídeo para determinação das unidades formadoras de colônia (UFC) (Figura 20). A *Saccharomyces cerevisiae* mostrou-se a mais sensível das duas leveduras testadas, os resultados encontrados no ensaio com leveduras para essas doses testadas são similares aos encontrados para o jbtx em POSTAL *et al.*, 2012.

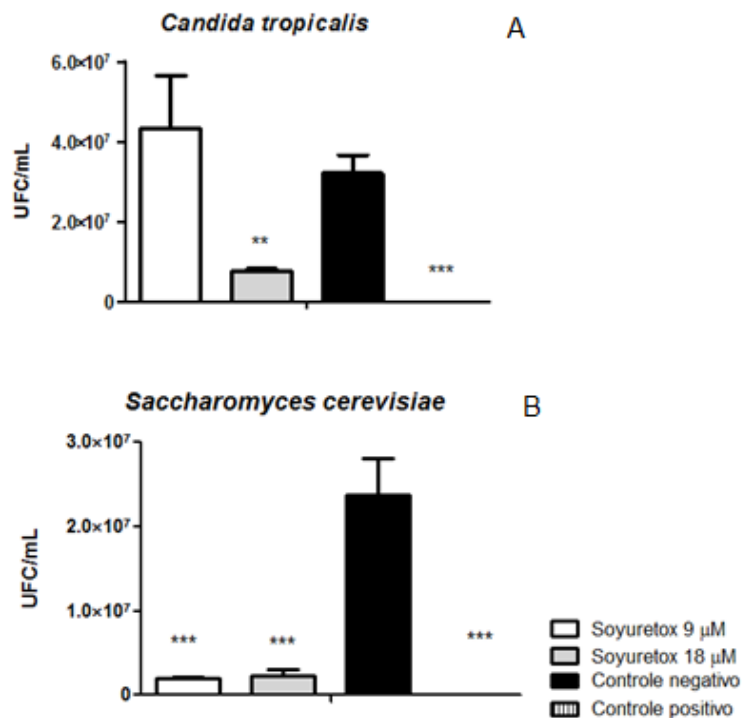


Figura 20. Efeito do soyuretox no crescimento de leveduras nas doses 9 e 18  $\mu$ M. (A) *C. tropicalis*, e (B) *S. cerevisiae*. Controle negativo, tampão, e controle positivo,

0,1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As barras representam médias de triplicatas. \* indica p < 0,05 em relação ao controle.

### 3.5 DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores do grupo demonstraram que a SBU apresenta atividade inseticida (FOLLMER *et al.*, 2004) e antifúngica (BECKER-RITT *et al.*, 2007). Naqueles trabalhos, não foi possível realizar testes com a isoforma ubíqua da urease de soja, já que essa proteína, apesar de presente em toda a planta, apresenta-se em baixas concentrações, inviabilizando a obtenção da quantidade necessária de proteína para os bioensaios.

Nesse trabalho a clonagem e a expressão heteróloga do gene codificador do peptídeo soyuretox foi feita, derivado da urease ubíqua de soja. Esse peptídeo é colinear ao jbtx, peptídeo inseticida e antifúngico derivado da urease de *C. ensiformis*. A escolha da urease ubíqua da soja como “fonte” do soyuretox teve duas razões: 1) a disponibilidade do gene de urease ubíqua de soja, previamente clonado em pGEX-4T-2 (MARTINELLI, 2007), como *template* para PCR, e 2) a indisponibilidade de dados sobre as atividades biológicas dessa isoforma de urease da soja.

Pelo alinhamento do jbtx com a urease ubíqua de soja foi identificada a região correspondente ao peptídeo. O alinhamento entre soyuretox e jbtx mostrou que os peptídeos compartilham 72% de identidade. A estratégia usada para a expressão e a purificação foi baseada em dados anteriores do grupo para o jbtx (MARTINELLI *et al.*, 2014; POSTAL *et al.*, 2012). O vetor pET-23a foi escolhido como vetor de

expressão, obtendo-se o peptídeo com uma cauda de 6 histidinas, para facilitar a purificação por cromatografia de afinidade. O meio de cultura utilizado foi o LB e a expressão feita 3h a 37 °C. No entanto, a purificação usando apenas cromatografia de afinidade a níquel não foi suficiente para obter o peptídeo com pureza adequada, sendo necessária uma segunda cromatografia de gel filtração em sistema AKTA. Nessa cromatografia foi possível observar que o soyuretox aparenta ser um trímero, apresentando o mesmo perfil cromatográfico do jbtx (Anexo 4.5); em gel de poliacrilamida, o soyuretox se comportou como um dímero, e no Western, tanto a banda monomérica como a dimérica foram reconhecidas (Figura 19). Os dados variáveis de massa molecular e estado de oligomerização do soyuretox sugerem que este apresenta características de uma proteína pelo menos parcialmente desordenada, assim como foi verificado para o jbtx (F. C. Lopes, dados não publicados). Este tipo de proteína não possui estruturas secundária e terciária definidas, apresentando-se distendida e com grande flexibilidade. Por apresentarem-se desenoveladas, essas proteínas têm um comportamento anômalo tanto na gel filtração como no SDS-PAGE, por terem um raio hidrodinâmico maior do que o das proteínas enoveladas (UVERSKY, 2013). Estudos adicionais deverão ser realizados pra confirmar essa característica.

Recentemente, dados publicados pelo nosso grupo descreveram relações de estrutura-função no jbtx, empregando-se de diferentes mutantes do peptídeo. Por meio de mutagênese sítio-dirigida, obteve-se dois mutantes: um correspondente à metade N-terminal do peptídeo, e outro correspondente à metade C-terminal do peptídeo. Ensaios de formação de canais iônicos em bicamadas lipídicas artificiais com o jbtx e mutantes mostraram ambos os domínios, o N- e o C-terminal, formam

canais iônicos(MARTINELLI *et al.*, 2014). As análises da atividade inseticida com os percevejos *Oncopeltus fasciatus* e *Rhodnius prolixus*, e também do efeito bloqueador da junção neuromuscular em baratas *Phoetalia pallida*, mostraram que a porção N-terminal do jbtx é responsável pelo efeito entomotóxico. Ainda que o mutante correspondente ao C-terminal do jbtx também interaja com membranas, sozinho este não produziu efeitos entomotóxicos. Interessante comentar que urease de *B. pasteurii* (FOLLMER *et al.*, 2004), e provavelmente todas as ureases bacterianas, não possui a atividade inseticida das ureases vegetais. Nas ureases bacterianas, a região correspondente ao N-terminal do jbtx está ausente, correspondendo à região que conectaria as cadeias B e C da proteína. Isto pode ser visualizado na Figura 21, que mostra o alinhamento do soyuretox e jbtx com outras ureases (a região ausente nas ureases bacterianas está destacada).

