

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

ASPECTOS BIOLÓGICOS E ESTRUTURAIS DAS UREASES DE  
*Canavalia ensiformis*.

Rafael Real Guerra

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

Orientadora: Dra. Célia Regina R. S. Carlini

Porto Alegre – RS

Abril - 2007

## **Membros da Banca Examinadora**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Leila Maria Beltramini

Depto. de Física e informática, Instituto de Física de São Carlos – USP São Carlos

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Lucia Bianconi

Depto. de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas – UFRJ

Dr. Daniel Macedo Lorenzini (revisor)

Depto. Biotecnologia, Instituto de Biociências – UFRGS

## **Agradecimentos**

À minha família pelo apoio incondicional que me permitiu chegar até aqui.

Ao Dr. João Alexandre R. G. Barbosa, por todos os ensinamentos sobre cristalografia de raios X, e por sempre conseguir encaixar meu nome em algum horário em que a linha estivesse disponível.

À Dra. Leila Beltramini, pela disponibilidade e atenção com o que me recebeu em seu laboratório durante o período em que estive na USP São Carlos.

Aos amigos do Laboratório de Proteínas Tóxicas, não só pela ajuda experimental, como pelas festas e boas risadas na cozinha.

À minha namorada Fernanda, por me ajudar sempre, tornando tudo mais fácil mesmo à distância.

À minha orientadora Célia Carlini, pelos ensinamentos, pelas oportunidades e principalmente por me dar a chance de começar.

Às agencias financiadoras CNPq, Capes, FINEP, FAPERGS.

# ÍNDICE

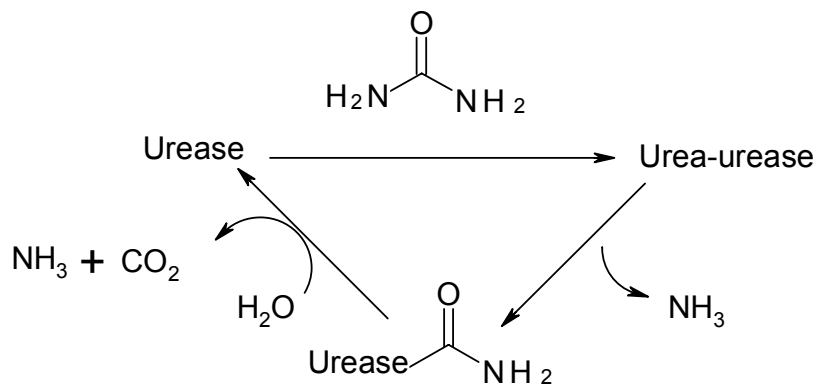
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	6
1.1 Ureases	6
1.2 Aspectos estruturais da urease de <i>Canavalia ensiformes</i>	7
1.3 Função das ureases em plantas	12
1.4 A Canatoxina	14
1.5 Modificação química de proteínas	16
<b>2. OBJETIVOS</b>	20
<b>3. METODOLOGIA</b>	22
Determinação do conteúdo de proteína	22
Medida da atividade ureásica	22
Purificação da canatoxina e urease de <i>C. ensiformis</i>	22
Atividade inseticida	24
Modificação química de grupos carboxílicos	24
Modificação de resíduos de lisina	24
Hidrólise <i>in vitro</i> de JBU	26
Western-blot	27
Medidas de dicroísmo circular	27
Medidas de afinidade por ressonância plasmônica de superfície	28

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	29
<b>4.1 Parte I: modificação química de aminoácidos</b>	29
4.1.1 Modificação de grupos carboxílicos	30
4.1.2 Modificação química de resíduos de lisina	32
4.1.3 Atividade enzimática	33
4.1.4 Atividade inseticida	35
4.1.5 Hidrólise <i>in vitro</i> da JBU com enzimas de <i>D. peruvianus</i>	37
<b>4.2 Parte II: Caracterização estrutural de JBU e Canatoxina e afinidade diferencial por gangliosídeos</b>	41
4.2.1 Dicroísmo circular	43
4.2.2 Afinidade por gangliosídeos	49
<b>6. CONCLUSÕES</b>	61
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	63
<b>8. ANEXO</b>	68

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Ureases

Ureases (uréia aminohidrolase; EC 3.5.1.5) são enzimas níquel dependentes (Dixon *et al.*, 1975), que catalisam a hidrólise da uréia a amônia e carbamato, o qual espontaneamente se decompõe para formar dióxido de carbono e uma segunda molécula de amônia, como mostrado na representação do ciclo catalítico (figura 1).



**Figura 1:** Reação de hidrólise da uréia, catalisada pela urease (adaptado de Bennett & Wren, 1977).

Summer (1931) foi o primeiro a demonstrar a formação do carbamato entre os produtos da hidrólise da uréia catalisada pela urease (Summer, 1953), e vários trabalhos posteriores estabeleceram que este é o primeiro intermediário livre na reação de hidrólise da uréia (Wang *et al.*, 1955; Jenks, 1963; Blakeley, 1969).

## 1.2 Aspectos estruturais da urease de *Canavalia ensiformis*

Passados 81 anos desde seu isolamento e cristalização, e mesmo após seu completo sequenciamento, muitas questões permanecem em aberto a respeito da estrutura da urease de *Canavalia ensiformis*. Ainda se especula sobre a forma nativa da enzima em solução e a relação da forma oligomérica da proteína com a atividade ureolítica. No entanto não há um consenso sobre esse tema, e em grande parte, isso é devido à existência de uma série de isoenzimas com diferentes comportamentos catalíticos, cuja origem não se sabe ser genética, conformacional ou polimérica.

Em um estudo recente do grupo foi utilizado *Dynamic Light Scattering* (DLS) e *Static Light Scattering* (SLS) para investigar a influência da concentração de proteína, tampões, e agentes redutores sobre o comportamento da urease majoritária de *Canavalia ensiformis* em solução (Follmer, *et al.*, 2004 a). Nesse estudo, observou-se que a proteína pode assumir diferentes estados poliméricos de acordo com sua concentração e a composição do meio em que se encontra. Esses dados representam bem a complexidade dessa molécula, além de apresentar uma possível explicação para a grande discordância encontrada na literatura sobre a forma da proteína em solução (Sumner & Eriksson-Quensel, 1938; Gorin *et al.*, 1967; Bailey & Boulter, 1969; Reithel, 1971; Dixon *et al.*, 1980; Takishima *et al.*, 1988).

De fato, as informações mais consistentes sobre a forma molecular da urease surgiram após a obtenção da seqüência de aminoácidos desta enzima, tanto por sequenciamento direto (Mamiya *et al.*, 1985), como por dedução a partir do cDNA (Figura 2; Riddles *et al.*, 1991). Com base nessas informações, foi possível mostrar que a unidade básica desta enzima é uma cadeia polipeptídica

única com 840 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 90.770 Da. A forma mínima dessa enzima expressando atividade enzimática é de um trímero de 270 kDa, e a conformação mais amplamente aceita na comunidade científica para sua forma nativa é de um hexâmero de 540 kDa (Zerner, 1991). A urease de *Canavalia ensiformis* apresenta em seu sítio ativo dois íons  $\text{Ni}^{2+}$ , sendo cada um deles coordenado por dois resíduos de histidinas, e mais uma lisina carbamilada, compartilhada por ambos. Há também um importante resíduo de cisteína nas proximidades do sítio ativo, cuja participação na reação de hidrólise da uréia é discutível (Zerner, 1991; Jabri *et al.* 1995).

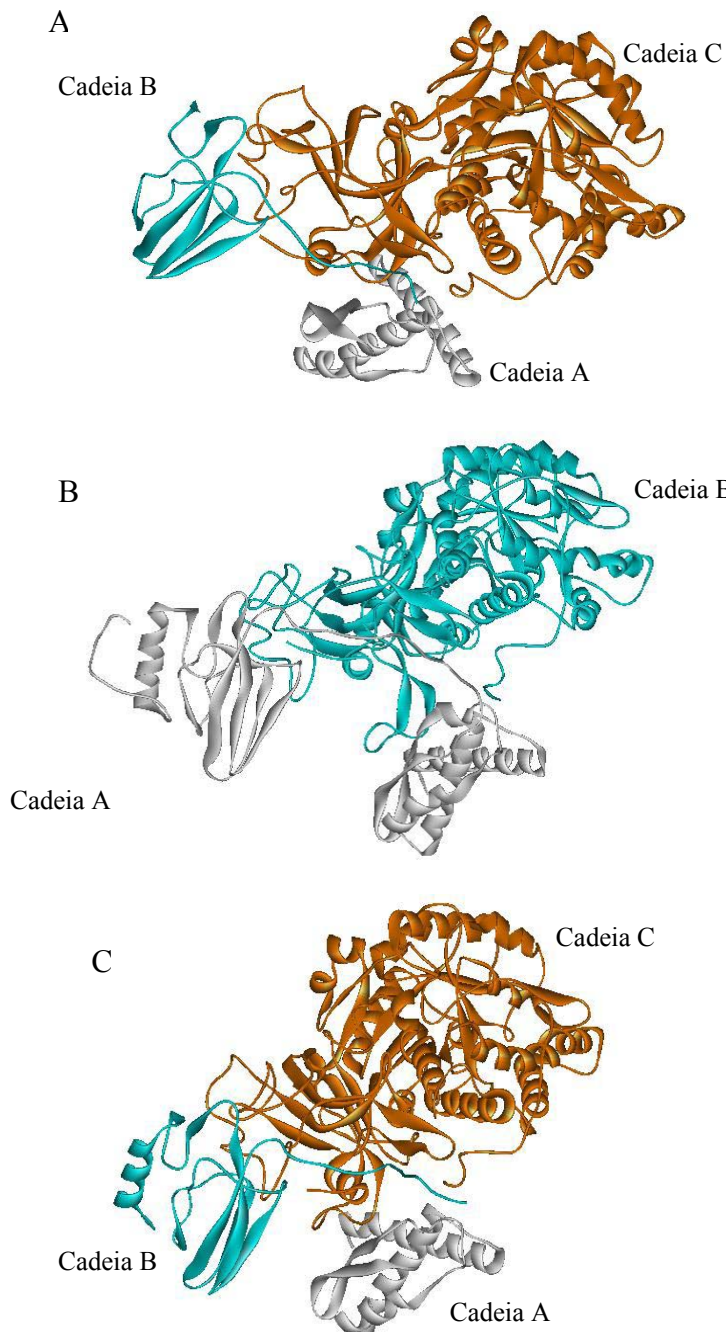
Ureases estão amplamente distribuídas entre fungos, bactérias e plantas. O motivo estrutural envolvido no mecanismo de catálise destas enzimas parece ser bem conservado, principalmente no que diz respeito às histidinas que complexam o níquel, que é crítico para a atividade enzimática.

Até hoje apenas três ureases tiveram suas estruturas tridimensionais elucidadas, todas de origem bacteriana. São elas as ureases de *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus pasteurii* e *Helicobacter pylori* (figura 3). O fato da não existência de estruturas resolvidas, por técnicas experimentais (cristalografia de raios X, Ressonância magnética nuclear, etc), para as ureases vegetais, deve-se, em grande parte, a indisponibilidade de grandes quantidades dessas proteínas com um bom grau de pureza, o que, em contrapartida foi obtido para essas ureases microbianas pela expressão heteróloga por técnicas de DNA recombinante.



001	MKLSPREVEK	LGLHNAGYLA	QKRLARGVRL	NYTEAVALIA	SQIMEYARDG
051	EKTVAQLMCL	GQHLLGRRQV	LPVAVPHLLNA	VQVEATFPDG	TKLVTVHDPI
101	SRENGELQEA	LFGSLLPVPS	LDKFAETKED	NRIPGEILCE	DECLTLNIGR
151	KAVILKVTSK	GDRPIQVGSH	YHFIEVNPYL	TFDRRKAYGM	RLNIAAGTAV
201	RFEPGDCKSV	TLVSIIEGNKV	IRGGNAIADG	PVNETNLEAA	MHAVRSKGFQ
251	HEEEKDASEG	FTKEDPNCPF	NTFIHRKEYA	NKYGPTTGDK	IRLGDITNLLA
301	EIEKDYALYG	DECVFSGGKQ	IRDGMGQSCG	HPPAISLDTV	ITNAVIDDYT
351	GIIKADIGIK	DGLIASIGKA	GNPDIMNGVF	SNMIIGANTE	VIAGEGLIVT
401	AGAI <del>D</del> <b>HVHY</b>	ICPQLVYEAI	SSGITTLLVGG	GTGPAAGTRA	TTCTPSPTQM
451	RLMLQSTDYL	PLNFGFTGKG	SSSKPDELHE	I <b>I</b> KAGAM <b>GLK</b>	LHEDWGSTPA
501	AIDNCLTIAE	HHDIQINI <b>HT</b>	DTLNEAGFVE	HSIAAFKGR <b>T</b>	I <b>HTYH</b> SEGAG <b>Ni-Ni</b>
551	GGHAPDIIKV	CGIKNVLPS <b>S</b>	TNPT <b>R</b> PLTSN	TIDEHL <b>D</b> MLM	VCHHL <b>D</b> REIP *
601	EDLAF <b>A</b> HSRI	R <b>K</b> KTIA <b>A</b> EDV	LNDIG <b>A</b> ISII	SS <b>D</b> SQAMGRV	GEV <b>I</b> SRTW <b>Q</b> T
651	ADPMKA <b>Q</b> TGP	LKCDSSDND <b>N</b>	FRIRRY <b>I</b> AKY	TINPA <b>I</b> ANGF	SQYVGSVE <b>V</b> G
701	KLADLVMW <b>K</b> P	SFFG <b>T</b> KPE <b>M</b> V	IKGGM <b>V</b> AWAD	IGDP <b>N</b> AS <b>I</b> PT	PEPV <b>K</b> MR <b>P</b> MY
751	GTLG <b>K</b> AGGAL	SIAFV <b>S</b> KAAL	DQ <b>R</b> VNVLYGL	NKR <b>V</b> EAVSNV	RKL <b>T</b> KL <b>D</b> M <b>K</b> L
801	NDALPEIT <b>V</b> D	PESY <b>T</b> VKA <b>D</b> E	KLLC <b>V</b> SE <b>A</b> TT	VPLSR <b>D</b> Y <b>F</b> LP	

**Figura 2.** Seqüência de aminoácidos da urease da *Canavalia ensiformis* (deduzida a partir do cDNA, gdb: M65260). Os resíduos de histidinas (assinalados em vermelho), ácido aspártico e a lisina carbamilada (ambos apresentados em azul), complexam os dois átomos de níquel (em verde) do sítio catalítico. O resíduo de cisteína 592, cuja participação na reação de clivagem da uréia é discutível, está indicado por um asterisco.



**Figura 3.** Estrutura de ureases microbianas determinadas por cristalografia de difração de raios X.

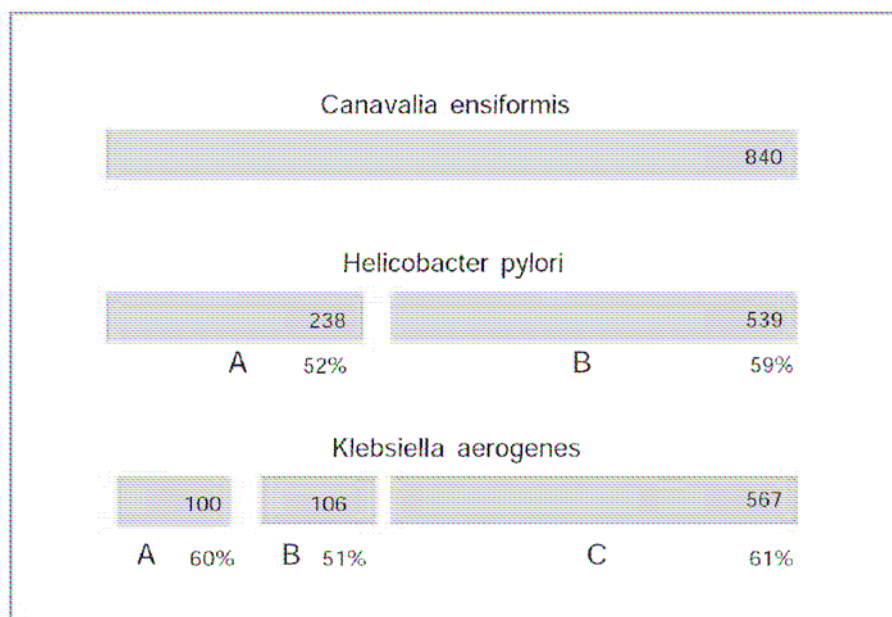
A. Estrutura da urease de *Klebsiella aerogenes*, formada por três cadeias distintas: cadeia A, cadeia B e a cadeia C. Acesso PDB: 1FWJ.

B. Estrutura da urease de *Helicobacter pylori*, formada por duas cadeias, cadeia A e cadeia B. Acesso PDB: 1E9Z.

C. Estrutura da urease de *Bacillus pasteurii*, formada por três cadeias distintas: cadeia A, cadeia B e cadeia C. Acesso PDB: 2UBP.

Em um estudo comparativo da estrutura secundária das ureases microbianas de *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus pasteurii* e *Helicobacter pylori*, observa-se um alto grau de conservação, tanto em termos de número de estados de estrutura secundária (número de  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ ) como na quantidade de

resíduos envolvidos nestes estados (percentagem de  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ ). Apesar da grande semelhança entre a urease de *Canavalia ensiformis* e as ureases microbianas até então conhecidas (que apresentam cerca de 50% de identidade de seqüência quando comparadas à urease de *Canavalia ensiformis*, figura 4), uma importante diferença estrutural está no fato da urease de *Canavalia ensiformis* ser constituída de apenas uma cadeia, enquanto as urease microbianas são formadas por duas ou três cadeias.



**Figura 4:** Comparação esquemática das subunidades estruturais das ureases de diferentes organismos. O número de aminoácidos que compõe cada cadeia está indicado (dentro das barras). Os valores percentuais representam a identidade de seqüência das cadeias com suas regiões correspondentes na seqüência da urease de *C. ensiformis* (retirada de Olivera-Severo *et al.*, 2006).

### 1.3 Função das ureases em plantas

A existência de ureases em tecidos vegetais é bastante comum, sendo as leguminosas particularmente ricas nessas proteínas (Polacco & Holland, 1993), entre as quais se destaca a soja (*Glycine max*). As ureases também são abundantes entre as bactérias, no entanto, nesses organismos, parecem exercer uma função diferente das ureases vegetais. Entre as funções atribuídas às ureases bacterianas estão a contribuição para o metabolismo de compostos nitrogenados, sendo também, importantes na patogenicidade causada por alguns destes organismos, principalmente por permitir sua sobrevivência em ambientes de pH desfavorável (Olivera-Severo *et al.*, 2006).

Com relação às ureases vegetais, apesar de sua ampla distribuição entre as plantas, pouco se conhece sobre sua função fisiológica. Postula-se que em plantas superiores a urease esteja envolvida no aproveitamento de nitrogênio a partir da uréia proveniente de algumas rotas metabólicas (ureídeos, purinas e arginina), e que isto seja possível apenas pela ação de ureases. Em plantas, desprovidas de urease, seja induzidas geneticamente (Meyer-Bothling *et al.*, 1989; Polacco *et al.*, 1989), com o uso de inibidores de urease, ou por remoção do níquel do meio (Polacco & Holland, 1993), observa-se um acúmulo de uréia em folhas e raízes e/ou um comprometimento do emprego de uréia como fonte de nitrogênio por parte da planta.

O que desperta muita curiosidade em relação ao estudo da função das ureases nas plantas é o fato da uréia não ser um metabólito majoritário nos vegetais onde esta enzima é abundantemente encontrada (Polacco & Holland, 1993). Porém, é importante ressaltar que uréia não é o único substrato para as ureases (Bennett & Wren, 1977).

A descoberta de duas isoformas de urease em soja (*Glycine max*) levantou uma série de ponderações a cerca da função destas enzimas em plantas. Uma dessas isoformas, denominada urease embrião-específica, é sintetizada somente durante o desenvolvimento do embrião na semente em formação, acumulando-se na semente madura (Torisky & Polacco, 1990). Já a outra isoforma, denominada urease ubíqua, está presente em todos os tecidos da planta, como folhas, embriões, raízes e sementes (Polacco & Winkler, 1984). A urease embrião-específica é cerca de 1000 vezes mais abundante na semente de soja do que a urease ubíqua (Torisky & Polacco, 1990).

Estudos demonstraram que a urease ubíqua possui um papel na reciclagem de derivados de uréia, uma vez que mutantes com silenciamento do gene dessa urease apresentam anormalidades características do acúmulo de uréia, como necroses nas extremidades das folhas e raízes, acúmulo de uréia nas folhas e sementes, e retardo na germinação (Polacco & Holland, 1993). Por outro lado, o mesmo estudo realizado para a urease embrião-específica não constatou qualquer mudança no fenótipo da planta, ou aumento dos níveis de uréia nas sementes, quando comparada à espécie selvagem.

