

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**

**Urease de *Helicobacter pylori*: interação com membranas
de plaquetas**

Adriele Scopel Guerra

**Trabalho apresentado como um
dos requisitos para a obtenção
do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas – Ênfase
Molecular, Celular e Funcional.**

Orientadora: Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Co-orientador: Dr. Deiber Olivera Severo

Porto Alegre, Junho de 2011

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, e com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Membros da Banca Examinadora

Prof. Dr. Guido Lenz

Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências – UFRGS

Dr. Antônio Frederico Michel Pinto

Centro de Biotecnologia, Instituto de Biociências – UFRGS

Prof^a. Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Centro de Biotecnologia, Instituto de Biociências - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha orientadora Célia Carlini pela oportunidade de estagiar no Laprotox e por todo o trabalho de orientação.

Agradeço meu co-orientador Deiber por me acompanhar em todo esse trabalho desde a elaboração do projeto até aos trabalhos de bancada, e também por aguentar minhas teimosias que acompanharam os experimentos e a elaboração desse manuscrito.

Agradeço também aos meus colegas de Laprotox: Augusto, Anne, Angela Piovesan, Ângela Menegassi, Arlete, Diogo, Fernanda, Fernanda Lopes, Helena, Juliana, Karine, Marina, Monica, Mayara, Melissa, Rafael, Rodrigo, Valquiria, Tinoko, Vanessa por tornarem o dia a dia no laboratório mais divertido mesmo nos dias de stress.

Agradeço minha família pelo apoio, carinho e amor em todos os momentos. Principalmente meus pais Sergio e Carmen e meu irmão Gregori que mesmo estando longe estavam sempre dispostos a me ouvir.

Agradeço também meu namorado João por estar ao meu lado o tempo todo, pelo carinho e compreensão, por me buscar e me levar para o campus do vale sempre que preciso...
Te amo!

ÍNDICE

RESUMO.....	6
1 INTRODUÇÃO.....	7
1.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DE UREASES.....	7
1.2 <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	9
1.3 A UREASE DE <i>H. PYLORI</i>	11
1.4 PLAQUETAS E AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	14
1.5 OBJETIVOS.....	17
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
2.1 UREASE DE <i>H. PYLORI</i>	18
2.1.1 <i>Manipulação bacteriana</i>	18
2.1.2 <i>Expressão da HPU</i>	19
2.1.3 <i>Purificação</i>	20
2.2 SUBUNIDADES DA UREASE DE <i>H. PYLORI</i>	21
2.2.1 <i>Manipulação Bacteriana</i>	21
2.2.2 <i>Confirmação da transformação</i>	22
2.2.3 <i>Indução das células para expressão das proteínas</i>	22
2.2.4 <i>Purificação das subunidades recombinantes da HPU</i>	22
2.3 MEDIDA DE CONTEÚDO PROTÉICO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	24
2.3.1 <i>Conteúdo Protéico</i>	24
2.3.2 <i>Detecção de atividade ureásica</i>	24
2.4 ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	24
2.5 WESTERN BLOT.....	25
2.6 ALINHAMENTOS E ESTRUTURA CRISTALOGRAFICA.....	25
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
3 RESULTADOS.....	27
3.1 TRANSFORMAÇÃO, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA UREA E UREB.....	27
3.2 INTERAÇÃO PLAQUETAS UREA E UREB.....	29
3.3 ALINHAMENTOS.....	32
3.4 INTERAÇÃO DA HPU COM PLAQUETAS.....	35
4 DISCUSSÃO.....	36
5 CONCLUSÕES.....	38
6 PERSPECTIVAS PARA A SEQUÊNCIA DESSE TRABALHO.....	39
7 REFERÊNCIAS.....	40

RESUMO

Ureases são enzimas níquel-dependentes que catalisam a hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono. *Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram negativa que parasita o epitélio gástrico humano, e é considerada um fator de risco associado a úlceras gástricas e duodenais por mecanismos que ainda não são bem compreendidos. Estudos mostram, ainda, uma correlação entre a infecção com *H. pylori* e doenças cardiovasculares. A urease produzida por *H. pylori* (HPU) é considerada um fator de virulência, pois sua atividade ureolítica aumenta o pH do meio possibilitando a colonização do epitélio gástrico. Nosso grupo mostrou que HPU induz agregação plaquetária de maneira independente da atividade ureolítica, induzindo a secreção de ADP plaquetária pela via de lipoxigenase. Outros resultados sugerem que a HPU recruta a mesma cascata de sinalização utilizada pelo colágeno na agregação plaquetária. Mostramos aqui que as subunidades de HPU, UreA e UreB não são capazes de induzir agregação em plaquetas de coelho, porém agem como inibidores da agregação plaquetária induzida por indutores clássicos como ADP e colágeno. Além disso nossos resultados indicam que a HPU interage com a glicoproteína VI de membrana (GPVI), que é um conhecido receptor de colágeno. Essa nova capacidade farmacológica de HPU reforça a hipótese de que essa proteína pode desempenhar um importante papel na patogenicidade de doenças cardiovasculares indiretamente causados por *H. pylori*. Outros receptores de membrana, envolvidos na agregação plaquetária, também serão investigados.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura e Função de Ureases