Como mostra a Figura 21, a região que corresponde ao N-terminal dos peptídeos soyuretox e jbtx é mais divergente do que o C-terminal, e assim, pode-se esperar que peptídeos equivalentes derivados de outras ureases possam ter atividades biológicas diferenciadas.

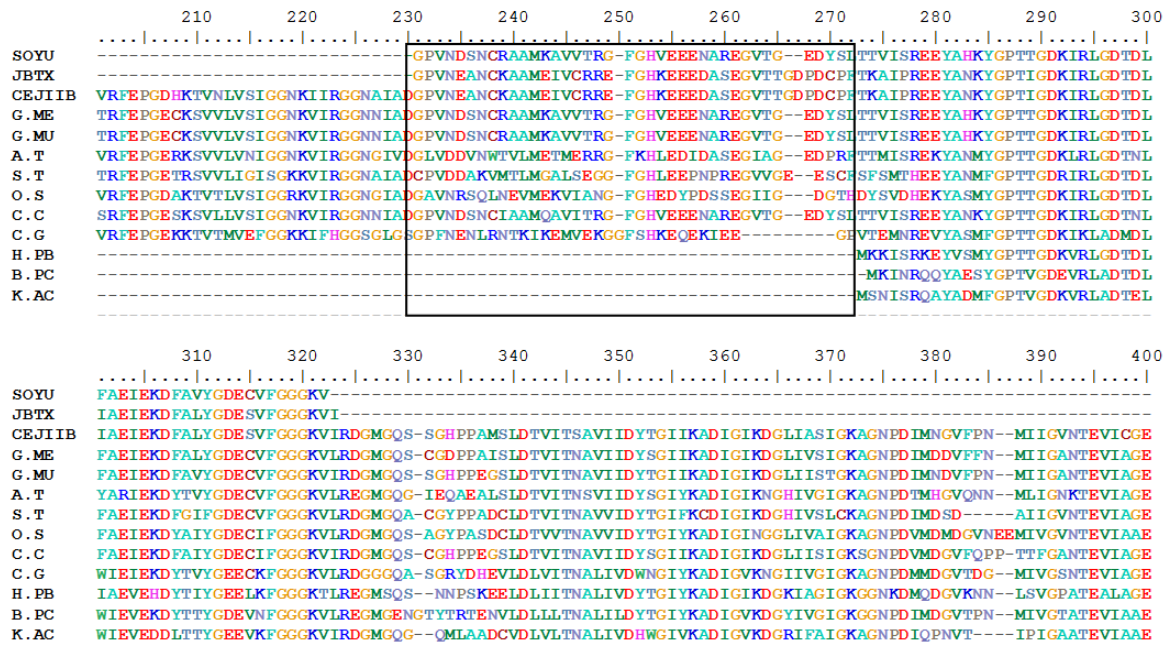


Figura 21. Alinhamento das sequencias de aminoácidos do soyuretox e Jbtx com outras ureases. SOYU (soyuretox), JBTX (jaburetox), CEJIIB (*C. ensiformis*, JBUREII-B), G.ME (*G. max*, embrião específica), G.MU (*G. max*, ubíqua), A.T (*A. thaliana*), S.T (*Solanum tuberosum*), O.S (*Oriza sativa*), C.C (*Cajus cajan*), H.PB (*H. pylori* subunidade B), BPC (*B. pasteurii*, subunidade C), K.AC (*K. aerogenes*, subunidade C). O retângulo destaca a região do jbtx que é ausente em ureases bacterianas.

A primeira descrição de atividade antifúngica de urease em fungos fitopatogênicos foi feita com a canatoxina (OLIVEIRA *et al.*, 1999), uma das isoformas de urease da *C. ensiformis*. Em 2007, BECKER-RITT e colaboradores mostraram a atividade antifúngica da SBU, da JBU e da HPU em doses submicromolares. Mais recentemente, a JBU foi testada em diferentes espécies de leveduras, e mostrou efeito fungitóxico que varia com o gênero e espécie de levedura. Peptídeos fungicidas derivados da JBU foram obtidos por hidrólise da proteína com papaína, sendo que um deles continha uma parte da região N-terminal do jbtx (POSTAL *et al.*,

2012). Estudos preliminares com os mutantes do jbtx sugeriram que tanto a sua porção N-terminal, como a C-terminal, possuem atividade antifúngica (MARTINELLI, 2012). O peptídeo jbtx mostrou efeitos fungitóxicos em doses de 9 e 18  $\mu\text{M}$ , em concentrações de 10 a 20 vezes maior do que a JBU, nas leveduras *C. parapsilosis* e *P. membranifaciens* e *S. cerevisiae* (POSTAL *et al.*, 2012). Nesse trabalho, o soyuretox inibiu as leveduras *C. tropicalis* e *S. cerevisiae* na dose de 9 e 18  $\mu\text{M}$ , resultados semelhantes aos descritos para o jbtx, porém o soyuretox mostrou ser mais ativo contra *S. cerevisiae* (POSTAL *et al.*, 2012).

Em relação a possibilidade do soyuretox ser intrinsecamente desorganizado, estudos de modelagem molecular e simulação foram feitos em colaboração com o Dr. Rodrigo Ligabue Braun. Um padrão de comportamento similar ao obtido para o peptídeo jbtx por MARTINELLI *et al* (2014) foi observado, sendo que o peptídeo perde elementos de estrutura secundária e se compacta (fenômeno demonstrado mais claramente pela análise do raio de giro (anexo 4.7.2). O domínio N-terminal do soyuretox perde hélices e se torna completamente desestruturado, enquanto o domínio C-terminal ganha fitas- $\beta$  (anexo 4.7.1). Tais alterações observadas na estrutura do soyuretox em simulação foram também observadas para o jbtx. O peptídeo derivado da soja, entretanto, parece ser mais estável que o derivado de *C. ensiformis*, como demonstra a menor flutuação no RMSD.