Em culturas de cotilédones de ervilha e de soja mostrou-se que as ureases desempenham pouca ou nenhuma função na nutrição do embrião, visto que a uréia comporta-se como uma fonte extremamente pobre de nitrogênio (Polacco & Holland, 1993). Neste contexto, uma questão pertinente pode ser feita: por que o embrião de soja “investiria” energia em uma enzima cuja atividade não é importante para a planta naquele tecido? Estes dados sugerem que esta urease esteja envolvida em algum outro tipo de função, possivelmente na defesa da planta (Polacco & Holland, 1993). A descoberta de que a Canatoxina, uma

proteína presente na semente de *Canavalia ensiformis*, que apresenta atividade tóxica para mamíferos e insetos, é uma isoforma de urease (Follmer *et al.*, 2001), reforçou a hipótese de que as ureases estariam envolvidas no sistema de defesa das plantas.

#### **1.4 A Canatoxina**

A semente de *Canavalia ensiformis* é fonte de várias proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico, como a urease, a lectina concanavalina A, inibidores de tripsina e a canatoxina (Carlini & Guimarães, 1981).

A canatoxina, primeiramente descoberta como uma proteína tóxica de *C. ensiformis* distinta da lectina concanavalina A (Carlini & Guimarães, 1981), foi mais tarde identificada como uma isoforma de urease (Follmer *et al.* 2001). Vários peptídeos internos da canatoxina já foram seqüenciados sendo que todos eles revelaram um alto grau de similaridade e identidade com a seqüência primária da urease de *Canavalia ensiformis*. Também a composição percentual de aminoácidos é indicativa de uma grande semelhança das duas proteínas (Follmer *et al.*, 2001). Estruturalmente sabe-se que a principal forma ativa da canatoxina apresenta um peso molecular de 184 kDa quando analisada em gel-filtração em pH 7,5. Em SDS-PAGE, em meio redutor ou não, seu peso molecular é de ca. 95 kDa, sugerindo que a forma nativa da canatoxina é provavelmente um dímero, contrastando com a urease que é um hexâmero. A canatoxina é uma metaloproteína contendo zinco e níquel (Barcellos, 1992; Follmer *et al.*, 2001; 2002).

Quando injetada por via intraperitoneal, é letal, com uma  $DL_{50}$  de 2mg/kg, sendo inócua (em doses até 10 vezes maiores do que a  $LD_{50}$ ) quando administrada via oral nesses animais (Carlini *et al.*, 1984; Carlini & Guimarães, 1991). Nesses animais, a morte induzida pela canatoxina é caracteristicamente acompanhada por convulsões, e o sistema nervoso central foi identificado como um dos órgãos alvo da toxina. Essa proteína também possui a característica de interagir com outros tipos celulares como plaquetas, ilhotas pancreáticas, neutrófilos, mastócitos, etc (Carlini *et al.*, 1985; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991a e 1991b).

A Canatoxina também apresenta potente atividade inseticida (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-da Silva *et al.*, 2000; Carlini & Grossi-de-Sá, 2002), que está relacionada com a clivagem da proteína por enzimas digestivas dos insetos, gerando um peptídeo de 10 kDa que é o agente responsável por essa atividade. Isso agrega a essa proteína, uma grande potencialidade para o desenvolvimento de biopesticidas, ou plantas transgênicas resistentes a insetos que são pragas agrícolas, através da expressão dessa proteína ou do próprio peptídeo. Recentemente um peptídeo recombinante equivalente a esse foi expresso em *Escherichia coli* acoplado a um epítipo v5 e cauda de histidina, peptídeo este denominado Jaburetox-2Ec (Mulinari, 2004). Proteínas tóxicas, supostamente homólogas à canatoxina já foram encontradas em várias outras leguminosas, dentre as quais, a soja (*Glycine max*) (Carlini *et al.*, 1988; Vasconcelos *et al.*, 1994).

Apesar desse conhecimento, a forma de interação da canatoxina com as células alvo ainda precisa ser esclarecida. Um fator importante a ser considerado é o fato de a canatoxina comportar-se como uma lectina monovalente, ou

hemilectina. Diferentemente de outras hemilectinas de origem vegetal, como ricina e abrina, que ligam hexoses simples (com a D-galactose), a canatoxina interage com glicoconjugados mais complexos, como sialoproteínas e gangliosídeos (Follmer *et al.*, 2001), e nesse aspecto acaba se assemelhando mais a neurotoxinas bacterianas como é o caso das toxinas tetânica e botulínicas. Essa característica de hemilectina provavelmente “direciona” a proteína para a superfície de células enriquecidas neste tipo de glicolípido, explicando sua especificidade por tecidos nervosos.

A canatoxina e a urease de *C. ensiformis* compartilham algumas atividades biológicas além da atividade enzimática. Sabe-se que tanto as atividades características da canatoxina (toxicidade intraperitoneal em ratos e camundongos), bem como outras atividades compartilhadas pela canatoxina e pela urease de *C. ensiformis* (caráter de hemilectina, capacidade de promover agregação em plaquetas, e atividade inseticida) são completamente independentes da atividade enzimática (Follmer *et al.*, 2001; Follmer *et al.*, 2004b). Isso indica a existência de domínios protéicos independentes responsáveis por diferentes atividades dessas moléculas.

### **1.5 Modificação química de proteínas**

O advento de técnicas como a mutagênese sítio-dirigida e outras técnicas de biologia molecular tem sido de grande valor para estudos de química de proteínas. Apesar desses grandes avanços na tecnologia, a modificação química de proteínas continua a ser de enorme utilidade no estudo de proteínas. A modificação química é um recurso amplamente utilizado em enzimologia, que



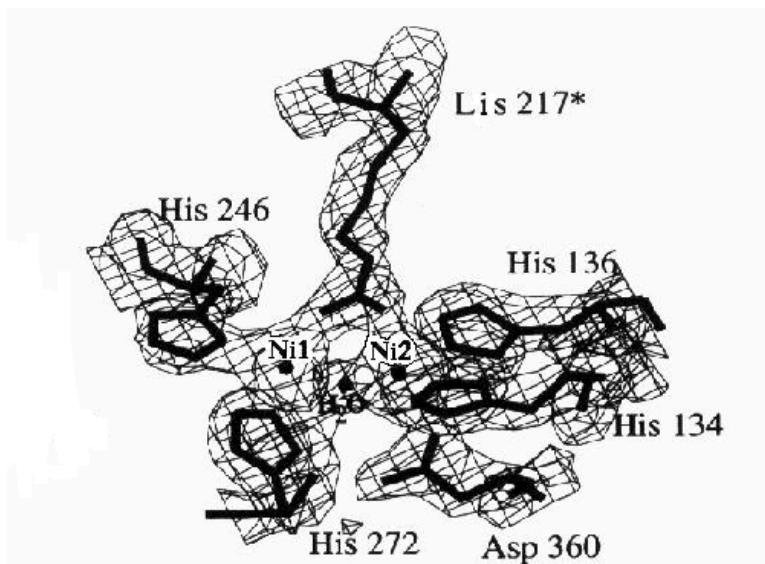
pode fornecer informações importantes a respeito da estrutura e funcionamento das enzimas. Derivados quimicamente alterados de proteínas são utilizados na determinação de seqüência de aminoácidos, para comprovar propriedades conformacionais de proteínas em solução, e identificação de resíduos de aminoácidos envolvidos nas reações catalíticas de enzimas. Métodos para modificação química específica de diferentes aminoácidos estão disponíveis (Glazer, 1976; Lundblad, 2005) e novos procedimentos continuam a ser desenvolvidos e aplicados a diversas proteínas.

Alguns trabalhos de modificação química de aminoácidos específicos já foram realizados para ureases a fim de identificar resíduos importantes para o sítio ativo dessas enzimas. Os reagentes p-hidroximercuribenzoato (p-OHMB) (Riddles *et al.*, 1983), e 1,4- benzoquinona (p-BQ) (Zaborska *et al.*; 2002) inibem totalmente a atividade enzimática da urease de *C. ensiformis*, ao ligar-se a uma cisteína nas proximidades de seu sítio ativo (impedindo assim o acesso da uréia ao sítio de substrato), abolindo também a atividade ureásica da canatoxina. Foi através dessas modificações que se descobriu que as demais atividades biológicas da canatoxina e da urease de *C. ensiformis* são independentes da atividade enzimática (Follmer *et al.*, 2001, 2004b).

Como já foi mencionado anteriormente, a estrutura das ureases é bastante conservada, principalmente no que se refere aos aminoácidos que compõe o sítio ativo da enzima (figuras 5 e 6). A grande homologia entre as ureases nos permite utilizar as estruturas 3D já determinadas para três ureases microbianas, como modelos para as de outros organismos.

DCH <sub>407</sub> VHYI...GLK <sub>490</sub> IH...NIH <sub>519</sub> TD...TYH <sub>545</sub> SE...MVCHHLDR ... TID <sub>633</sub> SQ	<i>Canavalia ensiformis</i>
DCH <sub>405</sub> VHYI...GLK <sub>488</sub> LH...NIH <sub>517</sub> TD...TYH <sub>543</sub> SE...MVCHHLDR...SSD <sub>331</sub> SQ	<i>Glycine max</i>
DAH <sub>136</sub> I H FI...GLK <sub>219</sub> LH...AIH <sub>248</sub> TD...TYH <sub>274</sub> TE... MVCHHLDR ... SSD <sub>362</sub> SQ	<i>Bacillus sp.</i>
DCH <sub>136</sub> VHYI...GLK <sub>219</sub> LH...AIH <sub>248</sub> SD...SFH <sub>274</sub> VE... MVCHHLKR ... TID <sub>362</sub> AL	<i>Bacillus pasteurii</i>
DTH <sub>137</sub> I H FI... GLK <sub>220</sub> LH...AIH <sub>249</sub> TD...TYH <sub>275</sub> IE... MVCHHLDR ... SSD <sub>363</sub> SQ	<i>Bacillus subtilis</i>
DTH <sub>134</sub> I H FI... GLK <sub>217</sub> IH...AIH <sub>246</sub> SD... VFH <sub>272</sub> TE... MVCHHLDR ... SSD <sub>360</sub> SQ	<i>Proteus vulgaris</i>
DTH <sub>136</sub> I H FI... GFK <sub>219</sub> IH...AIH <sub>248</sub> TD... TFH <sub>274</sub> TE... MVCHHLDR ... SSD <sub>362</sub> SQ	<i>Helicobacter pylori</i>
DCH <sub>141</sub> VHLI...GFK <sub>224</sub> LH...ALH <sub>253</sub> SD...AYH <sub>279</sub> TE... MVCHHLNR ... GSD <sub>367</sub> SQ	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DTH <sub>133</sub> I HWI...GLK <sub>216</sub> IH... ALH <sub>245</sub> SD...TFH <sub>271</sub> TE... MVCHHLDR ... SSD <sub>359</sub> SQ	<i>Klebsiella aerogenes</i>

**Figura 5:** Alinhamento da seqüência de aminoácidos das regiões que participam diretamente do sítio catalítico, ou estão próximas a este, nas ureases de *C. ensiformis*, de *Glycine max* e ureases bacterianas. Em vermelho estão assinalados os resíduos críticos para a formação do sítio ativo. A região em azul está próxima do sítio catalítico da enzima, mas não participa da reação de catálise.



**Figura 6:** Representação espacial do sítio catalítico da urease de *Klebsiella aerogenes* (adaptado de Jabri *et al.*, 1995).

Grupos carboxílicos são importantes para a atividade de inúmeras enzimas, como por exemplo, as aspártico-proteases. Nas ureases de *Canavalia ensiformis*, a modificação desses grupos é de particular interesse devido à existência de dois resíduos ácidos que compõe o sítio ativo, Asp 633 (que participa diretamente do sítio catalítico) e Asp 596 (que se encontra nas proximidades do sítio). Ainda existe o fato de que um resíduo com características ácidas, que se supõe participar da reação de hidrólise da uréia, ainda não foi identificado (Mobley & Hausinger, 1989).

Sabe-se ainda que resíduos de lisinas são muito importantes para a atividade de diversas toxinas protéicas, como é o caso das toxinas de escorpião dos tipos  $\alpha$  e  $\beta$  de diferentes espécies, em que a atividade biológica diminui drasticamente após a modificação química destes resíduos (Sampieri & Habersetzer-Rochat, 1978; Darbon *et al.*, 1983; Hassani *et al.*, 1999). Estudos anteriores do grupo mostraram que a modificação química de resíduos de lisina da urease de *C. ensiformes* exerce um efeito protetor da atividade enzimática, possivelmente por impedir que a enzima forme agregados a partir da interação da proteína com alguns íons metálicos, como é o caso do  $\text{Cu}^{2+}$  (Follmer & Carlini, 2005).

## 2. Objetivos

As ureases de origem vegetal são proteínas extremamente complexas que apresentam diversas atividades não relacionadas entre si, entre as quais destaca-se a atividade inseticida. A ausência de estrutura tridimensional para ureases vegetais torna difícil a compreensão dos fatores determinantes que governam cada uma dessas atividades.

A crescente busca por inseticidas naturais que causem baixo dano ao meio ambiente e à saúde humana torna de grande interesse os estudos das ureases vegetais, em especial as duas isoformas de urease de *C. ensiformis*. A compreensão dos fatores estruturais determinantes da atividade inseticida são de extrema importância para a concretização do uso destas moléculas ou seus fragmentos como ferramentas biotecnológicas. Essas proteínas apresentam outras atividades também pouco caracterizadas do ponto de vista estrutural, como o caráter de hemilectina, por exemplo, e cuja compreensão pode contribuir para o entendimento das propriedades biológicas e papel fisiológico das proteínas em diferentes organismos.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivos principais:

1. Verificar o efeito da modificação química de aminoácidos específicos (lisinas, ácidos aspártico e glutâmico) sobre as atividades ureolítica e inseticida da urease de *C. ensiformis*.

2. Caracterização estrutural comparativa das duas isoformas de urease de *C. ensiformis* através da técnica de dicroísmo circular.
  
3. Realizar estudos do caráter de hemilectina, tanto para urease como para canatoxina, em relação à afinidade por glicoconjugados complexos.

## 3. METODOLOGIA:

### 3.1 Procedimento experimental

#### ***Determinação do conteúdo de proteína***

O conteúdo protéico das amostras foi determinado pela absorbância em 280 nm ( $1,0 A_{280} = 1\text{mg}$  de proteína) e, alternativamente, pelo método de Coomassie Blue (Spector, 1978).

#### ***Medida de atividade ureásica***

A atividade ureásica foi estimada pela medida colorimétrica da amônia liberada, utilizando o método do fenol-nitroprussiato-hipoclorito, e uma curva padrão com sulfato de amônio (Weatherburn, 1967). Uma unidade de atividade ureásica foi definida como a massa de enzima capaz de liberar  $1\ \mu\text{mol}$  de amônia por segundo, a  $37\ ^\circ\text{C}$ , em pH 7,5. Os parâmetros cinéticos foram calculados segundo Cleland (1979).

#### ***Purificação da canatoxina e urease de *C. ensiformis* (JBU- jack bean urease)***

O método de purificação é o mesmo descrito por Blakeley *et al.* (1969), com as modificações introduzidas por Follmer *et al.* (2004 b). Resumidamente, após a moagem, a farinha das sementes de *C. ensiformis* foi delipidada com acetona e clorofórmio, e submetida à extração com tampão A (fosfato de sódio 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 2 mM) por 1h a  $4\ ^\circ\text{C}$ . O resíduo de farinha foi

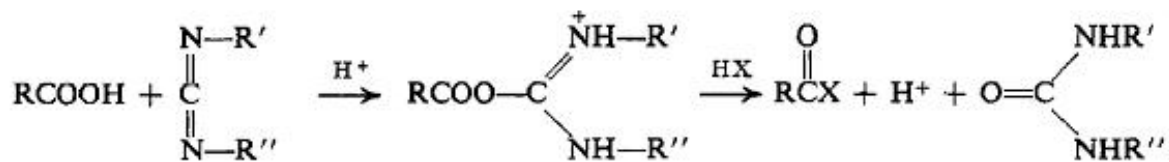
removido por centrifugação (30.000g, 20 min, 4°C), e 28% (v/v) de acetona (-20°C) foi adicionada ao sobrenadante. Após aproximadamente 10 h a 4°C, o material foi centrifugado, e o novo sobrenadante recolhido. A concentração de acetona nesse sobrenadante foi aumentada para 31,6% (v/v). Após remoção e descarte do precipitado formado, o sobrenadante foi dialisado contra o tampão B (Fosfato de sódio 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 5 mM). A amostra foi então submetida a uma cromatografia de troca iônica utilizando a resina Q-Sepharose (Amersham-Biotech) equilibrada em tampão B. A cromatografia foi realizada em duas etapas, a primeira pela adição de 100mM de NaCl ao tampão B, e a segunda, contendo a fração enriquecida em urease, pela adição de 300mM de NaCl ao tampão B. A segunda fração foi concentrada com cartuchos CentriPrep (cut-off de 50.000 kDa , Millipore) e aplicada em coluna de gel-filtração Superose 6 HR 10/30 (Amersham-Biotech) equilibrada com tampão B, em sistema FPLC. O pico contendo atividade ureásica foi dialisado contra fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, 0,5 M NaCl (tampão C). A separação das isoformas de urease foi realizada como descrito por Follmer *et al.*, 2004 b. Após a gel-filtração, o pool de frações com atividade ureásica foi submetido à cromatografia de afinidade por metal, em resina IDA-Sepharose (Amersham-Biotech) carregada com o íon  $\text{Co}^{2+}$  quelado e equilibrada com tampão C. A fração não retida na resina contém a isoforma majoritária conhecida como urease de *C. ensiformis* (ou JBU) e o material retido, eluído com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2M, corresponde à canatoxina, a outra isoforma de urease dessa semente. Ambas frações foram dialisadas contra tampão B e suas atividades ureásicas medidas conforme descrito. As soluções de proteína foram estocadas a 4 °C, em presença do tampão B.

### Atividade Inseticida

A atividade inseticida de JBU, bem como de seus derivados modificados foi avaliada em bioensaios usando o percevejo manchador do algodão *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) conforme descrito por Stanisçuaski *et al.* (2005). A solução de JBU foi adicionada à farinha de cotilédones de semente de algodão (concentração final de 0,05 e 0,1% m/m), a mistura foi liofilizada e utilizada para preencher as cápsulas de gelatina oferecidas aos insetos. A toxicidade foi expressa como taxa de sobrevivência num período de 20 dias. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA e o teste t de Student. Valores  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

### Modificação química dos grupos carboxílicos

Para a modificação de grupamentos ácidos, optamos por um método que utiliza uma carbodiimida como ativador do grupo carboxílico, e amina como reagente modificante. A reação genérica de modificação intermediada por carbodiimidas é apresentada na figura 7.



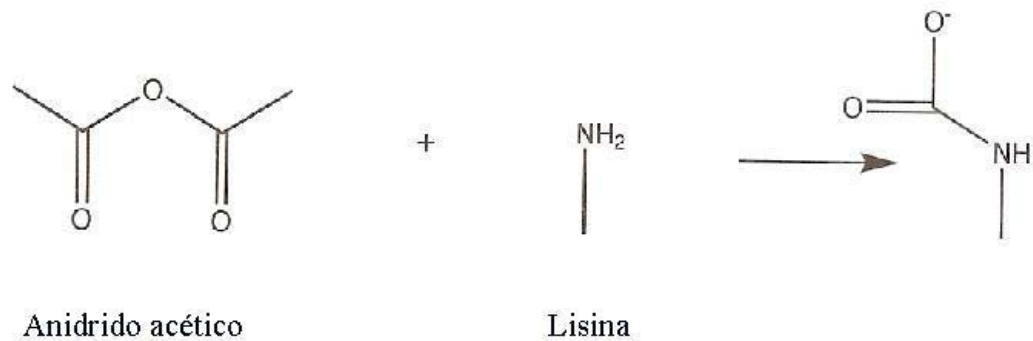
**Figura 7:** Reação genérica para a modificação onde HX representa o nucleófilo utilizado, no nosso caso etilenodiamina (Hoare & Koshland, 1966).



O procedimento experimental empregado para a modificação da urease foi adaptado de outros trabalhos (Pho *et al.*, 1977; Yamada *et al.*, 1981; Woodhead and Malcolms, 1981; Lundblad, 2005) utilizando-se a razão molar 1:500:750 (conteúdo de resíduos ácidos, EDC, etilenodiamina, respectivamente). Uma solução de JBU em água foi misturada a etilenodiamina, e o pH ajustado em 7,0 com ácido clorídrico. EDC (1-etil-3[3-(dimetilamino) propil] carbodiimida) foi então adicionado à solução sob agitação a 4°C para promover o início da reação. O pH foi mantido em 7,0 pela adição de HCl durante a reação. Após a estabilização do pH da reação (18 – 20 h), a solução foi exaustivamente dialisada contra tampão B a 4°C, e analisada por cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) equilibrada em tampão B, pH 7,0, em um sistema de FPLC. A eluição foi realizada com um gradiente de 0 a 1 M de NaCl.

### ***Modificação de resíduos de lisina***

A acetilação de JBU foi realizada pela adição de anidrido acético à solução de proteína e o pH ajustado para 8,0. A razão molar usada foi 1:50 em relação ao conteúdo de lisina da proteína (Diaz-Oreiro *et al.*, 1997). A reação permaneceu em constante agitação durante 18 - 20h, 4°C, e então foi exaustivamente dialisada contra o tampão B. O resultado da modificação foi avaliado através da mudança de migração da proteína por PAGE em pH 4.8 (Smit, 1994), corado com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987). Um esquema da reação de modificação é apresentado na figura 8:



**Figura 8:** Reação de modificação de resíduos de lisina com anidrido acético (Lundblad 2005).

### ***Hidrólise in vitro de JBU***

Os homogeneizados de intestino de *D. peruvianus* foram preparados como descrito por Stanisquaski *et al.*, 2005. Resumidamente: intestinos de ninfas de quarto estágio foram dissecados, homogeneizados, centrifugados a 4°C a 4.000 g (2x, 10 min cada), e novamente a 12.000 g por 5 min. O sobrenadante final foi mantido a -20°C até o uso. Para determinar a atividade enzimática, os homogeneizados foram incubados com azocaseína em pH 5,6 a 37°C. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de gerar 0,1 A<sub>420</sub> por hora a 37°C, pH 5,6 (Ferreira-daSilva *et al.*, 2000).

A hidrólise de JBU foi realizada usando a razão de 0,5mU de homogeneizado para cada micrograma de urease, incubada em formiato de amônio 5 mM, pH 5,6, at 37°C, sob agitação contínua (Ferreira-daSilva *et al.*, 2000). O homogeneizado foi adicionado à solução de urease em duas etapas (0 e 12h). A reação foi parada após 24 h pelo congelamento e liofilização das amostras.

## **Western-blot**

A hidrólise *in vitro* de JBU foi analisada por SDS-PAGE e Western blot (Towbin *et al.*, 1979). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida (10-20%) contendo SDS 0,1% (Weber *et al.*, 1969). Após transferência para membranas de PVDF 0,2 mm (Sigma), e bloqueio com leite desnatado 3%, as membranas foram incubadas por 2 h com anticorpo anti-Jaburetox-2Ec (1: 25.000), lavadas e incubadas por 2 h com anti-IgG de coelho acoplado a fosfatase alcalina (1:30.000). A reação colorimétrica foi desenvolvida usando NBT (*nitro-blue tetrazolium*, 330µg/ml) e BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*, 82,5 µg/ml) em tampão pH 9,6 contendo MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM).

## **Medidas de Dicroísmo Circular (CD – circular dichroism)**

Os espectros de CD foram obtidos usando um espectropolarímetro Jasco J-715, com comprimentos de onda na faixa de 195 – 250 nm. As condições foram as seguintes para todas as proteínas analisadas: tempo constante 2 s; varreduras 0,5 nm.s<sup>-1</sup>; temperatura de 25°C, percurso ótico de 0,1 cm em cubetas de quartzo. As concentrações de proteínas utilizadas foram de 0,2 mg/ml para JBU e canatoxina, e os espectros foram tipicamente obtidos como a média de 16 varreduras. Nos estudos de estabilidade das proteínas em diferentes pHs, utilizou-se um tampão de três componentes, acetato de sódio 20 mM, borato de sódio 20mM e fosfato de sódio 20mM, com pH variando de 2,0 – 12,0. A mudança do pH foi realizada pela diluição de uma solução de proteína concentrada (~2mg/ml) na solução com o pH de interesse, até atingir a diluição desejada (0,2 mg/ml). Os espectros obtidos foram convertidos para elipsidade molar (Cantor *et al.*, 1980) antes da análise de

estrutura secundária. As análises dos espectros em termos de conteúdo de estrutura secundária foram realizadas utilizando o método CONTINLL (Provencher and Glockner 1981; van Stokkum *et al.* 1990). As medidas foram realizadas no Departamento de Física e Informática, Instituto de Física da USP-São Carlos, SP, Brasil.

### **Medidas de afinidade por ressonância plasmônica de superfície**

JBU e canatoxina, a partir de uma solução concentrada (~2mg/ml) foram diluídas cerca de 10 vezes em tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,5, na hora do ensaio. As proteínas foram imobilizadas em sensor chips CM-5 até atingir o valor de 2000 unidades de ressonância (RU - resonance units) e posteriormente fixadas utilizando uma mistura de EDC (400 mM) e NHS (N-hidroxisuccinimida, 100 mM), essa mistura também é responsável pelo bloqueio do chip impedindo que novas proteínas se liguem a ele. As análises foram então realizadas utilizando um sistema BIAcore (Amersham). Várias concentrações dos gangliosídeos GM1, Gd1b e GT1b (Sigma) foram injetadas (em duplicatas) em ordem aleatória com um fluxo de 30  $\mu$ L/min sobre as duas células de fluxo. Após uma fase de dissociação de 1 min, 1 M NaCl foi injetado por 2 min no fluxo de 30  $\mu$ L/min para remover qualquer gangliosídeo remanescente, deixando a superfície “pronta” para um novo ciclo. Os *sensorgramas* resultantes foram analisados pelo software BiaEvaluation e ajustados com um modelo 1:1 (Langmuir). As medidas foram realizadas no Departamento de Física e Informática, Instituto de Física da USP-São Carlos, SP, Brasil.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Parte I

#### Modificação química de aminoácidos

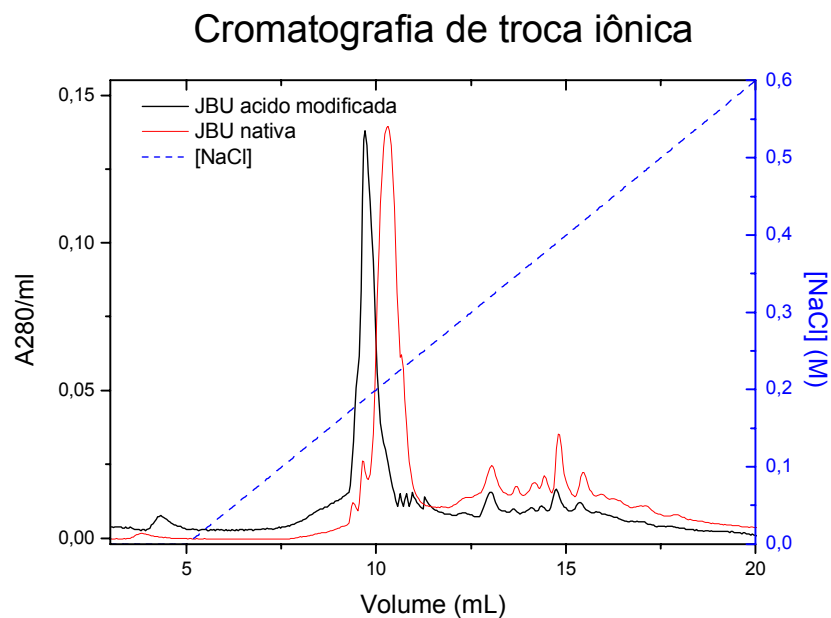
#### 4.1.1. Modificação de grupos carboxílicos

A modificação específica de grupos carboxila em proteínas é algo bastante difícil de conseguir. A maior parte dos trabalhos utiliza carbodiimidias solúveis em água para a obtenção deste tipo de modificação, no entanto a grande instabilidade das carbodiimidias, quando em contato com o meio reacional, torna a utilização deste tipo de modificação um grande desafio (Lundblad, 2005).

A reação de modificação de resíduos de ácido aspártico e glutâmico intermediada por EDC ocorre a partir da interação do EDC com o grupo carboxila em seu estado protonado, gerando um intermediário ativado que então reage com um nucleófilo, por exemplo uma amina (no nosso caso, etilenodiamina). Devido a essa característica de reação com o grupamento carboxila protonado, essa reação ocorre de maneira mais eficiente em pHs ácidos (geralmente em pH 4,75, em que os grupamentos carboxila da proteína encontrar-se-iam ~50% em seu estado protonado). No entanto, isso acarreta algumas limitações, como a impossibilidade de aplicação a proteínas sensíveis à pHs ácidos, bem como uma degradação mais rápida da carbodiimida. Essa reação pode ser realizada em pHs entre 6 e 7, ocorrendo, no entanto, de maneira muito menos eficiente.

Sendo a urease de *Canavalia ensiformis* uma proteína com ponto isolétrico em 4,5 - 4,8 e instável em pHs mais ácidos (Follmer *et al.*, 2001), a reação de modificação com etilenodiamina, intermediada por EDC, foi realizada a pH 7,0 e 4°C (Woodhead and Malcolms, 1981; Yamada *et al.*, 1981). Após 18 – 20 h horas de reação, cerca de 70 % de JBU foi recuperada como um derivado solúvel. O sucesso da reação foi monitorado pela variação no pH do meio reacional, mantido em 7,0 pela adição de HCl. Após o cessar da variação do pH, a reação foi considerada terminada. O padrão cromatográfico da proteína derivatizada em

cromatografia de troca iônica em pH 7,0 em resina mono Q (Pharmacia) é mostrado na figura 9, bem como o perfil cromatográfico da proteína nativa. A JBU nativa e sua forma quimicamente modificada foram eluídas em concentrações de NaCl diferentes, cerca de 213mM e 188mM, respectivamente. Esse dado claramente indica uma redução na quantidade de cargas negativas na molécula em decorrência da modificação de resíduos de ácido aspártico e glutâmico.



**Figura 9:** Cromatografia de troca-iônica (Mono Q). Perfil cromatográfico de JBU nativa (vermelho) e JBU modificada para resíduos ácidos (preto). A cromatografia foi realizada a pH 7,0 e a eluição feita com um gradiente de 0 – 1 M de NaCl (azul).

A JBU é uma proteína composta por 840 aminoácidos, dos quais 100 correspondem a ácidos aspártico ou glutâmico (50 Asp e 50 Glu). Grande parte desses resíduos negativamente carregados provavelmente estão envolvidos na

manutenção da estrutura terciária e quaternária da proteína, não estando, portanto, susceptíveis à reação de modificação sem a ocorrência de uma desnaturação (ao menos parcial) da proteína, tendo em vista o grande volume molecular do principal responsável pela reação de modificação que é o EDC.

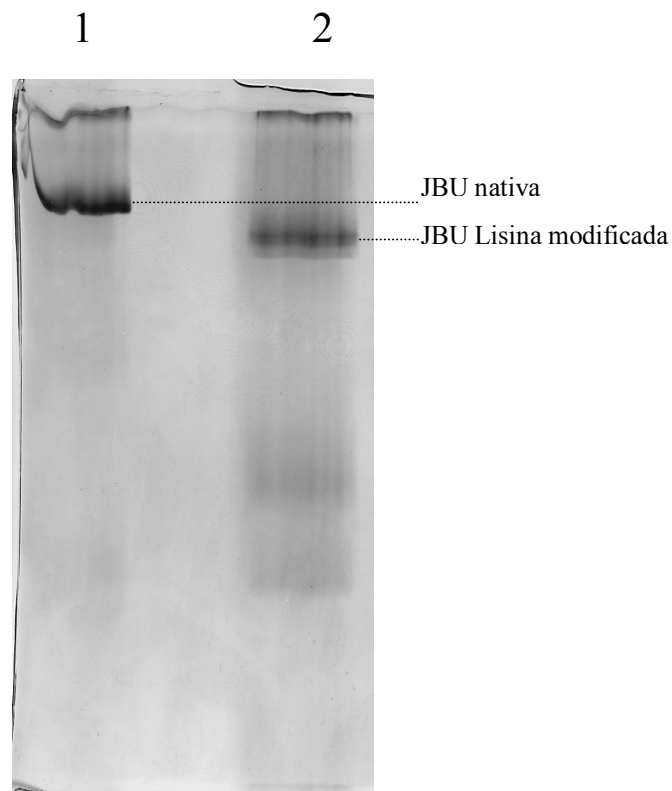
#### **4.1.2. Modificação química de resíduos de lisina**

A reação de acetilação de grupamentos amina com anidrido acético foi uma das primeiras modificações químicas desenvolvidas para proteínas (Fraenkel-Conrat, 1957) e ainda hoje, uma das mais usadas. Esse tipo de modificação é extremamente dependente do ambiente químico no qual se encontram as lisinas na proteína. Para que a reação de modificação ocorra, há a necessidade de que o grupamento amino da cadeia lateral da lisina esteja desprotonado, podendo assim atuar como um bom nucleófilo, razão dessa reação geralmente exigir pHs alcalinos. Embora seja possível a obtenção de modificações em pHs mais baixos (Smit, 1994), esse tipo de modificação é normalmente realizado em pH 8,0 (Atassi & Habeeb, 1972; Smit, 1994), conveniente no caso da modificação de JBU, que é bastante estável na faixa de pH de 6,5 a 8,5 (faixa de pH ótimo).

Dessa forma, a reação de acetilação dos resíduos de lisina foi realizada pela adição de anidrido acético à solução de proteína, sendo o pH mantido em 8,0 pela adição de NaOH à mistura. O meio reacional permaneceu sob constante agitação, 4°C, por um período de 18 – 20 h. Após a reação de modificação, cerca de 90% de JBU foi recuperada na forma solúvel. Para verificar a eficiência da reação de modificação, observamos a diferença na mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida na ausência de SDS, ou seja, em condições não



desnaturantes (Smit, 1994). O gel é apresentado na figura 10, em que se observa um aumento na migração da proteína após a reação de modificação, indicando, portanto, um considerável decréscimo no número de resíduos positivamente carregados em JBU.



**Figura 10.** Gel de eletroforese não desnaturante. JBU modificada para lisinas foi analisada em PAGE não desnaturante (8%) em pH 4,8. Canaletas (1) JBU nativa; (2) JBU modificada para lisinas. Corado com nitrato de prata.

#### 4.1.3. Atividade enzimática

Os parâmetros cinéticos da atividade ureolítica medidos para JBU, bem como seus derivados quimicamente modificados, são apresentados na tabela 1.

Nenhuma alteração significativa na atividade enzimática da JBU pode ser observada após modificações, ao contrario do que se esperava (pelo menos no caso da modificação de resíduos ácidos).

Tabela 1: Medida dos parâmetros cinéticos da urease de *C. ensiformis* e seus derivados quimicamente modificados

	JBU native	JBU Lys-modif	JBU Ac-modif
$K_m(\text{mM})^a$	5,2 $\pm$ 1,5	4,1 $\pm$ 0,7	3,7 $\pm$ 0,5
$V_{\text{max}}(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})^a$	24,5 $\pm$ 5,3	29,4 $\pm$ 3,2	20,3 $\pm$ 6,4
$K_{\text{cat}}(\text{s}^{-1})^a$	12,2 $\times 10^5 \pm 1,8 \times 10^4$	14,7 $\times 10^5 \pm 0,3 \times 10^4$	10,3 $\times 10^5 \pm 0,37 \times 10^4$

<sup>a</sup> Média de três medidas independentes  $\pm$  erro padrão. Todas as medidas foram realizadas em pH 7,5.

Um resíduo de lisina carbamilada e um resíduo de ácido aspártico estão presentes no sítio ativo das ureases e são essenciais para a manutenção da estabilidade desse sítio (Jabri *et al.*, 1995; Mobley & Hausinger, 1989). No caso da modificação de resíduos de lisina, esse resultado era até certo ponto esperado, uma vez que o resíduo de lisina que está presente no sítio ativo das ureases é um resíduo naturalmente modificado. Esse resíduo recebe uma acetilação pós-traducional pela incorporação de bicarbonato catalizada por uma proteína acessória, responsável pela ativação da urease em bactérias e plantas (Jabri *et al.*, 1995; Bacanamwo *et al.*, 2002). Essa modificação é essencial para a atividade ureolítica da proteína. A não alteração da atividade enzimática da JBU modificada

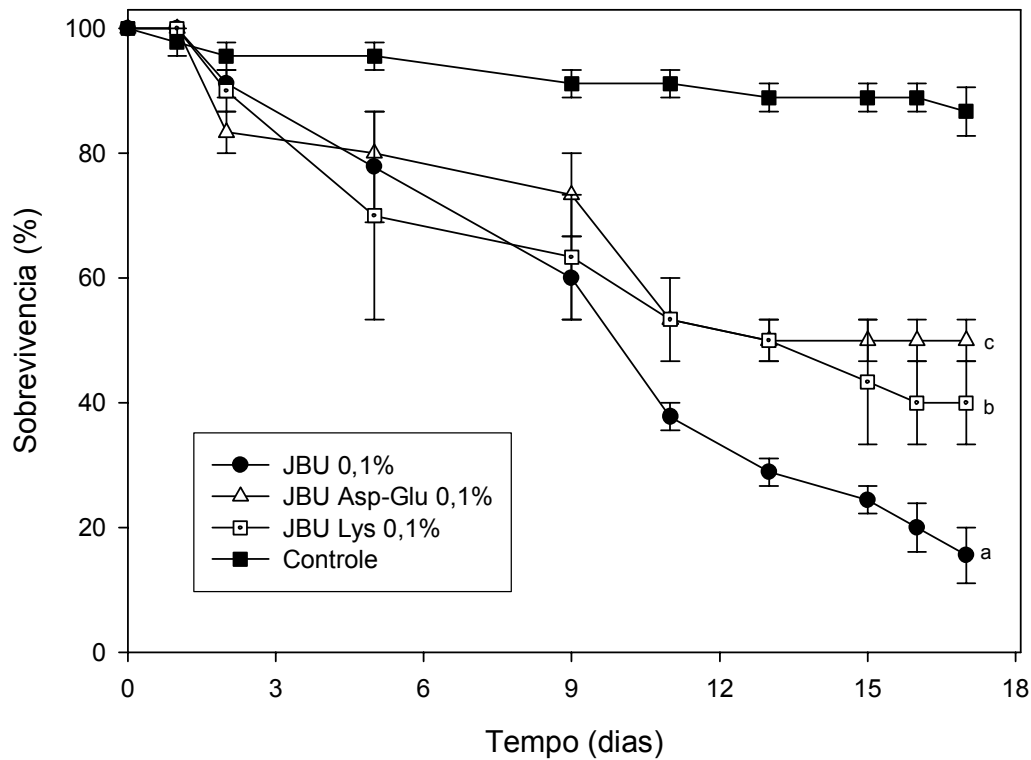
nos dá fortes indícios de que a conformação global da proteína não sofreu grandes alterações em decorrência da modificação de resíduos de lisina, pelo menos não o suficiente para interferir em sua atividade enzimática. Isso nos torna mais confiantes em atribuir qualquer possível alteração em outras atividades biológicas de JBU, exclusivamente à modificação dos resíduos.

A persistência da atividade enzimática após a modificação dos resíduos de ácido aspártico e glutâmico indica que o resíduo D633, que faz parte do sítio ativo, ou outros na proximidade, não são facilmente acessíveis para aos reagentes de modificação. Isso provavelmente ocorre devido ao grande volume molecular do EDC (quando comparado à uréia), não permitindo assim, que este tenha acesso ao interior da cavidade do sítio catalítico. Da mesma forma observada para a modificação de resíduos de lisinas, a não alteração da atividade enzimática da JBU após a modificação de resíduos de ácido aspártico e glutâmico revela indícios de que a estrutura global da proteína não sofreu grandes alterações após esse procedimento.

#### **4.1.4. Atividade inseticida**

Como descrito em trabalhos anteriores (Follmer *et al.*, 2004b), a JBU é altamente tóxica para o inseto manchador do algodão *Dysdercus peruvianus*, com uma DL<sub>50</sub> de aproximadamente 0,017 % (m/m) de proteína adicionada na alimentação do inseto. O efeito tóxico de JBU é dependente do tempo, atingindo seu máximo de letalidade em torno de 15 ou 20 dias. Para verificar o efeito das modificações da JBU na atividade inseticida, a proteína nativa e os derivados quimicamente modificados foram ensaiados em *D. peruvianus* (figura 11).

### Efeito das Modificações Químicas na Atividade Entomotóxica de JBU



**Figura 11.** Atividade inseticida de JBU e seus derivados quimicamente modificados. A JBU nativa e seus derivados foram ensaiados quanto a toxicidade contra o hemíptera *Dysdercus peruvianus* (ninfas de terceiro estágio). As proteínas foram adicionadas à farinha de sementes de algodão na concentração de 0,1% (m/m). A mortalidade foi acompanhada por 17 dias. Os resultados são médias de pelo menos dois testes independentes, em triplicata (15 insetos em cada). <sup>a</sup> Estatisticamente diferente do controle (ANOVA  $p < 0,05$ ). <sup>b, c</sup> Estatisticamente diferente de JBU (ANOVA  $p < 0,05$ ).