### 3.6 PRÓXIMOS PASSOS

- a) Confirmar a atividade antifúngica do soyuretox no ensaio de leveduras;
- b) Verificar outras atividades biológicas, como efeito inseticida e entomotóxico (neurotoxicidade, inibição de diurese), e atividade nematicida;
- c) Estudar o comportamento desordenado do peptídeo através de ressonância nuclear magnética (NMR), espalhamento de luz e dicroísmo circular;
- d) Avaliação das células das leveduras por citometria de fluxo.



## BIBLIOGRAFIA

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1–20, 2014.
- BALASUBRAMANIAN, A.; PONNURAJ, K. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of urease from jack bean (*Canavalia ensiformis*). **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 65, p. 949–951, 2009.
- BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J. A.; CARLINI, C. R. Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. **Toxicon**, v. 29, n. 4-5, p. 453–459, jan. 1991.
- BARROS, P. R. et al. Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: Implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 12, p. 1848–1854, 2009.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian journal of microbiology**, v. 50, p. 521–577, 2004.
- BECKER-RITT, A. B. et al. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. **Toxicon**, v. 50, p. 971–983, 2007.
- BRADFORD, M. Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of Protein-Dye-Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BUBECK, P.; WINKLER, M.; BAUTSCH, W. Rapid cloning by homologous recombination in vivo. **Nucleic acids research**, v. 21, n. 15, p. 3601–3602, 1993.
- CARLINI, C. R. et al. Central Nervous Effects of the Convulsant Protein Canatoxin \*. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 54, n. 3, p. 161–166, 1 mar. 1984.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 19, n. 7, p. 667–675, 1981.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A.; RIBEIRO, J. M. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. **British journal of pharmacology**, v. 84, p. 551–560, 1985.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 19, p. 667–675, 1991.

CARLINI, C.R.; OLIVEIRA, A.E.; AZAMBUJA, P., XAVIER-FILHO, J., WELLS, M. A. Biological effects of canatoxin in different insect by insect cathepsin-like enzymes. **J. Econ. Entomol.**, v. 90, n. 2, p. 340–348, 1997.

COLLINS, C. M.; GUTMAN, D. M. Insertional inactivation of an *Escherichia coli* urease gene by IS3411. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 883–888, 1992.

COX, G. M. et al. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443–448, 2000.

CRUZ, L. M. et al. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas 16S Ribosomal DNA* Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2375–2379, 2001.

DEFFERRARI, M. S. et al. Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* major urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 6, p. 388–399, 2011.

DEMARTINI, D. R.; CARLINI, C. R.; THELEN, J. J. Global and targeted proteomics in developing jack bean (*Canavalia ensiformis*) seedlings: An investigation of urease isoforms mobilization in early stages of development. **Plant Molecular Biology**, v. 75, p. 53–65, 2011.

DIXON, N. E. et al. Letter: Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, p. 4131–4133, 1975.

DYBALLA, N.; METZGER, S. Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. **Journal of visualized experiments : JoVE**, p. 2–5, 2009.

FEDER, V. **O papel da Urease e suas proteínas acessórias na virulência de *Cryptococcus gattii***. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

FERREIRA-DASILVA, C. T. et al. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 44, n. April, p. 162–171, 2000.

FOLLMER, C. et al. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. **The Biochemical journal**, v. 360, p. 217–224, 2001.

FOLLMER, C. et al. PIXE analysis of urease isoenzymes isolated from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 189, n. 1-4, p. 482–486, abr. 2002.

FOLLMER, C. et al. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: Biological effects unrelated to ureolytic activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 1357–1363, 2004.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 35–59, 2009.

FREITAS, A. D. S. et al. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, v. 66, p. 497–504, 2007.

GOLDRAIJ, A.; BEAMER, L. J.; POLACCO, J. C. Interallelic complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean. **Plant physiology**, v. 132, n. August, p. 1801–1810, 2003.

GUNARTO, L.; ADACHI, K.; SENBOKU, T. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. from a subtropical island, and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. **Biology and Fertility of Soils**, v. 28, p. 129–135, 1999.

HOLLAND, M. A; POLACCO, J. C. Urease-null and hydrogenase-null phenotypes of a phylloplane bacterium reveal altered nickel metabolism in two soybean mutants. **Plant physiology**, v. 98, p. 942–948, 1992.

HU, L. T.; MOBLEY, H. L. T. Expression of catalytically active recombinant *Helicobacter pylori* urease at wild-type levels in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 6, p. 2563–2569, 1993.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I. . de fixação biológica do nitrogênio. **Embrapa Soja**, 2007.

JONES, B. D. et al. Construction of a urease-negative mutant of *Proteus mirabilis*: Analysis of virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 4, p. 1120–1123, 1990.

KAPPAUN, K. **Estudos com o jaburetox: efeito tóxico de E. coli liofilizadas carregadas com o peptídeo e análise da influência do epítopo v5 na formação de agregados.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

KAVERMANN, H. et al. Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 7, p. 813–822, 2003.

KIM, G. Y.; LEE, M. H. Cloning and characterization of the urease gene cluster of *Streptococcus vestibularis* ATCC49124. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 286–290, 2006.

KIM, S.P.; SPIZIZEN, J. Molecular cloning and expression of *Bacillus pasteurii* urease gene in *Escherichia coli*. **Korean J. of Applied microbial. and bioengineering.**, v. 13, p. 297–302, 1985.

KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1-3, p. 9–21, jul. 2009.

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

LAM, H.-M. et al. the Molecular-Genetics of Nitrogen Assimilation Into Amino Acids in Higher Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 569–593, 1996.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 541–556, 8 set. 2009.

MARKS, B. B. et al. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. **AMB Express**, v. 3, p. 21, 2013.

MARTINELLI, A. H. S. **Expressão da urease ubíqua de soja em *Escherichia coli*.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

MARTINELLI, A. H. S. **Jaburetox, peptídeo tóxico derivado da urease: estudos de estrutura e função.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

MARTINELLI, A. H. S. et al. Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 3, p. 935–944, 2014.