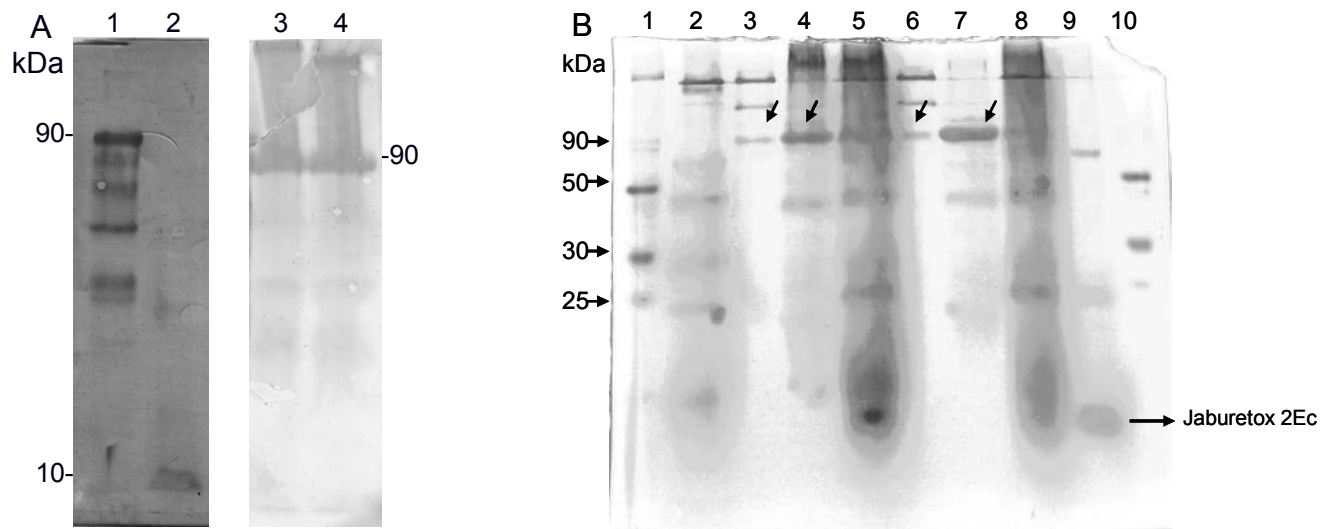
Contrastando com a JBU nativa, ambas as modificações afetaram a atividade entomotóxica pela redução do efeito em cerca de 60% e 50% para a

modificação de resíduos ácidos e de resíduos de lisina, respectivamente. O efeito entomotóxico apresentado pelas ureases vegetais é devido a um fragmento de aproximadamente 10 kDa que é liberado após a digestão da proteína pelas enzimas digestivas dos insetos (Ferreira-daSilva *et al.*, 2000; Stanisçuaski *et al.*, 2005). Dessa maneira, os dados apresentados na figura 11, mostram que resíduos de ácidos aspártico ou glutâmico, bem como resíduos de lisina, têm relevante participação na atividade entomotóxica da urease. Essa redução da atividade inseticida da JBU modificada pode ter duas razões:

- (1) as modificações alteraram os sítios de clivagem da proteína pelas enzimas digestivas dos insetos, impedindo que o peptídeo tóxico seja liberado;
- (2) essas modificações alteram o próprio peptídeo entomotóxico, de forma que apesar da sua liberação pelas enzimas digestivas do inseto, seu efeito inseticida fica comprometido.

#### **4.1.5. Hidrólise *in vitro* da JBU com enzimas de *D. peruvianus***

A hidrólise *in vitro* da JBU (nativa e derivados quimicamente modificados) com enzimas digestivas do homogeneizado de trato digestório de *D. peruvianus* mostrou que a modificação dos grupamentos carboxílicos tornou a JBU resistente à hidrólise, abolindo a liberação do peptídeo entomotóxico (figura 12A). Para a JBU modificada em resíduos de lisina, no entanto, nenhuma alteração no padrão de fragmentação da proteína por enzimas digestivas do inseto foi observado, havendo a formação de um peptídeo imunoreativo com o tamanho esperado (figura 12B).



**Figura 12.** Hidrólise *in vitro* de JBU com enzimas digestivas de *D. peruvianus*.

A JBU nativa e seus derivados quimicamente modificados foram submetidos à hidrólise proteolítica com homogeneizado do trato digestório de *D. peruvianus*. A hidrólise foi conduzida usando 0,5 mU de homogeneizado por  $\mu\text{g}$  de urease, durante 24 h à 37°C, pH 5,6. (A) Análise por Western blot da hidrólise de JBU modificada para resíduos ácidos. Canaletas (1): JBU nativa; (2): JBU nativa + homogeneizado; (3): JBU modificada para resíduos ácidos; (4): JBU modificada para resíduos ácidos + homogeneizado. (B) Análise da hidrólise por gel de eletroforese, de JBU modificada para resíduos de lisina. Canaletas (1): Padrão de massa molecular; (2): Homogeneizado de *Dysdercus peruvianus*; (3): JBU nativa; (4): JBU nativa após 24h de incubação a 37°C (na ausência do homogeneizado); (5): JBU nativa + homogeneizado; (6): JBU modificada para lisinas; (7): JBU modificada para lisinas após 24h de incubação a 37°C (na ausência do homogeneizado); (8): JBU modificada para lisinas + homogeneizado; (9): peptídeo entomotóxico Jaburetox 2Ec; (10): Padrão de massa molecular. As setas indicam a subunidade de 90 kDa da JBU.

Como mostrou a figura 11, a atividade inseticida foi afetada tanto pela modificação de resíduos de lisina, como pela modificação de resíduos de ácido

aspártico e glutâmico. A hidrólise *in vitro* com enzimas digestivas de *D. peruvianus* foi utilizada para investigar a causa da menor atividade entomotóxica da JBU modificada, mostrando claramente que a modificação de resíduos ácidos afetou a etapa de liberação do peptídeo entomotóxico a partir da urease. Recentemente, Salvadori (2006) isolou proteinases ácidas tipo catepsina B e D do trato digestório de ninfas de *D. peruvianus*, mas até o momento, a(s) enzima(s) proteolítica(s) desse inseto envolvida(s) na ativação proteolítica da JBU ainda não foi(ram) identificada(s). Observando as seqüências de aminoácidos que flanqueiam o peptídeo tóxico gerado a partir da canatoxina/JBU por enzimas do caruncho *Callosobruchus maculatus* (Gombarovits, 1999; figura 13), verifica-se a existência de dois resíduos de ácido aspártico, um do lado N-terminal e outro do lado C-terminal. A modificação desses resíduos ácidos poderia causar algum tipo de impedimento estérico, impedindo o acesso das enzimas digestivas do inseto aos seus sítios de clivagem na molécula da JBU, impedindo a geração do peptídeo tóxico e explicando, assim, a redução da atividade inseticida.

225 **NAIAD**GPVNETNLEAAMHAVRSKGFGEHEEKDASEGFTKEDPNCPFNTFIH  
RKEYANKYGPTTGDKIRLGDTNLLAEIEKDYALYGDECVFGGGKVIR**DGM** 325

**Figura 13:** A seqüência do peptídeo entomotóxico (em verde) é apresentada em dentro da seqüência de JBU (GenBank M65260). Os resíduos de ácido aspártico flanqueando o N- e o C-terminal do peptídeo são apresentados em vermelho.

Contrastando com os resultados de bloqueio da liberação do peptídeo entomotóxico a partir JBU modificada em resíduos ácidos, a modificação de lisinas

aparentemente não mostrou qualquer interferência na liberação desse fragmento como pode ser observado na figura 12B pela presença de peptídeos na região de ocorrência do fragmento tóxico. Esse dado sugere que a modificação de resíduos de lisina afetaria o próprio peptídeo, alterando sua atividade inseticida. Como mostra a figura 13, o peptídeo entomotóxico apresenta 8 resíduos de lisina passíveis de serem modificados. Estudos de modelagem molecular mostraram que o fragmento entomotóxico liberado a partir da urease apresentaria parte da estrutura tridimensional formando um *beta-hairpin* (dados não publicados), um motivo estrutural presente em toxinas peptídicas de escorpião e aranhas. Apesar do mecanismo de ação do peptídeo entomotóxico da urease ainda não ser conhecido, essa modelagem molecular sugere um possível motivo de ligação a canais iônicos, que coincide com alguns sintomas de neurotoxicidade observados nos insetos tratados com JBU ou com o peptídeo entomotóxico. Hassani et al (1999) mostrou que para a toxina VII do escorpião *Tityus serrulatus*, resíduos de lisina são extremamente importantes para a atividade tóxica sobre canais iônicos. Assim, a modificação química, por acetilação, desses resíduos na toxina VII resultaram em redução de sua capacidade de ligar-se a canais de sódio e redução da toxicidade em insetos. A modificação de lisinas afeta, de maneira similar, diversas outras toxinas tipo  $\alpha$  de escorpião (Sampieri & Habersetzer-Rochat, 1978; Darbon *et al.*, 1983). Os dados aqui mostrados sugerem que os resíduos de lisina podem ser importantes na interação do peptídeo entomotóxico com seu sítio alvo nos insetos.



## 4.2. Parte II

Caracterização estrutural de JBU e Canatoxina e  
afinidade diferencial por gangliosídeos

Até hoje nenhuma urease de origem vegetal teve sua estrutura tridimensional elucidada, pois apesar da facilidade em formar cristais, esses não difratam raios X. Tendo em vista as múltiplas propriedades biológicas independentes relatadas para as ureases, com algumas isoformas apresentando atividades específicas, como a toxicidade intraperitoneal em camundongos, até o momento exclusiva da canatoxina, ou a atividade inseticida, característica das enzimas vegetais mas ausente nas bacterianas, o desconhecimento da estrutura 3D dessas proteínas torna difícil a compreensão das particularidades de cada molécula. Essa lacuna de conhecimento constitui também uma barreira para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas baseadas nessas proteínas.

A canatoxina e JBU são duas isoformas de urease provenientes da mesma fonte, as sementes de *Canavalia ensiformis*. Em termos de atividades biológicas, a maior diferença entre as duas consiste da toxicidade da canatoxina em roedores por via intraperitoneal, sendo que a JBU é inócua quando administrada por essa via. Além disso, as duas isoformas apresentam diferenças com relação à potência de suas outras atividades. No caso da atividade enzimática, observou-se que a canatoxina tem cerca de 50% da atividade ureolítica da JBU, apresentando  $K_M$  semelhante, mas  $V_{max}$  menor, provavelmente associado ao fato dessa isoforma conter 1 átomo de Zn e 1 de Ni por subunidade, ao invés dos 2 átomos de Ni presentes na JBU (Follmer *et al.*, 2001; Follmer *et al.*, 2002).

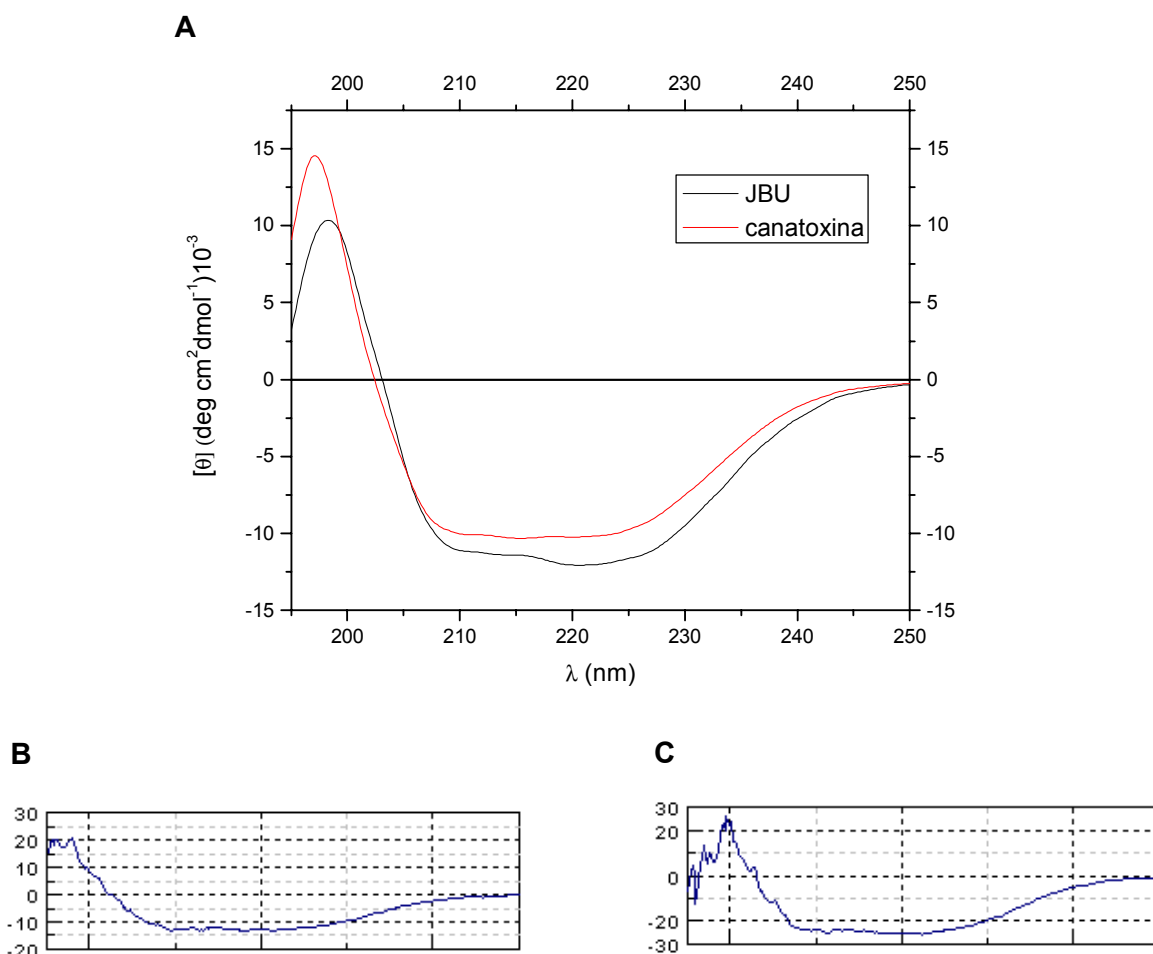
Com o objetivo de avançar o entendimento das diferenças entre essas ureases, realizamos estudos comparativos com as duas isoformas quanto ao conteúdo de estrutura secundária em diferentes pHs por dicróismo circular e a especificidade de interação com diferentes tipos de gangliosídeos, através de ressonância plasmônica de superfície.

#### 4.2.1. Dicroísmo circular

Dicroísmo circular é uma excelente ferramenta para determinação do conteúdo estrutural de proteínas. Na espectroscopia de dicroísmo circular mede-se a absorção diferencial da luz circularmente polarizada para a direita e para a esquerda, que acontece devido a assimetrias nas moléculas. A estrutura secundária de uma proteína pode ser medida por esta técnica em comprimentos de onda na região do ultravioleta distante (190 – 250 nm). Devido a quiralidade do carbono alfa da maior parte dos aminoácidos, a ligação peptídica torna-se o principal cromóforo, sendo que a absorção diferencial da luz circularmente polarizada pelo esqueleto polipeptídico da proteína também é afetado pelos ângulos  $\Phi$  e  $\Psi$ . Dessa maneira, as três principais estruturas secundárias apresentadas por proteínas ( $\alpha$ -hélices, folhas  $\beta$ , e estrutura desordenada) são caracterizáveis por espectros de CD distintos. No entanto, como qualquer método espectroscópico, os sinais observados refletem a média da população total da molécula, e por essa razão, o método permite determinar a porcentagem de cada estrutura, mas não localizá-la na molécula (Miles *et al.*, 1980; Kallenbach, 1996).

Tendo em vista a grande homologia entre as ureases, medidas de dicroísmo circular foram utilizadas para investigar as similaridades e diferenças entre as duas isoformas de urease de *Canavalia ensiformis*. A figura 14 apresenta os espectros de CD - UV distante de JBU e canatoxina. As análises dos espectros mostraram para a JBU um mínimo local em 220,6 nm, intersecção em zero em 203 nm e um máximo em 198,4 nm. Já para canatoxina, os dois mínimos locais observados não são bem distinguíveis e ocorrem entre 220 nm e 215,4 nm, intersecção em zero em 202,4 nm e máximo em 197,2 nm. As análises do conteúdo de estrutura secundária das duas proteínas, realizadas com os

programas CONTINLL, SELCON3 e CDSSTR (Provencher & Glockner 1981; van Stokkum *et al.* 1990; Sreerama & Woody, 2000) são apresentadas na tabela 2, mostrando que as isoformas apresentam diferenças com relação ao conteúdo de estrutura secundária. Os dados mostram um menor conteúdo de  $\alpha$ -hélices e maior percentagem de folhas  $\beta$  para canatoxina, em relação a JBU.



**Figura 14:** A) Espectro de dicroísmo circular da JBU (preto) e canatoxina (vermelho). Os espectros foram obtidos para uma solução 0,2 mg/mL de proteína em tampão B pH 7,5 através de uma varredura de 195 – 250 nm em uma cubeta de 0,1 cm de percurso ótico, como uma média de 16 varreduras a 25°C. B e C) traçados originais da Canatoxina e JBU, respectivamente.

**Tabela 2:** Conteúdo de estrutura secundária das ureases de *C. ensiformis*.

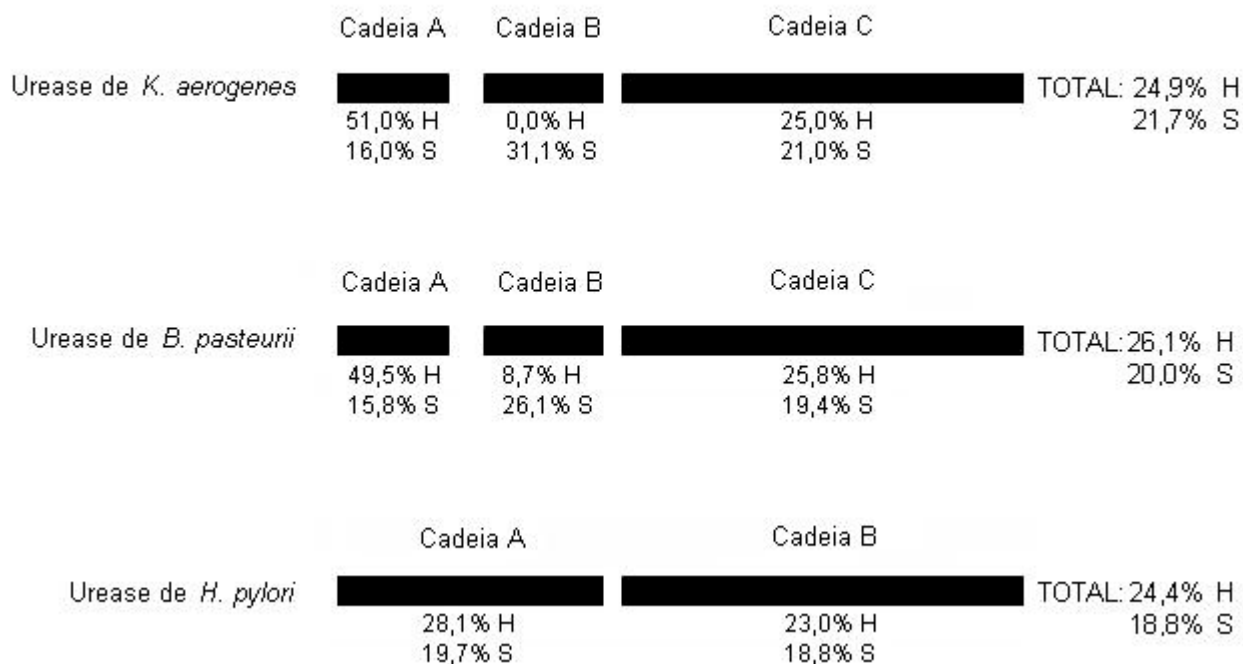
Estrutura*	JBU	Canatoxina
$\alpha$ -hélices	39%	27%
folhas $\beta$	13%	22%
Turns	22%	19%
Desordenado	26%	32%

\* referente aos dados de dicroísmo circular apresentados na Figura 14 analisados pelo programa CONTINLL. RMSD abaixo de 0,1 para todas as medidas.

As diferenças estruturais em nível de estrutura secundária e terciária provavelmente resultam, ou pelo menos contribuem para a estrutura quaternária diferenciada das isoformas canatoxina e JBU. Assim, a forma nativa da canatoxina em solução é a de um dímero com 184 kDa (Follmer *et al.*, 2001), enquanto JBU apresenta-se majoritariamente como um hexâmero. As variações nas atividades biológicas das duas isoformas de urease são provavelmente reflexos das diferenças estruturais entre elas.

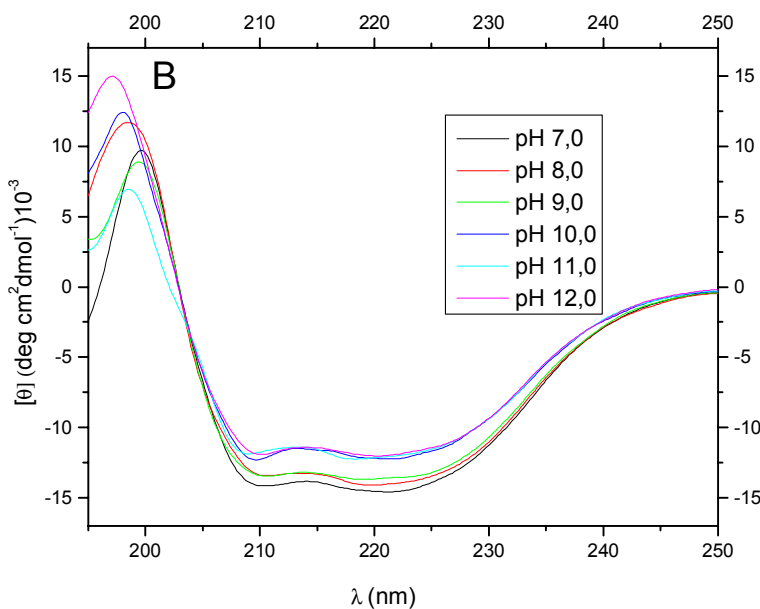
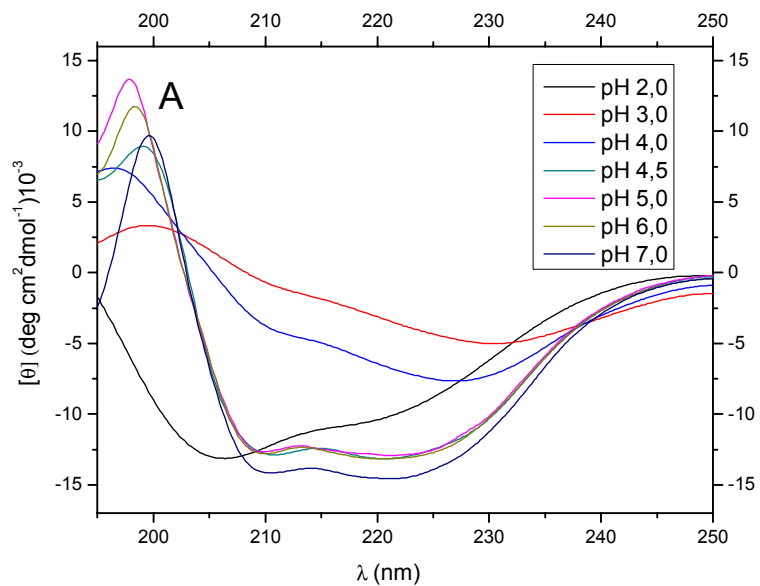
O conteúdo de estrutura secundária obtidos para as duas isoformas de urease de *C. ensiformis* podem ser comparados aos dados referentes às três ureases de origem bacteriana que já tiveram suas estruturas cristalográficas elucidadas: *Klebsiella aerogenes* (acesso PDB 1FWJ), *Bacillus pasteurii* (acesso PDB 2UBP) e *Helicobacter pylori* (acesso PDB 1E9Z). O conteúdo de estrutura secundária destas ureases é apresentado na figura 15. Ainda que seja necessário considerar que as ureases de origem bacteriana são formadas por duas, ou três subunidades enquanto as ureases de origem vegetal são proteínas de cadeia

única. Com base nesta comparação observa-se que canatoxina aproxima-se mais das ureases bacterianas no conteúdo de estrutura secundária, do que a JBU.

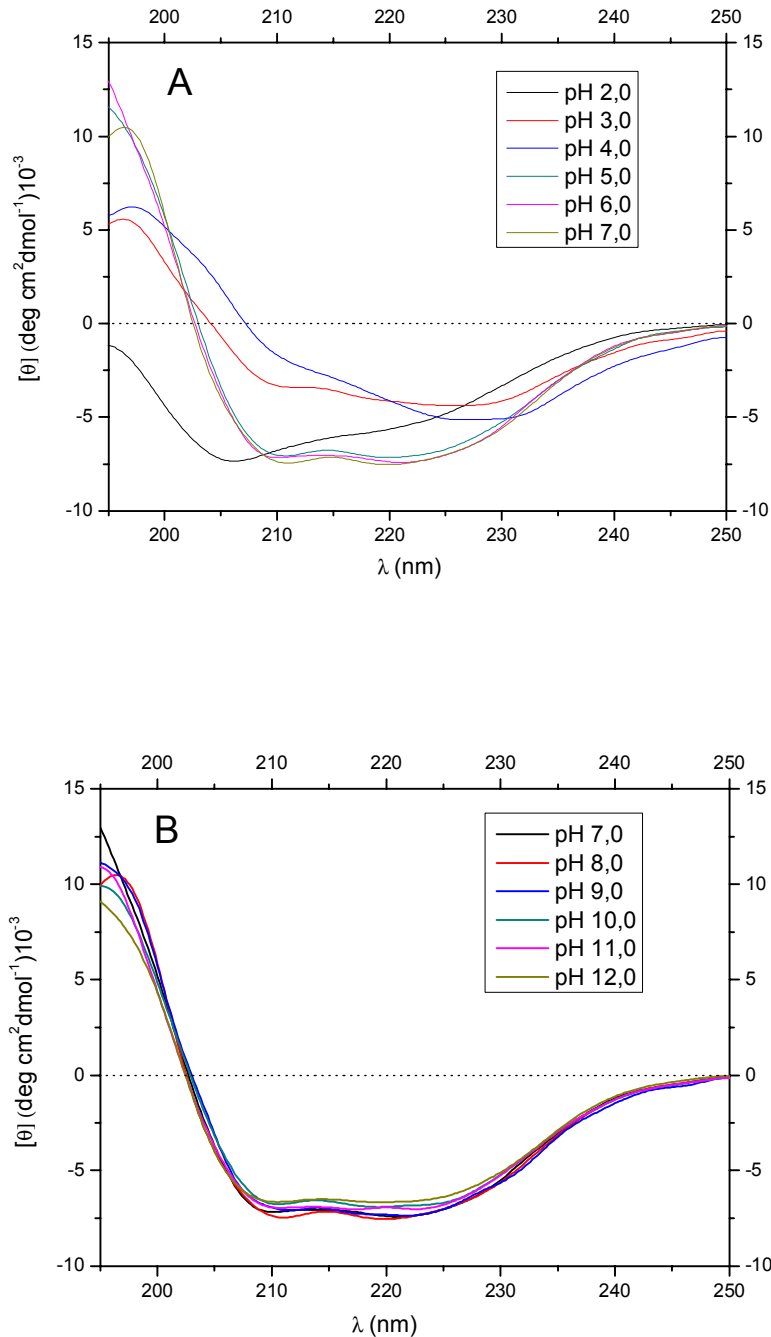


**Figura 15:** Conteúdo de estrutura secundária em ureases bacterianas. As estruturas secundárias são indicadas para cada bactéria (H = alfa-hélices, S = folhas beta). Dados obtidos a partir do PDB.

Tendo em vista as diferenças estruturais encontradas entre JBU e canatoxina, foi realizada uma investigação do comportamento dessas isoformas em diferentes pHs com o objetivo de verificar se as diferenças nas estruturas poderiam resultar em maior ou menor instabilidade das proteínas. Para isso foram feitas medidas de dicroísmo circular em soluções com pH variando de 2,0 até 12,0, incubando-se as proteínas durante 24 h a 4°C nas diferentes soluções antes de realizados os ensaios. Os espectros são apresentados nas figura 16 e 17 para JBU e canatoxina respectivamente.



**Figura 16:** Espectro de dicroísmo circular de JBU em diferentes pHs. Os espectros de soluções 0,2 mg/mL de JBU nos diferentes pH foram obtidos através de uma varredura de 195 – 250 nm em cubeta de 0,1cm de percurso ótico, como uma média de 16 scans a 25°C. (A) JBU em pHs ácidos (B) JBU em pH alcalinos.



**Figura 17:** Espectro de dicroísmo circular de canatoxina em diferentes pHs. Os espectros de soluções 0,2 mg/mL de canatoxina nos diferentes pH foram obtidos através de uma varredura de 195 – 250 nm em cubeta de 0,1 cm de percurso ótico, como uma média de 16 varreduras a 25°C. (A) Canatoxina em pHs ácidos; (B) canatoxina em pHs alcalinos.



Os resultados nas figuras 16 e 17 mostram que as duas isoformas de urease apresentam o mesmo comportamento frente aos diferentes pHs, mantendo praticamente inalteradas suas estruturas secundárias quando submetidas à pHs alcalinos ou levemente ácidos até pH 4,5 ou 5,0. Ambas as proteínas apresentam pontos isoelétricos em pH próximo a 4,5 (Follmer *et al.*, 2001). Qualquer diminuição no pH da solução abaixo do PI faz com que as proteínas comecem a apresentar sinais de mudanças conformacionais. As duas isoformas apresentam-se parcialmente insolúveis entre os pHs 4,0 e 3,0 (recuperação de cerca de 70 % da proteína após centrifugação), situação em que apresentam um conteúdo aumentado de folhas  $\beta$  na sua estrutura. Ambas as isoformas tornam-se novamente solúveis em pHs mais ácidos, no entanto já com uma conformação majoritariamente desordenada. As amostras submetidas aos pHs ácidos foram depois exaustivamente dialisadas contra tampão A pH 7,5 (ver purificação de JBU em materiais e métodos) com o objetivo de verificar a ocorrência de “refolding” das proteínas, mas a desnaturação observada foi completamente irreversível.

#### 4.2.2. Afinidade por gangliosídeos

Follmer *et al.*, 2001, mostraram que a canatoxina e a JBU comportavam-se como uma lectina monovalente (hemilectina), ligando-se a glicoconjugados complexos (gangliosídeos) e sialoproteínas (fetuína), mas não interagem com pequenos açúcares como glicose, manose, galactose, entre vários outros testados. Dados preliminares (Carlini *et al.*, 1989) sugeriam ainda que a canatoxina apresentaria preferência por polisialogangliosídeos, ligando-se mais extensivamente no triasialogangliosídeo GT1b, do que no mono- ou di-

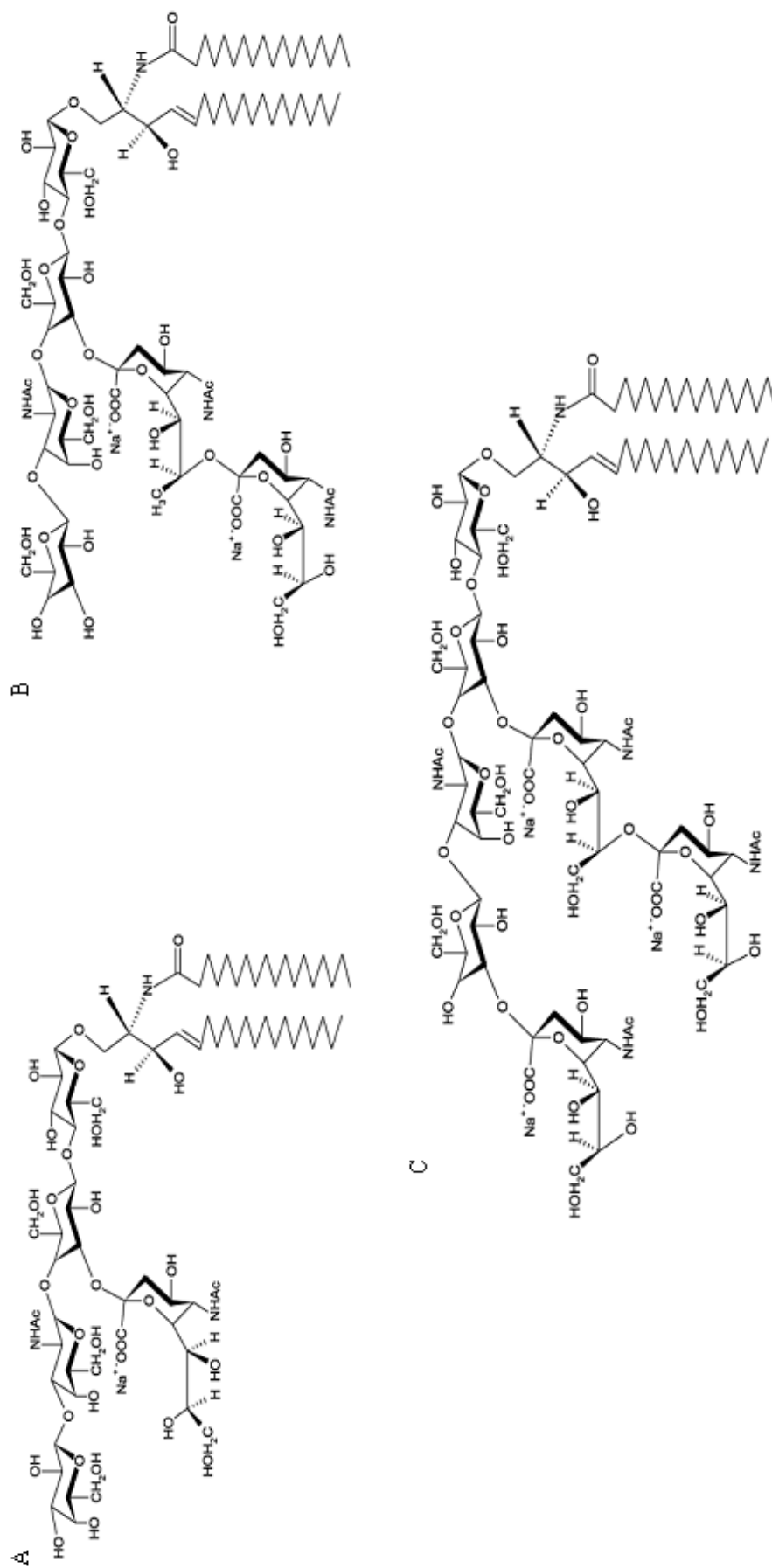
sialogangliosídeo da mesma série, mas essa informação, contudo, não estava disponível para a JBU. Em sendo a canatoxina uma proteína neurotóxica (Carlini *et al.*, 1984; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991), a propriedade de interagir com polysialogangliosídeos é extremamente interessante. Neurotoxinas protéicas de origem bacteriana como as toxinas botulínicas e toxina tetânica também possuem afinidade por polysialogangliosídeos, abundantes em tecidos nervosos, que funcionam como aceptores, dirigindo as toxinas para seus sítios de ação na membrana neuronal (Alouf & Freer, 1999).

Como já mencionado, uma diferença importante entre as propriedades biológicas de JBU e a canatoxina é toxicidade para ratos e camundongos por via intraperitoneal apresentada pela última. Seria a capacidade de ligação a glicolipídeos, tão abundantes em células nervosas, a característica determinante que faz com que a canatoxina apresente toxicidade em roedores enquanto JBU parece ser inócua? Visando responder a essa questão foram realizadas medidas de afinidade das duas proteínas com diferentes gangliosídeos através das técnicas de ressonância plasmônica de superfície (SPR – surface plasmon resonance).

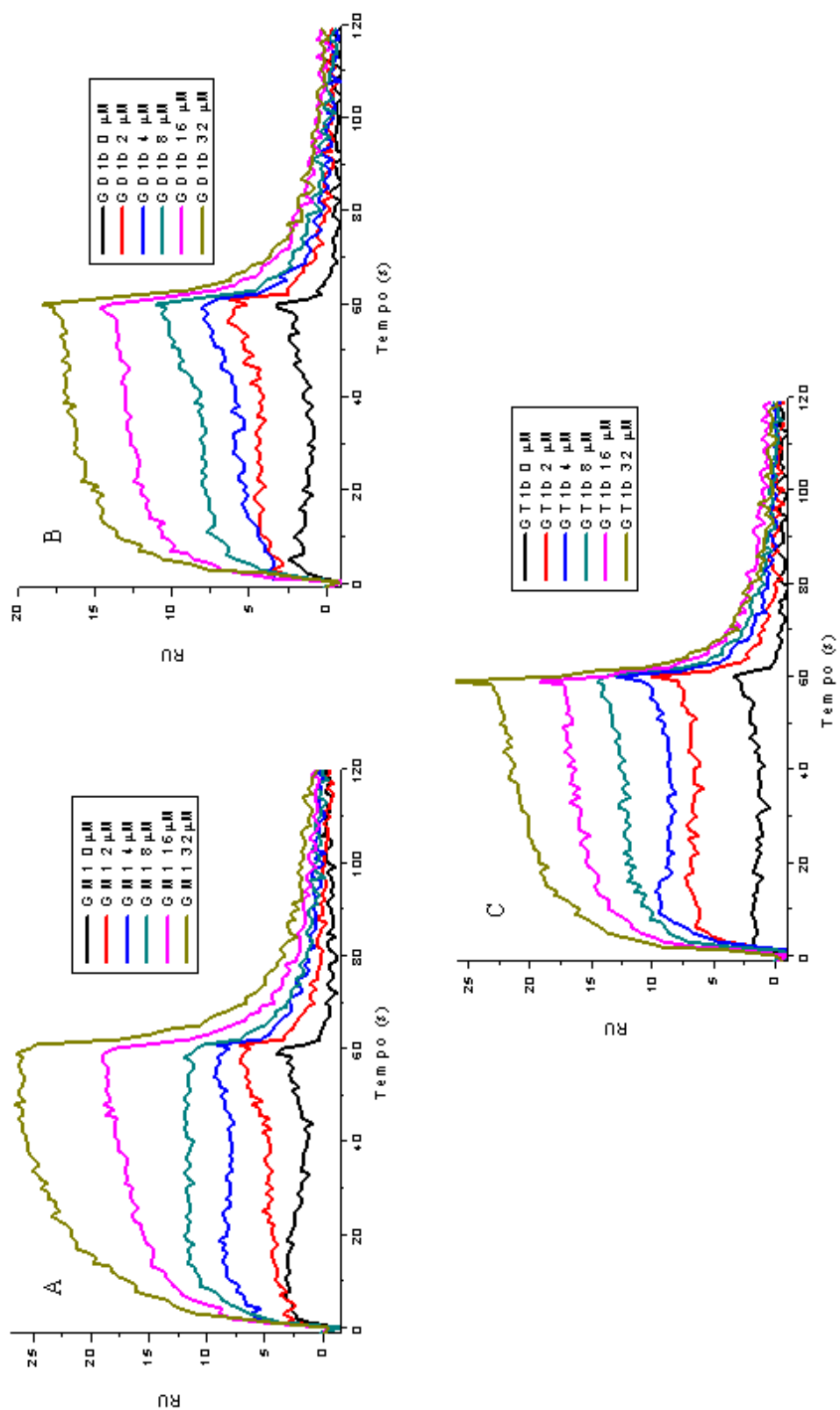
SPR é um método relativamente novo e que vem sendo muito empregado na investigação de interações entre moléculas. SPR é um fenômeno ótico que é usado para medir mudanças na concentração de moléculas em solução. Neste método, uma onda eletromagnética é propagada paralelamente ao longo de uma superfície metálica (geralmente ouro), a qual está acoplado a um ligante de interesse (proteína, DNA e outros). A propagação da onda é dependente do índice de refração do meio em contato com a superfície, que é alterado por qualquer molécula adicionada a este. Desta forma, quando uma solução contendo o analito

de interesse é injetada sobre a superfície, a interação do analito com a molécula acoplada a essa superfície metálica promove alterações na propagação da onda eletromagnética (por mudança no índice de refração da solução), e essas alterações são quantificadas resultando em uma medida em tempo real da cinética de interação entre as moléculas (Boozer et al., 2006).

Foram determinados os parâmetros de interação entre a canatoxina e a JBU com monosialo- (GM1), disialo- (GD1b) e trisialogangliosídeo (GT1b) da série b. As estruturas dos gangliosídeos são apresentadas na figura 18. Para a medida dessas interações, injeções de diversas concentrações dos gangliosídeos foram realizadas em um fluxo de 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  sobre um sensor contendo canatoxina ou JBU imobilizadas. A figura 19 mostra os sensorgramas obtidos para a canatoxina nesses estudos.



**Figura 18:** Estrutura dos gangliosídeos utilizados nos ensaios. (A) GM1; (B) GD1b; (C) GT1b.



**Figura 19:** Análise por SPR da ligação dos gangliosídeo à canatoxina. Os sensorgramas mostram a ligação dos gangliosídeos (A) GM1; (B) GD1b; (C) GT1b, em diferentes concentrações (0 – 32 μM) em tampão HEPES 50 mM pH 7,5, à canatoxina imobilizada. Um ajuste 1:1 (Langmuir) do programa BIAEvaluation foi utilizado para os cálculos dos parâmetros cinéticos de interação.