MEDEIROS-SILVA, M. et al. Soybean ureases, but not that of *bradyrhizobium japonicum*, are involved in the process of soybean root nodulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 3517–3524, 2014.

MOBLEY, H. L.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 3, p. 451–480, 1995.

MOBLEY, H. L. T.; HAUSINGER, R. P. Microbial Ureases : Significance , Regulation , and Molecular Characterization. v. 53, n. 1, p. 85–108, 1989.

MOBLEY, H. L. T.; WARREN, J. W. Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 11, p. 2216–2217, 1987.

MULINARI, F. et al. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, v. 28, p. 2042–2050, 2007.

MULINARI, F. et al. Characterization of JBURE-IIb isoform of *Canavalia ensiformis* (L.) DC urease. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 12, p. 1758–1768, 2011.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of azospirillum: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1591–1601, dez. 1994.

OLIVEIRA, A. E. A. et al. The toxicity of jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC.] canatoxin to plant pathogenic fungi. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 1, p. 59–62, 1999.

OLIVERA-SEVERO, D.; WASSERMANN, G. E.; CARLINI, C. R. *Bacillus pasteurii* urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 452, n. 2, p. 149–55, 15 ago. 2006.

PIOVESAN, A. R. et al. Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 11, p. 1023–32, nov. 2008.

PIOVESAN, A. R. et al. *Canavalia ensiformis* urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 547, p. 6–17, 1 abr. 2014.

PIRES-ALVES, M. et al. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, n. 2, p. 139–145, 2003.

POLACCO, J. C. et al. Soybean genes involved in nickel insertion into urease. **Journal of experimental botany**, v. 50, n. 336, p. 1149–1156, 1999.

POLACCO, J. C.; WINKLER, R. G. Soybean leaf urease: a seed enzyme? **Plant physiology**, v. 74, p. 800–803, 1984.

POSSELT, G.; BACKERT, S.; WESSLER, S. The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. **Cell communication and signaling : CCS**, v. 11, n. 1, p. 77, 2013.

POSTAL, M. et al. Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 22–32, 2012.

REAL-GUERRA, R.; CARLINI, C. R.; STANISÇUASKI, F. Role of lysine and acidic amino acid residues on the insecticidal activity of Jackbean urease. **Toxicon**, v. 71, p. 76–83, 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 edition ed.[s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1986.

SORIANO, A.; COLPAS, G. J.; HAUSINGER, R. P. UreE stimulation of GTP-dependent urease activation in the UreD-UreF-UreG-urease apoprotein complex. **Biochemistry**, v. 39, p. 12435–12440, 2000.

STANISÇUASKI, F. et al. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 6, p. 753–60, maio 2005.

STANISÇUASKI, F. et al. Invitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. **Journal of insect physiology**, v. 55, n. 3, p. 255–63, mar. 2009.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 487–506, 2000.

SUMNER, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease: preliminary paper. **Journal of Biochemistry**, v. 69, p. 435–441, 1926.

TORISKY, R. S. et al. A single gene (Eu4) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 242, p. 404–414, 1994.

TORISKY, R. S.; POLACCO, J. C. Soybean Roots Retain the Seed Urease Isozyme Synthesized during Embryo Development. **Plant physiology**, v. 94, p. 681–689, 1990.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

UBERTI, A. F. et al. Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 69, p. 240–9, jul. 2013.

UVERSKY, V. N. Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1834, n. 5, p. 932–51, maio 2013.

VESSEY, J. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, v. 255, p. 571–586, 2003.

WALKER, T. S. et al. Root exudation and rhizosphere biology. **Plant physiology**, v. 132, n. May, p. 44–51, 2003.

WASSERMANN, G. E. et al. Helicobacter pylori urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 7, p. 2025–2034, 2010.

WITTE, C.-P. Urea metabolism in plants. **Plant science : an international journal of experimental plant biology**, v. 180, n. 3, p. 431–8, mar. 2011.

WITTE, C.-P.; ROSSO, M. G.; ROMEIS, T. Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 139, n. November, p. 1155–1162, 2005.

ZAMBELLI, B. et al. Chemistry of Ni<sup>2+</sup> in urease: Sensing, trafficking, and catalysis. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 7, p. 520–530, 2011.

ZERNER, B. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, urease. **Bioorganic Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 116–131, mar. 1991.

## 4 ANEXOS

### 4.1 Sequência nucleotídica da urease de *Azospirillum brasilense* sp245. Em destaque os códons de iniciação e terminação.

```

1 atgaacctga caccgcgcga gaaggacaag cttctcgtgg ccatggcccgc catgggtggcg
61 cgccgcggcg tggagcgtgg cgtgaagctg aaccatcccg aggcgggtggc cctcatcacc
121 gattacgtgg tggagggcgc gcgcgacgga cgcaccctgg ccgagctgat gcgcgacggc
181 gcgacggtga tcaccgcgca tcaggtgatg gatggcatcc cggagatgat ccacgagatc
241 caggtcgagg ccaccttccc cgacggcacc aagctcgtca ccgtccacca gccgattcgc
301 taagggggagc cccgatgaaa cccggtgaaa tcatccccgc cgcgggagag atcgaactca
361 acgcccggcg cgacacggtg gagttggacg tcgccaacgc cggcgaccgc ccgatccagg
421 tcggctcgca ctatcacttc gctgaaacga acggggcgct gaccttcgac cgcgagacgg
481 cgcgcggctt ccggctggac atccccgcgc ggacagcggg gcgtttcgag ccggggcaga
541 cgcgcccgct gcggctggtc gectacgccg gcaaccgcgt ggtcatcggc ttcaacggca
601 aggtcaacgg cagcctgtga agggcgccag cggagggcat cagacaatgg cgcatcgcac
661 cgaccggggc gaatacgcgg ctctctacgg ccccaccgtg ggcgaccgtg tccggctggc
721 cgacaccgac ctgatcgtcg aggtcgagaa ggaccacacc gtctatggcg aggaggtcaa
781 gttcggggcg ggcaaggtga tccgcgacgg catggggcag gcccgacct cgcgccaggg
841 cggcgcggtg gacaccgtca tcaccaacgc gctgatcatc gaccatggg gcacgtcaa
901 ggccgacatc ggcacgtcgc gcgggcgcat cgcgggcatc ggcaaggccg gcaaccggga
961 cgtccagccc ggcgtgacca tcgtcgtcgg gccggggacc gaggtcatcg cgggtgaggg
1021 caagatcgtc accgcccggc gcacgcgac ccacatccac ttcattctgc cgcagcaggt
1081 ggatgaggcg ctgaacagcg gcgtcaccac catgctgggc ggcggcaccg gcccgggcg
1141 cggcacgtcg gccaccacct gcacgcgggg gccgtggcac atggcccgga tgctccaggc
1201 ggccgagggg ctgccgatca acctgggctt cttcggcaag ggcaatgcca gccgtcccga
1261 cgcgctgttg gagcagatcg ccgcccgcgc ctgcggcatg aagctgcacg aggactgggg
1321 caccaccccg gcggccatcg acacctgcct gacggtggcg gaggagacg acatccaggt
1381 ggccatccac accgacacgc tgaacgagtc gggcttcgtg gagaacacca tcgccgcctt
1441 caagggcccg aacatccacg ccttccacac cgagggggcg ggcggcggcc acgcgccgga
1501 catcatcaag gtggcgggcc tgcccacagt gctgcccagc tccaccaacc cgcgcggcc
1561 gttcacggtg aacacggtg acgagcatct cgacatgctc atggctctgc accacctgtc
1621 gcccgcac cgggaggac tggccttcgc cgaaagccgc atccggcgcg agaccatcgc
1681 ggcggaggac atcctgcacg acctcggcgt cttctcgatg ctgagttcgg acagccaagc
1741 catgggcccg gtccggcagg tcatcatccg cacctggcag accgcgcaca agatgaaggt
1801 gcagcgcggg cgtctggccc aggagctggg cgagaacgac aacttccgcg tcaagcgcta
1861 cgtcgccaaa tacacgatca acccggcgct gtcgcacggc atcgcccattg tcgtcggctc
1921 ggtcgaggtg ggcaagctgg ccgatctggt ggtctggtcg ccggccttct tcggcgtgaa
1981 gccggacatg gtgctgaagg ccgggacat cgcgggcgcg ctgatggcg accccaacgc
2041 ctccatcccg acgcccagc cgggtgatta ccgcccgatg ttcgggcctt accgacgcgc
2101 gatcgagcc agttccctga ctttgcag caagctgtcg ctggagaacg aggcgctcgc
2161 ctgcctcggc ctgcggcgcg aactggctgc ggtgacgggg gtgcgggcca tcggcaagaa
2221 gcagatgatc cacaacgatt ccacacccca catcgaggtc gatccgaaa cctacaggt
2281 gcgcgccgac ggccagctcc tgacctgcga gccggcgac gtgctgcca tggcgcagcg
2341 gtacttctg ttcgga

```



## 4.2 Sequência nucleotídica do jaburetox

```
1 ATGGGTCCAG TTAATGAAGC CAATTGTAAA GCAGCTATGG AGATTGTGTG CAGAAGGGAA
61 TTGGACATA AGGAAGAAGA AGATGCAAGT GAGGGTGTTA CCACAGGAGA CCCTGATTGT
121 CCTTTCACCA AAGCCATTCC TCGTGAAGAA TATGCTAACA AGTATGGTCC GACTATTGGT
181 GACAAAATCC GTCCTGGTGA CACTGATTG ATTGCTGAAA TTGAAAAGGA TTTTGCCCTT
241 TATGGTGATG AAAGTGTTTT TGGAGGTGGA AAAGTTATA
```

## 4.3 Meio de cultura

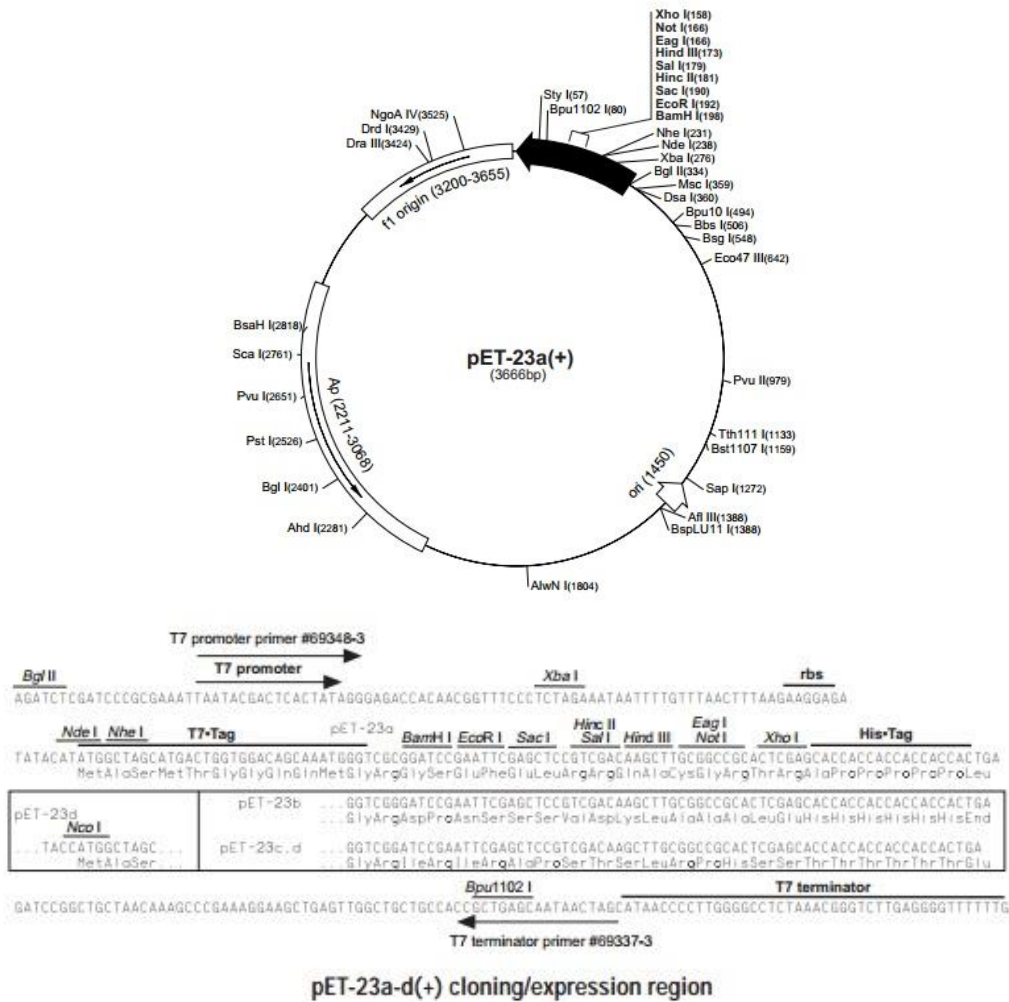
LB para 1 L

10 g Triptona  
10 g NaCl  
5 g de extrato de levedura  
qsp de água. pH 7,5. Autoclavar.