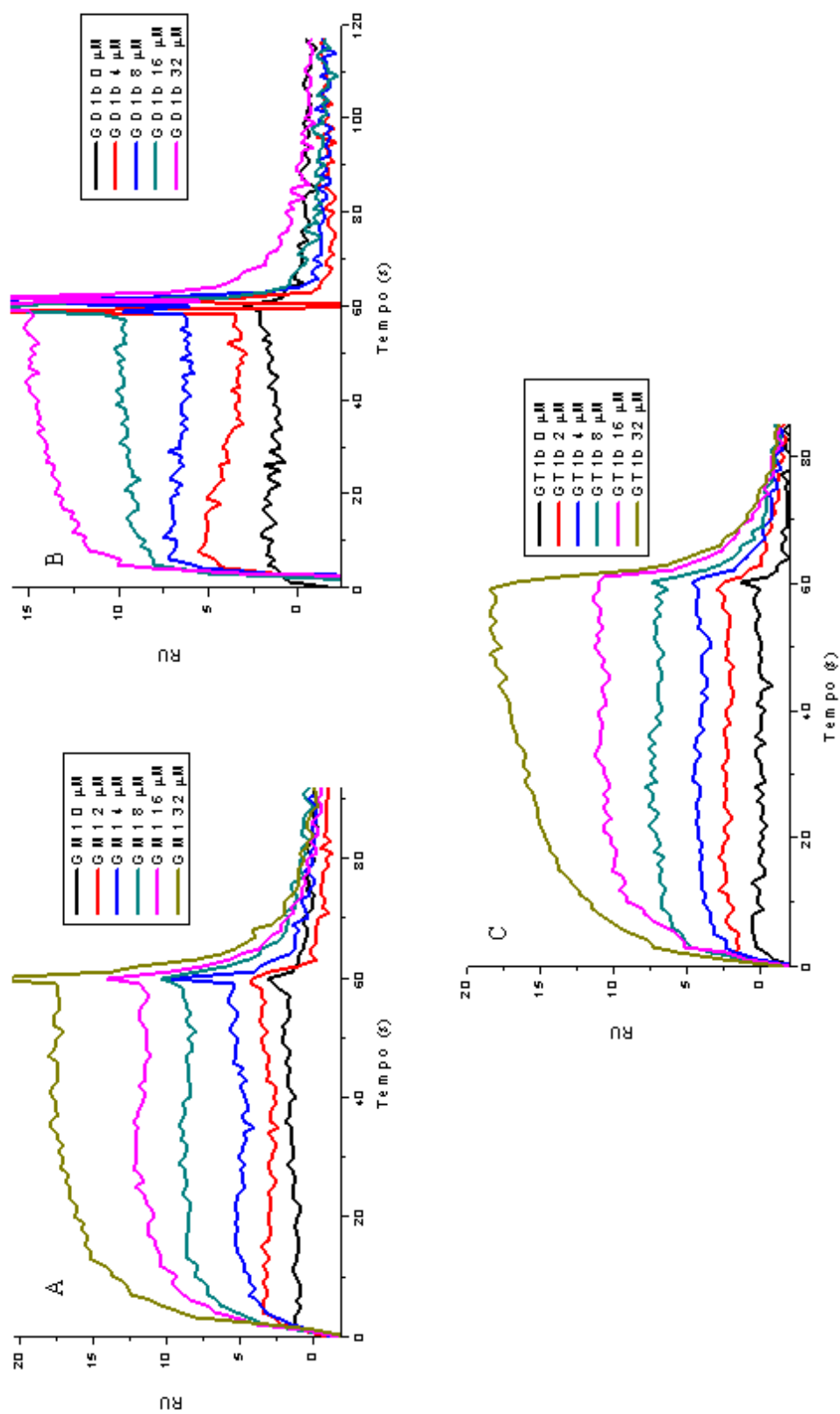
Os dados de afinidade obtidos foram ajustados para um modelo 1:1 (Langmuir) utilizando o software BIAEvaluation 4.1. Os resultados indicam que a canatoxina liga aos gangliosídeos com afinidades diferenciadas (GT1b > GD1b >>GM1), o que está em concordância com os dados previamente obtidos (Carlini *et al.*, 1989). As constantes cinéticas associadas aos gangliosídeos são apresentadas na tabela 3. Os valores de  $\chi^2$  associados ao experimento variaram de 0,47- 1,23% do  $R_{\max}$ , sendo tipicamente considerados aceitáveis valores de  $\chi^2$  até 2% do  $R_{\max}$  (Yowler & Schengrund, 2004; Boozer *et al.*, 2006).

**Tabela 3:** Constantes obtidas com um ajuste modelo 1:1 a partir dos sensorgramas de cinco concentrações dos gangliosídeos expostos à canatoxina imobilizada em um sensor CM5 (GE).

	$K_A$ ( $M^{-1}$ )	$K_D$ (M)	$R_{\max}$ (RU)	$\chi^2$
GM1	$4,16 \times 10^3$	$2,41 \times 10^{-4}$	99,4	0,464
GD1b	$2,04 \times 10^4$	$4,90 \times 10^{-5}$	39,2	0,481
GT1b	$2,44 \times 10^4$	$4,10 \times 10^{-5}$	41,7	0,761

$K_A$  – constante de associação;  $K_D$  – constante de dissociação;  $R_{\max}$  – sinal máximo.

Até então a capacidade de ligação a gangliosídeos tinha sido somente caracterizada para a canatoxina, de forma que não havia nenhuma informação se essa afinidade é compartilhada também por sua isoforma, a JBU. Visando esclarecer essa questão, assim como realizado para a canatoxina, JBU foi imobilizada em um sensor CM5 (GE) e submetida à interação com diversas concentrações dos mesmos três gangliosídeos. Os sensorgramas resultantes são apresentados nas figuras 20.



**Figura 20:** Análise por SPR da ligação de gangliosídeos a JBU. Os sensorgramas mostram a ligação de (A) GM1, (B) GD1b, (C) GT1b, em diferentes concentrações (0 – 32 μM) em tampão HEPES 50mM pH 7,5 a JBU imobilizada. Um ajuste 1:1 (Langmuir) do programa BIAevaluation foi utilizado para os cálculos dos parâmetros cinéticos de interação

Os parâmetros de afinidade associados à ligação dos gangliosídeos a JBU são apresentados na tabela 4. Os valores de  $\chi^2$  Associados às medidas variam de 0,38 - 1,1% do  $R_{\max}$ , sendo que os dados tipicamente aceitáveis apresentam valores de  $\chi^2$  abaixo de 2% do  $R_{\max}$  (Yowler & Schengrund, 2004; Boozer *et al.*, 2006).

**Tabela 4:** Constantes obtidas com um ajuste modelo 1:1 a partir dos sensorgramas de cinco concentrações dos gangliosídeos expostos à JBU imobilizada em um sensor CM 5 (GE).

	$K_A(M^{-1})$	$K_D (M)$	$R_{\max} (RU)$	$\chi^2$
GM1	$2,83 \times 10^3$	$3,53 \times 10^{-4}$	120	0,457
GD1b	$3,08 \times 10^3$	$3,25 \times 10^{-4}$	513	2,28
GT1b	$9,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^{-4}$	89,3	1,0

$K_A$  – constante de associação;  $K_D$  – constante de dissociação;  $R_{\max}$  – sinal máximo.

Como resultado desse estudo, observamos que a JBU também apresenta afinidade ( $K_D \sim 10^{-4}$  M) por gangliosídeos, ainda que menor do que aquela medida para a canatoxina ( $K_D \sim 10^{-5}$  M). A JBU parece compartilhar a mesma preferência da canatoxina por polysialogangliosídeos, na ordem  $GT1b > GD1b \geq GM1$ .

Diversas neurotoxinas protéicas de origem bacterianas também apresentam afinidade por polysialogangliosídeos. Yowler & Schengrund, 2004, através da técnica de SPR, mostraram que a toxina botulinica A apresenta a mesma ordem de preferência por polysialogangliosídeos observada aqui para a canatoxina e a JBU, no entanto, com constantes de afinidade cerca de 100 vezes



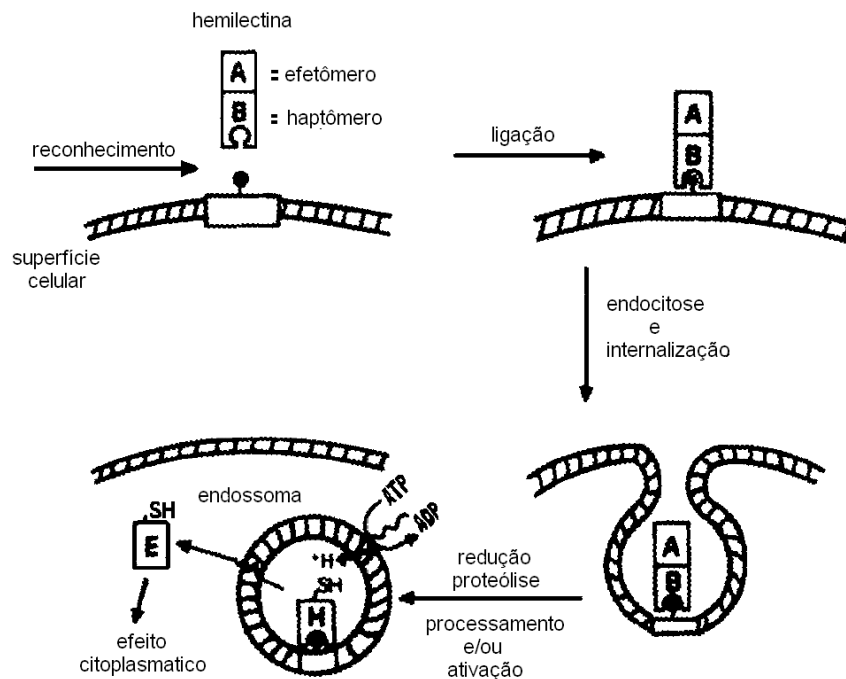
maiores. Resultados similares foram obtidos para a toxina tetânica, que também interage preferencialmente com o gangliosídeo GT1b com estequiometria 1:1, conforme estudos de microcalorimetria de Krell *et al.*, 2003. A afinidade da toxina tetânica por polisialogangliosídeos é de 2 a 3 ordens de grandeza maior do que a observada para a canatoxina, o que poderia explicar em parte, a menor neurotoxicidade dessa, com valores de DL50 para camundongo por via i.p. na faixa de µg e mg por Kg de peso para essas proteínas, respectivamente.

Em outros organismos patogênicos produtores de urease, como é o caso do *Helicobacter pylori* (bactéria causador da ulcera péptica), a urease é considerada um importante fator de colonização garantindo condições de pH favoráveis ao crescimento bacteriano no estômago do hospedeiro. No entanto o mecanismo de colonização, intermediado pela urease, ainda não está completamente esclarecido. Numerosas propriedades adesivas da bactéria foram descritas, inclusive ligação a glicoproteínas da matriz extracelular e a oligossacarídeos como Neu5Ac-α3-Gal-β4-GlcNAc (revisto em Olivera-Severo *et al.*, 2006). Icatlo *et al.*, 2000, demonstraram que a urease purificada de *H. pylori* se liga à mucina gástrica, heparina, e glicolipídeos da membrana celular em pH 5,0 e que essa propriedade é independente da atividade ureolítica que requer pH neutro-alcálico.

Devido ao grande número de relatos sobre a resistência de isolados clínicos de *H.pylori* a antibióticos, outras classes de drogas, em particular carboidratos inibidores, são tidos hoje como potenciais candidatos para uma terapia anti-adesão, que possa interferir no processo de colonização da mucosa gástrica por essa bactéria (Olivera-Severo *et al.*, 2006)

Adicionalmente, estão em andamento ensaios de fluorescência e microcalorimetria visando a caracterização da interação de gangliosídeos com JBU e canatoxina. Dados preliminares obtidos a partir dessas técnicas estão de acordo com os resultados obtidos por SPR indicando uma alta afinidade de ambas as ureases por gangliosídios polisialilados, no entanto há indícios da existência de um segundo sítio de ligação de baixa afinidade. Resultados similares a esse também foram observados para toxina botulínica A (Yowler & Schengrund, 2004) e toxina colérica (Turnbull *et al.*, 2004).

Proteínas tóxicas vegetais e bacterianas que apresentam propriedades de ligação a carboidratos em geral exercem seus efeitos intracelularmente, atuando como complexos Haptômero–Efetômero (Carlini & Guimarães, 1991). Este modelo, apresentado na figura 25, propõe que a proteína é composta por dois domínios com propriedades biológicas distintas, um domínio B responsável pelo reconhecimento da célula alvo através da interação com carboidratos existentes na superfície celular, e um domínio A, que é o agente tóxico propriamente dito.



**Figura 21:** Representação esquemática do mecanismo de ação intracelular de proteínas tóxicas que atuam como complexos haptômero-efetômero (hemilectinas tóxicas). O haptômero liga-se ao “receptor” na superfície da célula seguido pela internalização da proteína por exocitose. Uma vez dentro do compartimento endocítico, a proteína é processada levando à liberação do efetômero enzimaticamente ativo. A figura mostra de forma genérica os principais passos do mecanismo de ação de hemilectinas tóxicas, sendo que cada toxina pode apresentar requerimentos específicos nas diferentes etapas do processo. Adaptado de Carlini & Guimarães 1991.

Sendo a canatoxina (e provavelmente outras ureases) capaz de se ligar a gangliosídeos, essa propriedade certamente é relevante para a expressão de seus efeitos biológicos. Em estudos anteriores, Campos *et al.*, 1991 mostraram que a canatoxina é internalizada por várias linhagens de células em cultura ao final de 40 minutos. No entanto, esse processo é lento se comparado com outros efeitos

da canatoxina, como agregação plaquetária (máximo em 2 minutos; Barja-Fidalgo et al., 1991b) ou secreção de neurotransmissores em sinaptosomas (máximo em 10 minutos, Barja-Fidalgo et al., 1988). Assim, postulamos que esses efeitos provavelmente requerem a ligação da canatoxina com “receptores” celulares, entre os quais estariam os gangliosídeos, acionando uma cascata de mensageiros ou interferindo com canais iônicos, como revisto por Olivera-Severo et al., 2006, que levariam à expressão dos efeitos acima mencionados, sem necessidade de internalização da proteína.

Mas por que então JBU também capaz de se ligar a gangliosídeos e com a mesma especificidade aparente de sua isoforma, não apresenta toxicidade intraperitoneal ? Além de uma diferença na afinidade por gangliosídeos, o fato de a canatoxina apresentar-se em sua forma nativa como um dímero enquanto a JBU é um hexâmero, provavelmente torna mais difícil a absorção parenteral da JBU, explicando a sua falta de efeito por essa via de administração.

## 6. Conclusões

- As modificações de resíduos de lisina (com anidrido acético), e resíduos ácidos (com EDC e etilenodiamina) da molécula de JBU não foram capazes de promover alterações em sua atividade enzimática, mas causaram significativas alterações na atividade inseticida da urease.
- No caso da modificação de resíduos ácidos, a diminuição da atividade entomotóxica parece ser devido a um bloqueio dos sítios de clivagem na molécula por enzimas digestivas dos insetos, que são as responsáveis pela liberação do peptídeo inseticida.
- No caso da modificação de resíduos de lisinas, nenhuma alteração na formação do peptídeo inseticida foi observada, sugerindo que o decréscimo na atividade inseticida dar-se-ia por alterações no próprio peptídeo, o que reduziria sua atividade.
- Apesar das grandes semelhanças entre as duas isoformas de urease de *C. ensiformis*, os resultados de dicroísmo circular revelaram significativas diferenças estruturais entre elas. No entanto, as isoenzimas não se diferenciam em relação à sensibilidade ao efeito desnaturante frente a diferentes pH.

- Tanto JBU como canatoxina interagem com gangliosídeos, mostrando uma clara preferência por polisialogangliosídeos, sendo a afinidade da canatoxina por esses glicoconjugados cerca de 10 vezes maior do que a observada para a JBU. A maior afinidade por gangliosídeos e a forma dimérica poderiam explicar a neurotoxicidade apresentada pela canatoxina quando injetada via i.p., contrastando com a JBU, não tóxica pela mesma via, que apresenta menor afinidade e forma hexamérica.

## 7. Referências Bibliográficas

- Alouf, J. E. & Freer, J. H., The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. London. 1999.
- Atassi, M. Z. & Habeeb, A. F., Reaction of protein with citraconic anhydride. *Methods in Enzymology* 25, 546.1972.
- Bacanamwo, M., Witte, C. P., Lubbers, M. W. & Polacco, J. C., Activation of the urease of *Schizosaccharomyces pombe* by the UreF accessory protein from soybean. *Molecular Genetics and Genomics*. 268, 525 – 34. 2002.
- Barcellos, G. B., Canatoxina: análise estrutural e estudos comparativos com a lectina concanavalina A em sementes de *Canavalia ensiformis*. Tese de Mestrado, UFRJ, Brasil. 1992.
- Barja-Fidalgo, C., Carlini, C. R. & Guimarães, J. A., The secretory effect of canatoxin on rat brain synaptosomes involves a lipoxygenase-mediated pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 21, 549 – 552. 1988.
- Barja-Fidalgo, C., Guimaraes, J. A. and Carlini, C. R. Canatoxin, a plant protein, induces insulin release from isolated pancreatic islets. *Endocrinology* 128, 675-679. 1991a.
- Barja-Fidalgo, C., Guimaraes, J. A. and Carlini, C. R., Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon* 29, 453 – 460. 1991b.
- Bennett, J. and Wren, E. A., The interaction of p-nitrophenyl carbamate with urease. *Biochemical and Biophysical Acta* 482, 421 – 426. 1977.
- Blakeley, R. L., Hinds, J. A., Kunze, H. E., Webb, E. C. & Zerner, B., Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Demonstration of a carbamoyl-transfer reaction and its acids. *Biochemistry* 8, 1991 – 2000. 1969.
- Blum H., Beier, H. & Gross, H. J., Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99. 1987.
- Boozer, C., Kim, G., Cong, S., Guan, H. & Londergan, T., Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 400 – 405. 2006.
- Campos, M. M., Carlini, C. R., Guimaraes, J. A., Marques-Silva, V. M. & Rumjanek, V. M., Effect of canatoxin on cell cultures. *Cell Biology International Reports* 15, 581 – 594. 1991.
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R., Biophysical chemistry. Part II: techniques for the study of biological structure and function: Spectroscopy analysis of biopolymers. W.H. Freeman New York, USA. 1980.
- Carlini, C. R., Gomes, C., Guimaraes, J. A., Markus, R. P., Sato, H. & Trolin, G., Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. *Acta Pharmacological Toxicology* 54, 161 – 6. 1984.
- Carlini, C. R., Guimaraes, J. A., and Ribeiro, J. M., Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. *Brazilian Journal of Pharmacology* 84, 551 - 560. 1985.

- Carlini, C. R., Barcellos, G. B. S., Baeta-Neves, A. D. V. & Guimaraes, J. A. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin A among proteins of leguminous seeds. *Phytochemistry* 27, 25 – 30. 1988
- Carlini, C. R., Barja-Fidalgo, C. & Guimarães, J. A., Interaction of canatoxin with gangliosídeos. *Toxicon* 27, 35. 1989.
- Carlini, C. R. & Guimaraes, J. A., Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon* 29, 791 – 806. 1991.
- Carlini, C. R. & Udedibie, A. B. , Comparative effects of processing methods on hemagglutinating and antiruptic activities of *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* seeds. *Journal of agricultural food and chemistry* 45, 4372 – 4377. 1997.
- Cleland, W. W., Statistical analysis of enzyme kinetic data. *Methods Enzymology* 63, 103 – 38. 1979.
- Darbon, H., Jover, E., Couraud, F. & Rochat, H.,  $\alpha$ -Scorpion neurotoxin derivatives suitable as potential markers of sodium channels. *International Journal of Peptide and Protein Research* 22, 179 – 186. 1983.
- Diaz-Oreiro, C. & Gutierrez, J. M., Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon* 35, 241 – 252. 1997.
- Dixon, N. E., Gazzola, C., Blakeley, R. L. & Zerner, B., Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel ? *Journal of American Chemical Society* 97, 4131 – 4133. 1975.
- Kallenbach, N. R., Lyu, P., Zhou, H. & Fasman, G. D., Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules, Plenum Press, New York. 1996.
- Ferreira-DaSilva, C. T., Gombarovits, M. E., Masuda, H., Oliveira, C. M., & Carlini, C. R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Archives of Insect Biochemistry Physiology* 44, 162-71. 2000.
- Follmer, C., Barcellos, G. B. S., Zingali, R. B., Machado, O. L. T., Alves, E. W., Barja-Fidalgo, C., Guimarães, J. A., Carlini, C. R., Canatoxin, a toxic protein 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. *Biochemical Journal*. Gran-Bretanha. 360, 217 - 224, 2001.
- Follmer, C., Carlini, C. R., Fonema, M. L. & Dias J. F. Pixe análisis of urease isoenzymes isolated from *Canavalia ensiformes* (jack bean) seeds. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Part B* 189, 482 – 486. 2002.
- Follmer C., Pereira F. V., Da Silveira N. P., Carlini C. R. Jack bean urease (EC 3.5.1.5) aggregation monitored by dynamic and static light scattering. *Biophysics Chemistry*. 111, 79 – 87. 2004a.
- Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G.E., Olivera-Severo, D. & Carlini C.R., Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *European Journal of Biochemistry* 271, 1357 – 63. 2004b.



- Follmer, C. & Carlini, C. R., Effect of chemical modification of histidines on the copper-induced oligomerization of jack bean urease (EC 3.5.1.5). *Archives Biochemistry and Biophysics* 435,15 – 20. 2005.
- Foster, J. W. & Kinney, D. M., ADP-ribosylating microbial toxins. *CRC critical reviews in microbiology* 11, 273 – 298. 1983.
- Fraenkel-Conrat, H., Methods for investigating the essential groups for enzyme activity, *Methods in Enzymology* 4, 247. 1957.
- Gombarovits, E. C., Peptídeos Entomotóxicos da Canatoxina: Obtenção, Isolamento, Propriedades Biológicas e Caracterização Físico-química.. Dissertação - Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1999.
- Gill, D. M., Seven toxic peptides that cross membranes. In bacterial toxins and cells membranes, New York. Academic Press. 291 – 332
- Glazer, A. N., The chemical modification of protein by group-specific and site-specific reagentes. *The Proteins II*. 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press, New York: 2 – 103. 1976.
- Hassani, O., Mansuelle, P., Cestelle, S., Bordeaux, M., Rochat, H. & Sampieri, F., Role of lysine and tryptophan residues in the biological activity of toxin VII (Ts g) from the scorpion *Tityus serrulatus*. *European Journal Biochemistry* 260, 76 – 86. 1999
- Hoare, D. G., Koshland, D. E. A procedure for the selective modification of carboxyl groups in proteins. *Journal of American Chemical Society*. 88, 2057 – 2058. 1966.
- Icatlo, F. C., Goshima, H., Kimura, N. & Kodama, Y., Acid-dependent adherence of *Helicobacter pylori* urease to diverse polysaccharides. *Gastroenterology* 119, 358 – 367. 2000.
- Jabri, E., Carr, M.B., Hausinger, R.P., and Karplus, P.A. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes* [see comments]. *Science* 268, 998 – 1004. 1995.
- James B. Sumner, David B. Hand, and Rachel G. Holloway Studies of the intermediate products formed during the hydrolysis of urea by urease. *Journal of Biological Chemistry* 91, 333 – 341, 1931.
- Jenks, W. P., *Methods in Enzymology*., Academic Press, New York and London. 6 914 – 928.1963.
- Krell, T., Greco, F., Nicolai, M. C., Dubayle, J., Renauld-Mongenie, G., Poisson, N. & Bernard, I., The use of microcalorimetry to characterize tetanus neurotoxin, pertussis toxin and filamentous haemagglutinin. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 38, 241 – 251. 2003.
- Lundblad L. R., *Chemical reagents for protein modification*, 3<sup>rd</sup> ed. CRC press. 2005.
- Mamiya, G., Takishima, K., Masakuni, M., Kayumi, T., Ogawa, K., and Sekita, T. Complete amino acid sequence of jack bean urease. *Proc.Japan Acad.* 61, 395-398. 1985.
- Meyer-Bothling, L. E. & Polacco, J. C. Mutational analysis of the embryo specific urease locus of soybean. *Molecular Gen Genetics* 209: 439-444. 1987.
- Miles D. W., Farmer, M. & Eyring, H., Calculations of the circular dichroism of adenosine derivatives constrained in the *syn* form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77, 3398–3402. 1980.
- Mobley, H. L. & Hausinger, R. P., Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews* 53, 85 – 108. 1989.