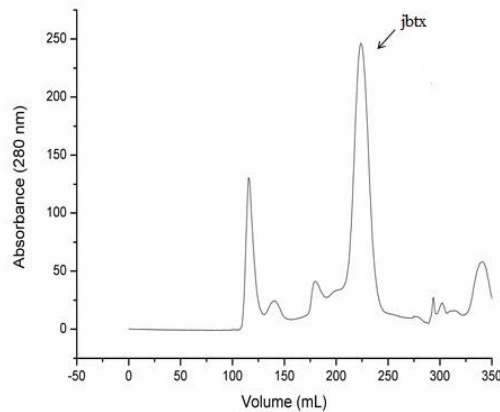
Meio SOC para 100 mL

Triptona 2g  
Extrato de Levedura 0,5g  
NaCl 0,05g  
Após autoclavar os componentes anteriores, adicionar: 1,80 mL Glicose 20% e 1 mL  $MgCl_2$  1M.

#### 4.4 Mapa do vetor de expressão pET-23a



#### 4.5 Perfil cromatográfico da gel filtração do jaburetox



4.6 Alinhamento entre as cadeias de *A. brasilense* FP2 e *H.pylori*

```

1  MNLTPREKDKLLVAMAAMVARRRLERGVKLNHPEAVALITDYVVEGARDGR-IVAEIMRD 59
M LTP+E DKL++ A +A++R E+G+KLN+ EAVALI+ +++E AR G+ T AELM++
1  MKLTPKELDKMLHYAGELAKRKRKEGKIKLNYVEAVALISAHIMEEARAGKKTAAELMQE 60

60  GATVITRDQVMDGIPEMIHEIQVEATFPDGTIKLVTIVHQPI 99
G I++ D VMDG+ MIHE+ +EA FPDGTIKLVTIVH PI
61  GRILLKPDVMDGVASMIHEVGIEAMFPDGTIKLVTIVHTPI 100

3  PGEIIPAAGEIELNAGRDTVELDVANAGDRPIQVGSYHYFAETNGALTFDRETARGFRLD 62
PGE+ +I +N G+ V + V N GDRP+Q+GSH+HF E N L FDRE G RLD
108  PGEFLFKNEDITINEGKKAHSVVKVNVGDRPVQIGSHHFFEVNRCLDFDREKTFGRKRLD 167

63  IPAGTAVRFEPGQTRRRLVAYAGNRVVGIFNGKVN 98
I +GTAVRFEPG+ + V L+ GNR + GFN V+
168  IASGTAVRFEPGEEKSVELIDIGGNRIIFGNALVD 203

4  RIDRAEYAALYGFIVGDRVRLADTDLIVEVEKDHIVYGEVVKFGGGKVIKRDGMGQAQISR 63
+I R EY ++YGPT GD+VRL DTDLI EVE D+I+YGE+KFGGGK +R+GM Q+
3  KISRKEYVSMYGFITGDKVRLGDTDLIAEVEHDYTIYGEELKFGGGKTLREGMSQSNPS 62

64  QGGAVDVTIINALIIDHWGIVKADIGIVGGRIAGIGKAGNPDVQPGV--IIVVGGTIEVI 121
+ +D +ITNALI+D+ GI KADIGI G+IAGIGK GN D+Q GV + VSP TE +
63  KE-ELDLIITNALIVDYTGIVYADIGIKDKIAGIGKGGNKKDMQDGVKRLSVGPAATEAL 121

122  AGEKIVTAGGIDAHIFICPQQVDEALNSGVITMLGGGIGPAGTSAITCIPGPHMAR 181
AGES IVIAGGID HIRFI PQQ+ A SGVITM+GGTIGPA GT+AIT IPG ++
122  AGEGLIVTAGGIDTHIRFISPOQIPTAFASGVITMIGGGIGPADGTNATITIPGRNLKW 181

182  MLQAAEGLPINLGFPGMGNASRPDALLEQIAAGACGMKLEHEDWGTTPAAIDTCLIVAEET 241
ML+AAE +NLGF KGNAS +L +QI AGA G K+HEDWGTTP+AI+ L VA++
182  MLRAAEYSMNLGFLAKGNASNDASLADQIEAGAIGFKIHEDWGTTPSAINHALDVADKY 241

242  DIQVAIHDTLNEAGSFGVENTIAAFKGRNIAFHTEGAGGGHAPDIIKVVAGLWVLPSSIN 301
D+QVAIHDTLNE+G VE+T+AA GR +H FHTEGAGGGHAPDIIKVVAG N+LP+STN
242  DVQVAIHDTLNEAGCVEDTMAAIAGRIMHTFHTEGAGGGHAPDIIKVVAGEHMLPASTN 301

302  PTRPFTVNTVDEHLDMLVCHLSPRIPEDVAFASRIRRETIAAEDILHDLGVFSMLSS 361
PT PFTVNT EH+DMLVCHL I EDV FA+SRIR +TIAAED LHD+G+FS+ SS
302  PTIPFTVNTAEHRMDMLVCHLSDKSIKEDVQFADSRIRPQTIAAEDILHDMGIFSISS 361

362  DSQAMGRVGEVIRIWIQIAHKMKVQRGRLAELGENDNFRVRYVAKYITINPALSNGIAH 421
DSQAMGRVGEVIRIWIQIA K K + GR L EE G+NDNFR+KRY++KYITINFA++HGI+
362  DSQAMGRVGEVIRIWIQTADMKKKEFGRLKKEKGDNDNFRIRKRYLSKYITINPAIANGISE 421

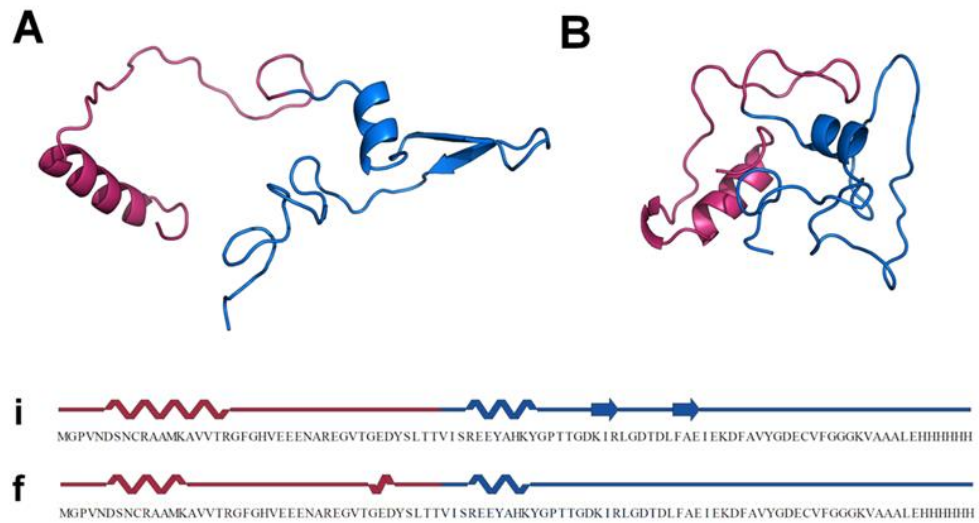
422  VVGSVEVGLADLVVWSPAFFGVKPMVLMAGTIAAALMGDPNASIPTPQPVHYRPMFGA 481
VGSVEVVK+ADLV+WSPAFFGVKPM+M+K G IA + MGD NASIPTPQPV+YR MF
422  VVGSVEVGVADLVVWSPAFFGVKPMIIMGGFIALSQMGDANASIPTPQPVYHYRPMFAH 481

482  YGRAMQASSLIFVSKLSLENEALRSLGLRRELVAVTGVRAIGKQMIHNDSTPHIEVDPE 541
+G+A +++IFVS+ + + LGL R+++ V R I KK M ND+I HIEV+PE
482  HGKARYDANITIFVSAAYDKGIEELGLERQVLPVQRCRNIHKDMQFNDTIAHIEVNPE 541

542  TYEVRADGQLLICEPADVLPMAQRYFLF 569
TY V DG+ +I +PA+ + +AQ + +F
542  TYHVFVDGKEVTSKPANKVSLAQLFSIF 569

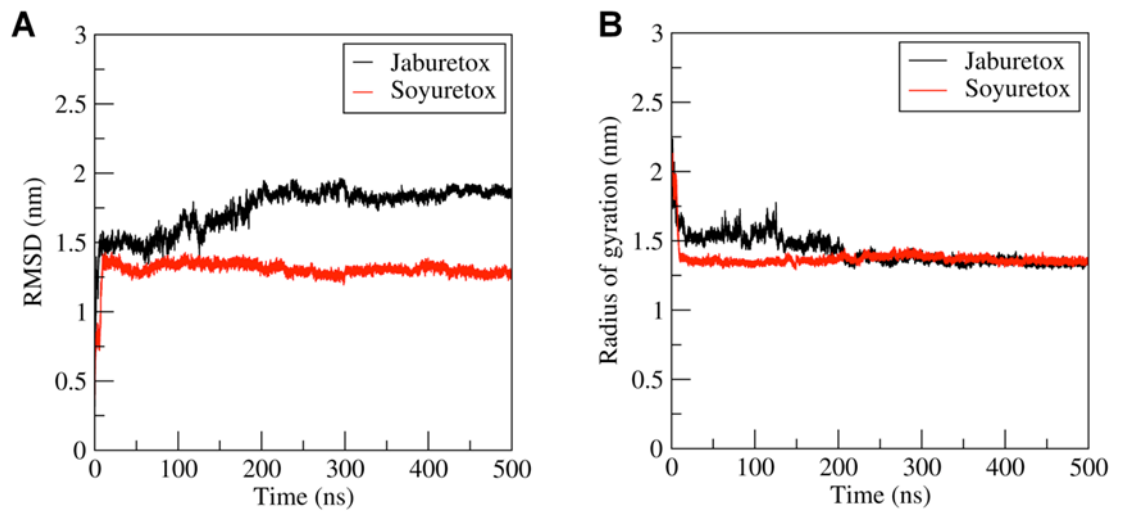
```

## 4.7.1 Estudos de modelagem molecular e simulação



Mudanças conformacionais no soyuretox após simulação de dinâmica molecular (500 ns). Representações tridimensionais do peptídeo soyuretox em seus estados (A) inicial e (B) final, com o domínio N-terminal representado em rosa e o C-terminal em azul; (i) inicial e (f) final, coloridas de acordo com as representações tridimensionais. As sequências de aminoácidos também são mostradas.

#### 4.7.2 Análise conformacionais do soyuretox



Alterações conformacionais do soyuretox em solução aquosa ao longo do tempo. (A) Desvio médio quadrático (RMSD) e (B) raio de giro dos peptídeos soyuretox (linha vermelha) e jbtx (linha preta, extraído de MARTINELLI *et al.*, 2014).