Olivera-Severo D, Wassermann GE, Carlini CR., Ureases display biological effects independent of enzymatic activity: is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? *Brazilian Journal of Medical Biology Research* 39, 851-61, 2006.

Olsnes, S., Refsnes, K. & Pihl, A., Mechanism of action of the toxic lectin abrin and ricin. *Nature* 249, 627 – 631. 1974.

Pho, D.B., Roustan, C., Tot, A.N. & Pradel, L.A.. Evidence for an essential glutamyl residue in yeast hexokinase. *Biochemistry* 16, 4533 – 4537. 1997.

Polacco, J. C. , Judd, A. K., Dybing, J. K., & Clanzio, S. R. A new mutant class of soybean lacks urease in leaves but not on leaf derived callus or roots. *Molecular Gen Genetics*. 217, 257 – 262. 1989.

Polacco, J. C. and Holland, M. A. Roles of Urease in Plant Cells. *International Review in Cytology* 145, 65 – 103. 1993.

Polacco, J. C. and Winkler, R. G. Soybean leaf urease: a seed enzyme ? *Plant Physiology* 74, 800 - 803. 1984.

Provencher SW, Glockner J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*.20, 33 –37. 1981.

Riddles, P. W., Andrews, R.K., Blakeley, R. L., Zerner, B. Jack bean urease. VI. Determination of thiol and disulphide content – reversible inactivation of the enzyme by the blocking of the unique cysteine residue. *Biochemical. Biophysical Acta* 743: 115 –120.

Riddles, P. W., Whan, V., Blakeley, R. L., and Zerner, B. Cloning and sequencing of a jack bean urease-encoding cDNA [published erratum appears in *Gene* 16;121(2):399]. *Gene* 108, 265-267. 1991.

Salvadori J. M., Purificação parcial e caracterização de proteinases digestivas de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae): papel na hidrólise da urease de *Canavalia ensiformis*. Dissertação - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

Sampieri F & Habersetzer-Rochat C (1978) Structure-function relation in scorpion neurotoxins. Identification of the superreactive lysine residue in toxin I of *Androctonus australis Hector*. *Biochemica and Biophysica Acta* 535, 100 – 109.

Smit, V., Native electrophoresis to monitor chemical modification of human interleukin-3. *Electrophoresis* 15, 251 – 1959. 1994

Spector, T., Refinement of the Coomassie Blue method of protein quantification. A simple and linear spectrophotometric assay for <0.5 a 50 µg of protein. *Analytical Biochemistry* 39, 142 – 146. 1978.

Sreerama N. & Woody R. W., Estimation of protein secondary structure dichroism spectra: comparison of Contin, Selcon, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry* 287, 252 – 260. 2000.

- Staniscuaski, F., Ferreira-Dasilva, C.T., Mulinari, F., Pires-Alves, M. & Carlini, C.R., Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45, 753 – 760. 2005.
- Sumner, J. B. & Somers, G. F. Chemistry and Methods of Enzymes, 3<sup>a</sup> edição, Academic Press, New York. 156-161. 1953.
- Torisky, R. S. and Polacco, J. C. Soybean roots retain the seed urease isoenzyme synthesized during embryo development. *Plant Physiology* 94, 681-689. 1990.
- Towbin, B., 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* 76, 4350 – 4354. 1979.
- Turnbull, W. B., Precious, B. L. & Homans, S. W., Dissecting the cholera toxin-ganglioside GM1 interaction by isothermal titration calorimetry. *Journal of American Chemical Society* 126, 1047 – 1054. 2004.
- Van Stokkum I.H., Modelling the response of auditory midbrain neurons in the grassfrog to temporally structured monaural stimuli. *Hearing Research* 43, 231 – 250. 1990.
- Vasconcelos, I. M., Trentim, A., Guimarães, J. A., and Carlini, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 312, 357-366. 1994.
- Wang, J. H. & Tarr, D. A. On the mechanism of urease action. *Journal of American Chemical Society*. 77, 6205 – 6206. 1955
- Weatherburn, M. W., Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39, 971 – 974. 1967.
- Weber, K. & Osborn, M., The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* 244, 4406 – 4412. 1969.
- Woodhead JL, Malcolm AD., The essential carboxyl group in restriction endonuclease EcoRI. *European Journal Biochemistry*. 120,125-8. 1981.
- Yamada ,H., Imoto, T., Fujita, K., Okazaki, K. & Motomura, M. Selective modification of aspartic acid-101 in lysozyme by carbodiimide reaction. *Biochemistry*. 20, 4836 – 4842. 1981.
- Yowler, B. C. & Schengrund, C. L., Botulinum neurotoxin A changes conformation upon binding to ganglioside GT1b. *Biochemistry* 43, 9725 – 9731. 2004.
- Zaborska, W., Kot, M. & Superata, K., Inhibition of Jack bean urease by 1,4-benzoquinone and 2,5-dimethyl-1,4-benzoquinone. Evaluation of the inhibition mechanism. *Journal of Enzyme Inhibition Medical Chemistry*. 17, 247 – 253. 2002.
- Zerner, B. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, Urease. *Bioorganic Chemistry* 19, 116 – 131. 1991.

## **ANEXO**

## Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases Biological effects unrelated to ureolytic activity

Cristian Follmer, Rafael Real-Guerra, German E. Wasserman, Deiber Olivera-Severo and Célia R. Carlini

Department of Biophysics, IB, and Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

In this work we compared two plant ureases, jackbean urease (JBU) and embryo-specific soybean urease (SBU) and a bacterial (*Bacillus pasteurii*) urease, for kinetic parameters and other biological properties described recently for ureases that are independent of the ureolytic activity. The insecticidal effect of ureases was investigated in feeding trials with the cotton sucker bug, *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) as an insect model. Contrasting with *B. pasteurii* urease (PBU), both plant ureases presented potent insecticidal activity, with LD<sub>50</sub> values of 0.017% (w/w) and 0.052% (w/w) for JBU and SBU, respectively. The insecticidal property of JBU or SBU was not affected by treatment with *p*-hydroxymercuribenzoate, an irreversible inhibitor of ureolytic activity of both proteins. Also, contrasting with canatoxin – a urease isoform from jackbean seeds that displays a toxic effect in mice (LD<sub>50</sub> = 2 mg·kg<sup>-1</sup>) – no lethality was seen in mice injected intraperitoneally

with JBU or SBU (20 mg·kg<sup>-1</sup>). Similarly to canatoxin, the three enzymes promoted aggregation of blood platelets (EC<sub>50</sub> = 400.0 µg·mL<sup>-1</sup>, 22.2 µg·mL<sup>-1</sup>, 15.8 µg·mL<sup>-1</sup> for PBU, SBU and JBU, respectively). This platelet activating property was also independent of urease activity. Comparison of the kinetic properties indicated that SBU is fivefold less susceptible than JBU to inhibition by acetohydroxamic acid, a chelator of Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions. The ureases also showed different susceptibility to agents that modify cysteine residues, such as *p*-hydroxymercuribenzoate and *p*-benzoquinone. Altogether, these data emphasize that biological properties that are independent of ureolytic activity are not restricted to jackbean ureases and that these proteins may have a role in plant defense against insect predators.

**Keywords:** *Bacillus pasteurii* urease; insecticide; jackbean urease; platelet aggregation; soybean urease.

Ureases (urea amidohydrolase; EC 3.5.1.5) are nickel dependent enzymes [1] that catalyze the hydrolysis of urea to form ammonia and carbon dioxide. Ureases have been isolated from a wide variety of organisms including plants, fungi and bacteria [2]. While fungal and plant (e.g. jackbean and soybean) ureases are homo-oligomeric proteins of ≈90 kDa subunits, bacterial ureases are multimers of two or three subunit complexes [3,4]. The UreA, UreB and UreC subunits of *Bacillus pasteurii* and most other bacterial ureases are colinear with the single subunit of fungal and plant ureases, the major difference being two gaps, between UreA and UreB and between UreB and UreC. *Helicobacter pylori* urease has two subunits, one being a fusion of UreA and UreB [2,3]. So far only bacterial ureases have had their 3D crystallographic structure successfully resolved, e.g. *Klebsiella aerogenes* (1FWJ), *Bacillus pasteurii* (4UBP) and

*Helicobacter pylori* (1E9Z). However, the high sequence similarity of all ureases indicates they are variants of the same ancestral protein and are likely to possess similar tertiary structures and catalytic mechanisms [3].

Urease activity enables bacteria to use urea as a sole nitrogen source. Some bacterial ureases play an important role in the pathogenesis of human and animal diseases such as those from *Proteus mirabilis* and *Helicobacter pylori* [3].

Despite the abundance of urease in some plant tissues, e.g. seeds of members of the families Fabaceae (Leguminosae) and Cucurbitaceae, and its ubiquity in virtually all plants [3,4], little has been revealed about its physiological roles. Soybean contains two distinct urease isoenzymes: an ubiquitous urease that is synthesized in all tissues examined and an embryo-specific urease that is confined to the developing embryo and is retained in the mature seed where its activity is roughly 1000-fold greater than that of the ubiquitous urease in many tissues [5,6]. One role of the ubiquitous urease, in recycling metabolically derived urea, has been demonstrated in a number of experimental conditions [4,7–9]. In spite of the high concentration of the protein in the seeds, it has been suggested that the embryo-specific urease plays no role in nitrogen assimilation from urea [4,7,10]. To our knowledge, no recent work has addressed the question of the physiological relevance of this highly active enzyme.

Recently, our group has shown that canatoxin, an isoform of jackbean urease consisting of a dimer of 95 kDa subunits, displays several biological properties

Correspondence to C. R. Carlini, Department of Biophysics, IB, and Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, CEP 91.501-970.  
Fax: + 55 51 3316 7003, Tel.: + 55 51 3316 7606,  
E-mail: ccarlini@ufrgs.br

**Abbreviations:** AHA, acetohydroxamic acid; BPU, *Bacillus pasteurii* urease; JBU, jackbean urease; *p*-BQ, *p*-benzoquinone; *p*-HMB, *p*-hydroxymercuribenzoate; SBU, soybean urease.

**Enzyme:** urea amidohydrolase (EC 3.5.1.5).

(Received 10 December 2003, revised 24 January 2004, accepted 18 February 2004)



independent of its ureolytic activity, such as activation of blood platelets and interaction with glycoconjugates [11–15]. Moreover, canatoxin is lethal to rats and mice when injected intraperitoneally ( $LD_{50}$  2.0 mg per kg body weight) and presents insecticidal activity when fed to some groups of insects, suggesting that ureases may be involved in plant defense [16–18]. The kissing bug *Rhodnius prolixus*, and three economically important crop pests, the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus*, the Southern green soybean stinkbug *Nezara viridula* and the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* are highly susceptible to the entomotoxic effect of canatoxin [18].

In order to investigate if ureases from other sources share, with jackbean ureases, the property of inducing biological effects not related to their ureolytic activity, we have tested soybean embryo-specific urease (SBU) and *Bacillus pasteurii* urease (BPU) [19] for their lethality in mice and for their insecticidal and platelet aggregating activities. Kinetic parameters and susceptibility of SBU and BPU to different inhibitors were also compared with those of the jackbean urease (JBU).

## Material and methods

### Protein determination

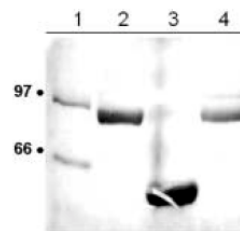
The protein content of samples was determined by their absorbance at 280 nm or, alternatively, by the method of Spector [20].

### *Bacillus pasteurii* urease

A commercially available preparation of BPU (U-7127, Sigma Chemical Co.) was used in all experiments without further purification. The freeze-dried protein was resuspended in 20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol to give 0.5 mg protein per mL solutions.

### Purification of jackbean urease

The jackbean enzyme was purified from jackbean meal based on the method of Blakeley *et al.* [21] with modifications. Dry seeds (Casa Agrodora, São Paulo, Brazil) were powdered and 50 g of defatted meal were extracted with buffer A (20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol) for 1 h at 4 °C. The meal was removed by centrifugation (30 000 g, 20 min, 4 °C), and 28% (v/v) ice-cold acetone (final concentration) was added to the supernatant. The suspension was kept at 4 °C overnight and the precipitated proteins were removed by centrifugation (30 000 g, 20 min, 4 °C). The concentration of acetone in the supernatant was then increased to 31.6% (v/v) and, after stirring at room temperature for 10 min, the precipitate was removed by centrifugation (30 000 g, 20 min, 4 °C). The supernatant was dialysed against buffer B (20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol) and then mixed with 25 mL of Q-Sepharose resin (Amersham-Biotech Pharmacia) equilibrated in buffer B. After stirring in a beaker for 30 min in an ice bath, the mixture was filtered and the resin was washed with 100 mM NaCl in buffer B to remove the



**Fig. 1.** SDS/PAGE patterns of JBU and SBU. SDS/PAGE analysis was performed using a 10% (w/v) polyacrylamide gel containing 0.1% SDS. After the run, the gel was stained with Coomassie Blue. Lane 1, molecular mass standards; lane 2, JBU (12 µg); lane 3, concanavalin A (12 µg, 27 kDa subunit); lane 4, SBU (10 µg).

nonretained proteins. Elution of an urease-enriched fraction was achieved by adding 300 mM NaCl to buffer B. The active fraction was concentrated using a CentriPrep cartridge (Millipore). The urease-enriched material was then applied into a Superose 6 HR 10/30 gel filtration column (Amersham-Biotech Pharmacia) equilibrated in 20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 1 mM EDTA, mounted in a FPLC system. The peak fraction containing urease activity was dialysed against 20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 500 mM NaCl (buffer C) and then submitted to affinity chromatography on 10 mL of a  $Co^{+2}$  loaded iminodiacetic acid-Sepharose resin equilibrated in buffer C. Highly purified urease was recovered in the nonretained fraction (Fig. 1).

### Purification of soybean urease

A new method for purifying soybean embryo-specific urease was developed based on the procedure of Blakeley *et al.* [21]. Briefly, dry seeds of soybean (cultivar EM66, Crisciumal, RS, Brazil) were powdered and 25 g of defatted meal were extracted with buffer A for one hour at 4 °C. The meal was removed by centrifugation (30 000 g, 20 min, 4 °C), and 20% (v/v) ice-cold acetone (final concentration) was added to the supernatant. The suspension was kept at 4 °C for 2 h and the precipitated proteins were removed by centrifugation (30 000 g, 20 min, 4 °C). The supernatant was dialysed against buffer B and then mixed with 15 mL of Q-Sepharose resin (Amersham-Biotech Pharmacia) equilibrated in buffer B. After stirring in a beaker for 30 min, the mixture was filtered and the resin was washed with 150 mM NaCl in buffer B to remove the nonretained proteins. Elution of an urease-enriched fraction was achieved by adding 300 mM NaCl to buffer B. The gel filtration column and the affinity chromatography in immobilized  $Co^{+2}$  were performed as described for JBU. As for JBU, SBU did not bind to immobilized  $Co^{+2}$  in the affinity chromatography step. Purified SBU showed a major band in SDS/PAGE analysis (Fig. 1).

### SDS-PAGE

Electrophoresis in 10% polyacrylamide minigels containing 0.1% sodium dodecyl sulfate [22] were run at 20 mA for 2–3 h. The gels were stained with Coomassie Blue R-250.

### Assay of biological activities of ureases

Toxic activity was expressed as LD<sub>50</sub> and defined as lethality of mice within 24 h after intraperitoneal injection of single doses (20 mg·kg<sup>-1</sup>, equivalent to 10 LD<sub>50</sub> of canatoxin) of the samples [11]. Institutional (IB-UFRGS) protocols designed to minimise suffering and limit the number of animals killed, were followed throughout the experiments.

Platelet-rich plasma was prepared from rabbit blood collected from the ear central artery in the presence of sodium citrate to a final concentration of 0.313% (v/v). Blood samples were then centrifuged at 200 g for 20 min at room temperature, to give a platelet-rich plasma suspension [12]. Platelet aggregation and shape change were monitored turbidimetrically [23], using a Lumi-Aggregometer apparatus (Chrono-Log Co., Havertown, PA, USA) and light transmission across the rabbit platelet-rich plasma suspension was registered on a chart recorder for 3 min. Platelet aggregation assays were also performed on a SpectraMax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) as described previously [24]. The use of microplate assays has been shown to give results similar to those obtained with Born's aggregometry. Briefly, urease samples (previously dialysed against phosphate buffered saline) in 96-well flat-bottomed plates were prepared to a final volume of 50 µL with saline. Aggregation was triggered by the addition of 100 µL of platelet suspension. Controls were run by adding platelet-poor plasma. The plate was incubated for 2 min at 37 °C before commencing agitation, and readings were taken at 650 nm every 11 s for 20 min. Change in turbidity was measured in absorbance units and results are expressed as the area under the aggregation curves.

The insecticidal activity of ureases was evaluated in feeding trials with the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera), which is an economically important crop pest. Groups of 15 second instar insects (from a colony housed in this laboratory) were fed on cotton seed meal mixed with freeze-dried urease in a final protein concentration of 0.02–0.1% (w/w). For this, solutions of ureases were

added to cotton seed meal, the mixtures were homogenized, freeze-dried, put inside gelatin capsules and then offered to the insects. Control insects fed on cotton seed meal containing equivalent volumes of freeze dried buffer A alone or containing 20 µM *p*-hydroxymercuribenzoate. For proteins treated with 50 µM *p*-HMB, excess reagent was removed by dialysis against buffer A prior to the bioassays. The insects were kept at 26 °C, 70–80% air humidity, 12-h dark : 12-h light cycle and examined every 2 days during 20 days for lethality, body weight and developmental stage (the insect goes through five instar stages before becoming adult). The results are mean and SEM of triplicates and expressed as survival rate and percentage of body weight of the control insects. LD<sub>50</sub> values were calculated by linear regression of survival rates after 20 days plotted against five doses of the ureases tested in the feeding trials.

### Urease activity

The ammonia released was measured colorimetrically [25]. One unit of urease releases one µmol ammonia per minute, at 37 °C, pH 7.5. Kinetic parameters ( $K_m$  and specific activity) were calculated as by Cleland [26]. For inhibitory studies, the proteins were incubated with *p*-hydroxymercuribenzoate (*p*-HMB), acetohydroxamic acid (AHA) and *p*-benzoquinone (*p*-BQ), or the corresponding diluents, for 18–24 h at 4 °C.

## Results

### Kinetic parameters and inhibitors of urea hydrolysis

Table 1 shows the kinetic parameters for the three ureases, JBU, SBU and BPU. Purified JBU and SBU displayed ureolytic specific activities at pH 7.5 of 22.2 ± 0.7 and 14.2 ± 0.6 U·mg<sup>-1</sup>, respectively. Susceptibility of the ureolytic activity to different inhibitors was also evaluated (Fig. 2, Table 1). The inhibitors tested were *p*-HMB and *p*-BQ, two cysteine-binding inhibitors, and AHA, a chelator

**Table 1.** Comparative data on physicochemical and biological properties of soybean embryo-specific urease (SBU), jackbean urease (JBU) and *B. pasteurii* urease (BPU). ND, not determined.

Physicochemical/Biological properties	SBU	JBU	BPU
Physicochemical properties			
Molecular mass, SDS/PAGE	90 kDa	90 kDaA	11,13 and 61 kDa [2,3] (chains A, B and C, respectively)
Native form	hexamer	hexamer	trimer
Urease activity			
$K_m$	0.2–0.6	2–3.5 [15]	40–130 [2]
Inhibitors, IC <sub>50</sub>			
<i>p</i> -hydroxymercuribenzoate	38 <sup>a</sup>	70	ND
acetohydroxamic acid	216	42	ND
<i>p</i> -benzoquinone	92	54	ND
Biological properties			
Toxicity in mouse, interperitoneal	not toxic	not toxic	ND
<i>Dysdercus peruvianus</i> , LD <sub>50</sub>	0.052% (w/w)	0.017% (w/w)	not toxic
Treated with <i>p</i> -hydroxymercuribenzoate	100% active	100% active	–
Platelet aggregation, EC <sub>50</sub> (rabbit)	22.2 µg·mL <sup>-1</sup>	15.8 µg·mL <sup>-1</sup>	400 µg·mL <sup>-1</sup>
Treated with <i>p</i> -hydroxymercuribenzoate	100% active	100% active	100% active

<sup>a</sup> Values of IC<sub>50</sub> were taken from Fig. 2 and are expressed as mol of inhibitor per mol of enzyme.