## Karine Kappaun

Curriculum Vitae

---

### Dados pessoais

**Nome** Karine Kappaun  
**Nascimento** 03/03/1986 - Santa Cruz do Sul/RS - Brasil

---

### Formação acadêmica/titulação

**2006 - 2011** Graduação em Farmácia.  
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
 Título: Estudos com o Jaburetox: efeito tóxico de *E. coli* liofilizadas carregadas com o peptídeo e análise da influencia do epitopo V5 na formação de agregados  
 Orientador: Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini  
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

---

### Atuação profissional

#### 1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

##### Vínculo institucional

**2012 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestrado, Regime: Dedicção exclusiva  
**2007 - 2012** Vínculo: bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. MARTINELLI, ANNE H.S., **KAPPAUN, KARINE**, LIGABUE-BRAUN, RODRIGO, DEFFERRARI, MARINA S., PIOVESAN, ANGELA R., STANISÇUASKI, FERNANDA, DEMARTINI, DIOGO R., DAL BELO, CHARISTON A., ALMEIDA, CARLOS G.M., FOLLMER, CRISTIAN, VERLI, HUGO, CARLINI, CELIA R., PASQUALI, GIANCARLO  
 Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Biochimica et Biophysica Acta. G, General Subjects (Print)*. , v.1840, p.935 - 944, 2014.

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. LOPES, F. C., MARTINELLI, A. H. S., POSTAL, M., KAPPAUN, K., TICHOTA, D. M., Pasquali, G., BRANDELLI, A., Carlini, C.R.  
 Atividade fungitóxica de Urease Ubiqua de soja (*Glycine max*) recombinante In: XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduacao em Biologia Celular e Molecular, 2012, Porto Alegre, RS.  
**XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduacao em Biologia Celular e Molecular.** , 2012.

2. KAPPAUN, K., MABONI, F., SCHRANK, I. S., Carlini, C.R.  
Clonagem e expressão heteróloga da urease da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* FP2 In: XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012, Porto Alegre, RS.  
**XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.** , 2012.
3. MARTINELLI, A. H. S., KAPPAUN, K., POSTAL, M., PIOVESAN, A. R., Pasquali, G., Carlini, C.R.  
Jaburetox-2Ec, peptídeo recombinante derivado da urease: estudo de mutagênese sítio-dirigida In: XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012, Porto Alegre, RS.  
**XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.** , 2012.
4. KAPPAUN, K., MARTINELLI, A. H. S., Pasquali, G., Carlini, C.R.  
Estudo da estabilidade dos peptídeos derivados da urease de *Canavalia ensiformis*: Jaburetox-2Ec e Jaburetox-V5 In: XXIII Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2011, Porto Alegre, RS.  
**XXIII Salão de Iniciação Científica UFRGS.** , 2011.
5. MARTINELLI, A. H. S., KAPPAUN, K., Becker-Ritt, A.B., Pasquali, G., Carlini, C.R.  
Jaburetox-2Ec, peptídeo recombinante derivado da urease: estudo de mutagênese sítio-dirigida In: XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011, Porto Alegre, RS.  
**XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.** , 2011.
6. KAPPAUN, K., MARTINELLI, A. H. S., Pasquali, G., Carlini, C.R.  
Estudos biológicos de peptídeos derivados a urease de *Canavalia ensiformes* In: XXII Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2010, Porto Alegre, RS.  
**XXII Salão de Iniciação Científica UFRGS.** , 2010.
7. MARTINELLI, A. H. S., KAPPAUN, K., Becker-Ritt, A.B., Pasquali, G., Carlini, C.R.  
Urease-Derived insecticidal peptide: Site-directed mutagenesis studies In: XII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2010, Porto Alegre, RS.  
**XII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.** , 2010.
8. Becker-Ritt, A.B., MARTINELLI, A. H. S., KAPPAUN, K., Carlini, C.R.  
Fungitoxic and/or fungistatic properties of ureases. In: XVI World Congress of the International Society on Toxinology X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2009, Recife.  
**CD Resumos do evento.** , 2009.
9. Martinelli, A.H.S, KAPPAUN, K., Mulinari, F, Stanisçuaski, F., Becker-Ritt, A.B., Bertholdo-Vargas, L.R, Pasquali, G., Carlini, C.R.  
Jaburetox-2EC, a Recombinant Urease-Derived Insecticidal Peptide: Site-Directed Mutagenesis Studies. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia, SP.. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia, SP.  
**Livro de resumos da XXXVIII Reunião Anual da SBBq.** , 2009.
10. Martinelli, A.H.S, Mulinari, F, Stanisçuaski, F., KAPPAUN, K., Becker-Ritt, A.B., Pasquali, G., Carlini, C.R.  
Jaburetox-2Ec: Entomotoxic properties of a urease-derived peptide In: XVI World Congress of the International Society on Toxinology, 2009, Recife.  
**Livro de Resumos.** , 2009.
11. KAPPAUN, K., Martinelli, A.H.S, Becker-Ritt, A.B., Pasquali, G., Carlini, C.R.  
Jaburetox-2Ec, peptídeo recombinante derivado da urease: estudos de mutagênese sítio-dirigida In: XXI Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2009, Porto Alegre, RS.  
**CD Resumos do evento.** , 2009.
12. KAPPAUN, K., Martinelli, A.H.S, Becker-Ritt, A.B., Pasquali, G., Carlini, C.R.

Ubiquitous Urease: Expression, Purification and Biological Properties. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia, SP.

**Livro de resumos da XXXVIII Reunião Anual da SBBq.** , 2009.

13. KAPPAUN, K., MARTINELLI, A. H. S., Becker-Ritt, A.B., Pasquali, G., Carlini, C.R.  
Expressão de urease ubíqua de soja em Escherichia coli In: XX Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2008, Porto Alegre.

**Livro de Resumos.** , 2008.

14. KAPPAUN, K., MARTINELLI, A. H. S., Becker-Ritt, A.B., Pasquali, G., Carlini, C.R.  
Expressão de urease ubíqua de soja em Escherichia coli In: Reunião anual do PPGBCM, 2008, Porto Alegre.

**Livro de Resumos.** , 2008.

15. Martinelli, A.H.S, Becker-Ritt, A.B., KAPPAUN, K., Pasquali, G., Carlini, C.R.  
Expression of soybean ubiquitous urease in Escherichia coli In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular,, 2008, Águas de Lindóia.

**Livro de resumos.** , 2008.

16. MARTINELLI, A. H. S., Becker-Ritt, A.B., KAPPAUN, K., Polacco, J.C, Pasquali, G., Carlini, C.R.  
Peptídeo tóxico de ureases vegetais: caracterização de suas propriedades por mutagênese sítio dirigida In: Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2008, Porto Alegre.

**Livro de resumos.** , 2008.