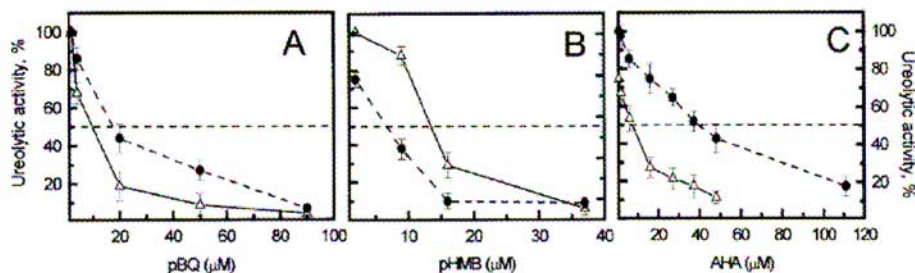


Fig. 2. Inhibition of ureolytic activity of JBU and SBU by *p*-benzoquinone (*p*-BQ), *p*-hydroxymercuribenzoate (*p*-HMB) and acetohydroxamic acid (AHA). Aliquots ( $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) of JBU ( $\Delta$ ) or SBU ( $\bullet$ ) were incubated for 18–24 h at  $4^\circ\text{C}$  with *p*-BQ (A), *p*-HMB (B) or AHA (C) and then assayed for residual ureolytic activity. Data are means  $\pm$  SEM of at least four independent experiments.

of  $\text{Ni}^{+2}$  and  $\text{Zn}^{+2}$  ions. JBU was fivefold more susceptible to AHA than SBU. Although *p*-HMB and *p*-BQ have the same mechanism of action, different inhibition patterns were seen for JBU and SBU, two highly similar enzymes.

### Insecticidal properties of ureases

As described for canatoxin [16,17], JBU and SBU were also highly toxic to the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* in feeding trials, with calculated  $\text{LD}_{50}$  values of 0.017% and 0.052% (w/w) of protein added to the cotton meal, respectively (not shown). The time dependency of the entomotoxic effect was similar for both proteins, with a lag-phase of 3–4 days for death of the first insects, and reaching maximal lethality in about two weeks (Fig. 3). Contrasting to the plant ureases, *Bacillus pasteurii* urease was not toxic to the insects in the feeding trials at 0.1% (w/w) concentration (not shown). After treating JBU and SBU with *p*-HMB, an irreversible urease inhibitor, their insecticidal property was re-evaluated. The results showed that *p*-HMB-treated JBU or SBU maintained full toxic activity in the insect (Figs 3B,D and 4), while the enzymatic activity of the

proteins was abolished (Fig. 4). Both plant ureases were detrimental for the development of the surviving insects, which showed decreased body weight and delayed progress through the instar stages (Fig. 5).

### Platelet aggregation

Similarly to both jackbean ureases, canatoxin [12] and JBU [15], SBU and BPU also induced aggregation of rabbit platelets (Fig. 6).  $\text{EC}_{50}$  for the platelet aggregation was estimated to be 400.0, 22.2 and  $15.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ , for BPU, SBU and JBU, respectively. As described for canatoxin and JBU [12], SBU was also still fully able to activate platelets after treatment with  $50 \mu\text{M}$  *p*-HMB (Table 1).

### Lethality in mice

Canatoxin is lethal to rats and mice ( $\text{LD}_{50}$   $2 \text{ mg kg}^{-1}$  for mice), while JBU is not [15]. Similarly to JBU, no signs of toxicity were seen after 7 days in animals injected intraperitoneally with 20 mg SBU per kg of body weight. BPU was not tested for intraperitoneal toxicity in mice.

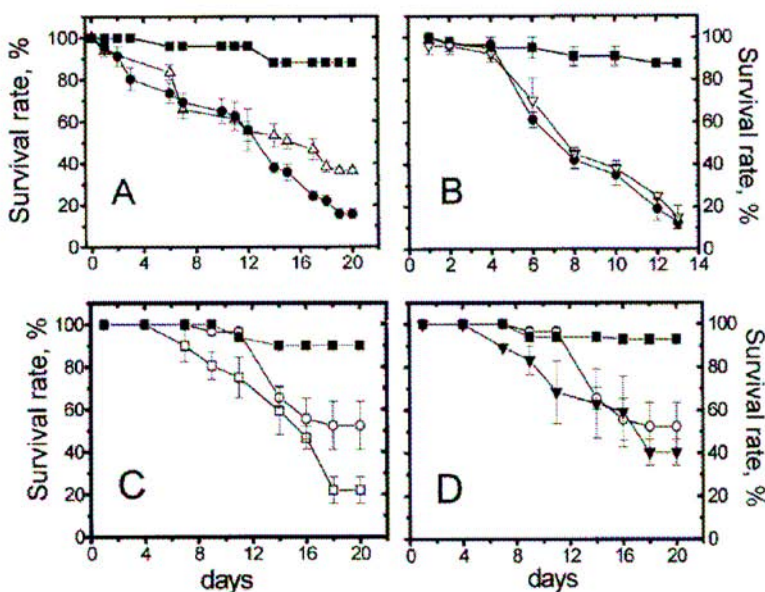


Fig. 3. Insecticidal effect of JBU and SBU in *Dysdercus peruvianus*. The toxic activity of ureases was assayed in feeding trials with *Dysdercus peruvianus* (second instar) using different concentrations of the freeze-dried proteins added to cotton meal. (A) Insecticidal effect of JBU: 0.02% (w/w) ( $\Delta$ ), 0.05% (w/w) ( $\bullet$ ); Control: cotton meal alone ( $\blacksquare$ ). (B) Effect of *p*-hydroxymercuribenzoate (*p*-HMB)-treatment on the insecticidal activity of JBU. JBU 0.05% (w/w) ( $\bullet$ ); *p*-HMB-treated JBU ( $\nabla$ ); Control: cotton meal containing *p*-HMB ( $\blacksquare$ ). (C) Insecticidal effect of SBU: 0.1% (w/w) ( $\square$ ) and 0.05% (w/w) ( $\circ$ ); Control: cotton meal alone ( $\blacksquare$ ). (D) Effect of *p*-HMB-treatment on the insecticidal activity of SBU. SBU 0.05% (w/w) ( $\circ$ ); *p*-HMB-treated SBU ( $\blacktriangledown$ ); Control: cotton meal containing *p*-HMB ( $\blacksquare$ ). Data are mean  $\pm$  SEM of triplicate points, with 20 insects each.



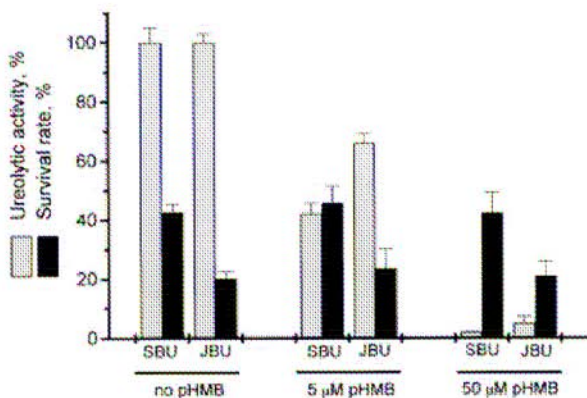


Fig. 4. Effect of *p*-hydroxymercuribenzoate treatment on the insecticidal and ureolytic activities of JBU and SBU. Ureases were incubated for 18–24 h at 4 °C with different concentrations of *p*-HMB (5 µM and 50 µM), dialysed against buffer A and then assayed for ureolytic activity and toxicity for *Dysdercus peruvianus*. Data are means ± SEM of at least four independent experiments.

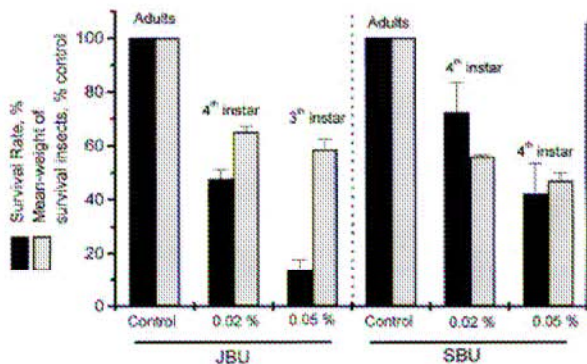


Fig. 5. Detrimental effects of JBU and SBU on the cotton stainer bug, *Dysdercus peruvianus*. The entomotoxic effects of JBU and SBU fed to *Dysdercus peruvianus* were evaluated as survival rate, mean body weight and stage of development of the surviving insects after two weeks. The freeze-dried proteins in concentrations of 0.02% and 0.05% (w/w) were added to the cotton meal, and the insects feeding on them were monitored over 20 days. Data are means ± SEM of at least four independent experiments.

Table 1 summarizes the data on kinetic parameters and biological activities of the three ureases analyzed in this work.

### Discussion

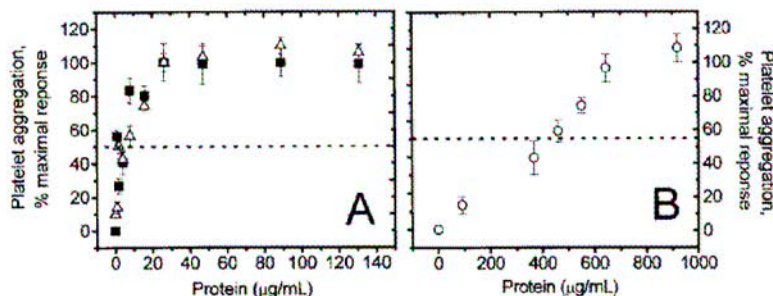
Despite their highly conserved structures and similar mechanisms of catalytic action, little is known about the physiological role of ureases in the source organisms.

The wide distribution of ureases in leguminous seeds as well as the accumulation pattern of the protein during seed maturation is suggestive of an important physiological role. As soybean mutants lacking the embryo-specific urease do not exhibit any of the abnormalities associated with loss of the ubiquitous urease, this enzyme probably has no essential physiological function [10]. Studies with developing cotyledons of pea [27] and soybean seedlings [28,29] indicated that urease(s) play little or no role in embryo nutrition. The obvious question from this observation is why the developing soybean embryo would invest in a very active ureolytic protein when it never 'sees' urea.

Canatoxin, first isolated as a highly toxic protein [11] and identified recently as an isoform of jackbean urease [15], displays insecticidal activity against insects of Coleoptera (beetles) and Hemiptera (bugs) orders, such as the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*, the kissing bug, *Rhodnius prolixus* [16], the cotton stainer bug, *Dysdercus peruvianus* and the green soybean stinkbug, *Nezara viridula* [18]. The entomotoxic property of canatoxin is independent of its enzymatic activity and requires the proteolytic activation of the protein by insect cathepsin-like digestive enzymes in order to produce entomotoxic peptide(s) [17]. The more abundant isoform of urease, here designated JBU, was previously shown to be as lethal as canatoxin in feeding trials with the kissing bug *Rhodnius prolixus* [18].

Here we have analyzed the insecticidal properties of three ureases, JBU, SBU and BPU, using the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* as the insect model. Only the plant ureases were toxic in the feeding trials. JBU, with a LD<sub>50</sub> of 0.017% (w/w) was as toxic as canatoxin [16], whereas both jackbean ureases are three-fold more potent than SBU, with a LD<sub>50</sub> of 0.052% (w/w). Besides lethality, both ureases induced severe detrimental effects in surviving insects, reducing gain in body weight and delaying the developmental stages of nymphs into adults. The insecticidal effect of JBU and SBU was not altered after treating the proteins with *p*-HMB, clearly indicating that this feature is independent of their ureolytic activity (Figs 3 and 4). The lack of insecticidal activity of *Bacillus pasteurii* urease may be explained by its three-chain structure. Part of the region comprising the sequence of the entomotoxic peptide released from canatoxin ([17], patent pending) by insect cathepsins is absent in microbial ureases, corresponding in

Fig. 6. Platelet aggregation induced by ureases. Platelet suspensions were challenged with (A) JBU (■), SBU (△) or (B) BPU (○), and aggregation of platelets was measured turbidimetrically. Data are means ± SEM of at least four independent experiments (*P* < 0.001).





plant ureases to a fragment located between the UreB and UreC chains of *Bacillus pasteurii* urease. Altogether, our findings suggest that insecticidal activity is a characteristic of plant ureases and provide compelling evidence for a possible defense role of these proteins. Additional studies are under way in our laboratory to characterize and to study the mode of action of entomotoxic ureases in order to establish their biotechnological potential against phytophagous insects.

Contrasting with canatoxin, which is highly toxic in rats and mice [11], both JBU and SBU were not lethal to mice when given intraperitoneally (maximal dose tested 20 mg·kg<sup>-1</sup>). Thus, there is no correlation between the insecticidal activity of ureases and the intraperitoneal toxicity in mice, until now a property displayed only by canatoxin. It is plausible to think that this unique feature of canatoxin may be related to its dimeric form, as compared to the hexameric JBU and the embryo-specific SBU, making it more difficult for the larger proteins to be absorbed from the site of injection into the blood stream.

All three ureases studied here shared with canatoxin the ability of inducing activation of rabbit blood platelets [12–15]. JBU and SBU showed similar potency as inducers of platelet aggregation (Fig. 6), with EC<sub>50</sub> = 22.2 and 15.8 µg·mL<sup>-1</sup> for SBU and JBU, respectively. BPU, on the other hand, showed a 20-fold lower potency, with EC<sub>50</sub> of 400 µg·mL<sup>-1</sup>. The time pattern of platelet response to the ureases was very similar, showing a collagen-type shape change reaction. As already described for canatoxin and JBU [15], this activity was retained in *p*-HMB treated SBU confirming it is independent of the enzymatic activity.

These newly described properties of plant and microbial ureases may shed new light on the physiological roles of these proteins in the source organisms. The involvement of plant ureases in the bioavailability of nitrogen is still controversial. Brodzik *et al.* [30] reported no significant alteration in the growth pattern of tobacco plants expressing *Helicobacter pylori* urease, which caused a two-fold increase in the ureolytic activity and an eight-fold increase in ammonia levels of the transgenic plants as compared to controls. However, these authors did not test the transgenic plants for their resistance to insects or phytopathogens. Polacco and Holland [7] have proposed that plant ureases may have a role in plant defense, assuming the released ammonia would have a deleterious effect upon predators. Altogether, our data reinforce the possibility of plant ureases having a protective role through an entirely different mechanism, unrelated to the release of ammonia.

We also compared the kinetic properties of these enzymes on the hydrolysis of urea and susceptibility to different urease inhibitors. Even the highly homologous JBU and SBU (86% identity and 92% similarity in a BLAST analysis) have different susceptibility to inhibition by *p*-HMB, AHA or *p*-BQ. Our data showed that JBU is fivefold more sensitive than SBU to inhibition by AHA, a Ni<sup>+2</sup> and Zn<sup>+2</sup> ions chelator [31], suggesting a different environment for the nickel atoms within the catalytic site. JBU and SBU also showed different susceptibility to two cysteine-reactive urease inhibitors, *p*-HMB [15,32] and *p*-BQ [33].

Taken together, our data show that ureases from plant and microbial sources belong to a group of multifunctional proteins with at least two distinctive domains: a thiol-dependent domain containing the ureolytic active site and a

thiol-independent domain involved in toxic effects in insects (and mice, only for canatoxin) and the activation of blood platelets. Further elucidation of the 3D structures of plant enzymes should provide new insights for understanding the structural basis of the multiple biological effects displayed by ureases.

## Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Procad-CAPES-MEC), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (MCT-FINEP-CNPq).

## References

- Dixon, N.E., Gazzola, C., Blakeley, R.L. & Zerner, B. (1975) Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4131–4133.
- Mobley, H.L. & Hausinger, R.P. (1989) Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization. *Microbiol. Rev.* **53**, 85–108.
- Mobley, H.L., Island, M.D. & Hausinger, R.P. (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* **59**, 451–480.
- Sirko, A. & Brodzik, R. (2000) Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim. Pol.* **47**, 1189–1195.
- Polacco, J.C. & Sparks, R.B. (1982) Patterns of urease synthesis in developing soybeans. *Plant Physiol.* **70**, 189–194.
- Polacco, J.C. & Winkler, R.G. (1984) Soybean leaf urease: a seed enzyme? *Plant Physiol.* **74**, 800–803.
- Polacco, J.C. & Holland, M.A. (1993) Roles of urease in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* **145**, 65–103.
- Goldraj, A., Beamer, L.J. & Polacco, J.C. (2003) Interallelic complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean. *Plant Physiol.* **132**, 1801–1810.
- Witte, C.P., Tiller, S.A., Taylor, M.A. & Davies, H.V. (2002) Leaf urea metabolism in potato. Urease activity profile and patterns of recovery and distribution of N-15 after foliar urea application in wild-type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiol.* **128**, 1129–1136.
- Stebbins, N., Holland, M.A., Cianzio, S.R. & Polacco, J.C. (1991) Genetic tests of the roles of the embryonic ureases of soybean. *Plant Physiol.* **97**, 1004–1010.
- Carlini, C.R. & Guimarães, J.A. (1981) Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon* **19**, 667–675.
- Carlini, C.R., Guimarães, J.A. & Ribeiro, J.M. (1985) Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxigenase pathway. *Br. J. Pharmacol.* **84**, 551–560.
- Barja-Fidalgo, C., Guimarães, J.A. & Carlini, C.R. (1991) Lipoxigenase-mediated secretory effect of canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon* **29**, 453–460.
- Carlini, C.R. & Guimarães, J.A. (1991) Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon* **29**, 791–806.
- Follmer, C., Barcellos, G.B.S., Zingali, R.B., Machado, O.L.T., Alves, E.W., Barja-Fidalgo, C., Guimaraes, J.A. & Carlini, C.R. (2001) 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. *Biochem. J.* **360**, 217–224.
- Carlini, C.R., Oliveira, A.E., Azambuja, P., Xavier-Filho, J. & Wells, M.A. (1997) Biological effects of canatoxin in different

- insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *J. Econ. Entomol.* **90**, 340–348.
17. Ferreira-DaSilva, C.T., Gombarovits, M.E., Masuda, H., Oliveira, C.M. & Carlini, C.R. (2000) Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **44**, 162–171.
  18. Carlini, C.R. & Grossi-de-Sa, M.F. (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon.* **40**, 1515–1539.
  19. Benini, S., Rypniewski, W.R., Wilson, K.S., Miletti, S., Ciurli, S. & Mangani, S. (1999) A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure Fold. Des.* **7**, 205–216.
  20. Spector, T. (1978) Refinement of the Coomassie Blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for  $\leq 0.5$ –50  $\mu\text{g}$  of protein. *Anal. Biochem.* **86**, 142–146.
  21. Blakeley, R.L., Webb, E.C. & Zerner, B. (1969) Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A new purification and reliable rate assay. *Biochemistry* **8**, 1984–1990.
  22. Weber, K. & Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406–4412.
  23. Born, G.V. & Cross, M.J. (1963) The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* **168**, 178–195.
  24. Francischetti, I.M.B., Ribeiro, J.M.C. & Champagne, D. (2000) Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.* **275**, 12639–12650.
  25. Weatherburn, M.W. (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* **39**, 971–974.
  26. Cleland, W.W. (1979) Statistical analysis of enzyme kinetic data. *Meth. Enzymol.* **63**, 103–138.
  27. Lea, P.J., Hughes, J.S. & Milfin, B.J. (1979) Glutamine-dependent and asparagine-dependent protein-synthesis in maturing legume cotyledons cultured *in vitro*. *J. Exp. Bot.* **30**, 529–539.
  28. Thompson, J.F., Madison, J.T. & Muenster, A.E. (1977) *In vitro* culture of immature cotyledons of soya bean (*Glycine max* L. Merr). *Ann. Bot. (London)* **41**, 29–39.
  29. Stebbins, N.E. & Polacco, J.C. (1995) Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiol.* **109**, 169–175.
  30. Brodzik, R., Koprowski, H., Yusibov, V. & Sirko, A. (2000) Production of urease from *Helicobacter pylori* in transgenic tobacco plants. *Cell Mol. Biol. Lett.* **5**, 357–366.
  31. Dixon, N.E., Hinds, J.A., Fihelly, A.K., Gazzola, C., Winzor, D.J., Blakeley, R.L. & Zerner, B. (1980) Jack bean urease (EC 3.5.1.5). IV. The molecular size and the mechanism of inhibition by hydroxamic acids. Spectrophotometric titration of enzymes with reversible inhibitors. *Can. J. Biochem.* **58**, 1321–1334.
  32. Riddles, P.W., Andrews, R.K., Blakeley, R.L. & Zerner, B. (1983) Jack bean urease. 6. Determination of thiol and disulphide content – reversible inactivation of the enzyme by the blocking of the unique cysteine residue. *Biochim. Biophys. Acta* **743**, 115–120.
  33. Zaborska, W., Kot, M. & Superata, K. (2002) Inhibition of jack bean urease by 1,4-benzoquinone and 2,5-dimethyl-1,4-benzoquinone. Evaluation of the inhibition mechanism. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **17**, 247–253.