Ureases (uréia amidohidrolases, EC 3.5.1.5) são enzimas níquel-dependentes que catalisam a hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono (Zerner, 1991), a uma taxa 10^{14} vezes mais rápida que a reação não catalisada (Andrews *et al.*, 1984; Mobley *et al.*, 1995). As ureases de vegetais e fungos possuem unidades funcionais compostas por uma única cadeia polipeptídica com aproximadamente 90kDa. Ureases bacterianas, ao contrário das ureases vegetais e fúngicas, são compostas por multímeros de 2 ou 3 complexos de subunidades (Mobley *et al.*, 1995; Sirko & Brodzik, 2000). As ureases bacterianas, vegetais e fúngicas possuem estrutura terciária e mecanismo catalítico semelhantes, mostrando que elas descendem de uma mesma proteína ancestral comum (Mobley *et al.*, 1995; Sirko & Brodzik, 2000). A figura 1 ilustra as diferenças entre ureases vegetais e bacterianas, quanto às suas subunidades.

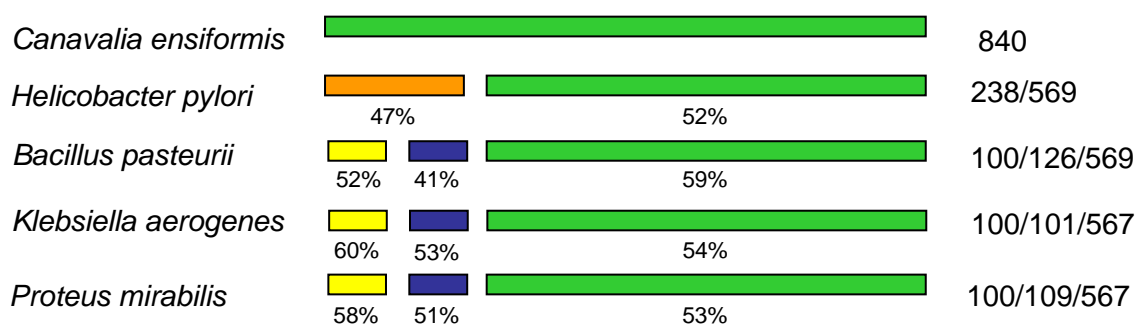


Figura 1. Estrutura das ureases: Ureases vegetais, como a de *Canavalia ensiformis*, possuem apenas um tipo de subunidade, enquanto que as ureases bacterianas possuem dois (*H. pylori*) ou três (*K. aerogenes*; *P. mirabilis*; *B. pasteurii*). O número de aminoácidos de cada subunidade está indicado ao lado direito. A porcentagem de identidade em relação à região correspondente da urease de *C. ensiformis* está indicada abaixo das barras.

Em bactérias, estas enzimas estão envolvidas em vários processos patogênicos, como, por exemplo, em casos de infecção por *Proteus mirabilis*, na formação de cálculos urinários, incrustação de catéter, pielonefrites, e até coma hepático. Na bactéria *Helicobacter pylori*, a urease está relacionada a sobrevivência dela em ambientes de pH desfavorável. Em plantas, essas enzimas estão amplamente distribuídas, no entanto pouco se conhece sobre sua função fisiológica. Uma possível função para urease em plantas superiores seria a biodisponibilização de nitrogênio (Polacco & Holland, 1993). Constatou-se que em plantas e culturas de tecidos vegetais desprovidos de urease, quer induzidos geneticamente, ou com o uso de inibidores de urease ou por remoção do níquel, observa-se um acúmulo de uréia ou um comprometimento do emprego de uréia como fonte de nitrogênio (Polacco & Holland, 1993).

Nosso grupo, desde 2001, demonstra as propriedades da urease independentes da atividade ureolítica (Follmer *et al.*, 2001). Primeiramente descrito para a canatoxina, uma isoforma de ureases de *Canavalia ensiformis* (Carlini *et al.*, 1985), e depois para a urease embrião-específica de soja (*Glycine max*) (Follmer *et al.*, 2004), a urease da bactéria de solo *Bacillus pasteurii* (Olivera-Severo *et al.*, 2006), e finalmente para a urease de *Helicobacter pylori* (Wassermann *et al.*, 2010), demonstramos que mesmo diferindo em suas estruturas quaternárias, todas essas ureases induzem ativação plaquetária. Confirmando dados prévios obtidos para a canatoxina (Ghazaleh *et al.*, 1997), Olivera-Severo *et al.* 2006 caracterizaram a rota de ativação de resposta das plaquetas a urease de *B. pasteurii*, demonstrando o envolvimento da 12-lipoxigenase plaquetária e de canais de cálcio sensíveis a D-metoxiverapamil.

Recentemente, Wassermann *et al.* (2010) demonstram que a urease da bactéria *Helicobacter pylori* também ativa plaquetas e induz agregação pela rota dos eicosanóides através da via da lipoxigenase. Esta ativação é inibida por dexametasona (inibidor de fosfolipase A2) e esculetina (inibidor de lipoxigenase), e na presença de indometacina (inibidor de ciclooxigenases) foi potencializada.

Tabela 1. Envolvimento de fosfolipase A2 e eicosanóides na agregação plaquetária induzida por HPU.

Tratamento		Agregação Plaquetária
		% Média ± DP
Nenhum		100,00 ± 10.24
Dexametasona	(50µM)	62,64 ± 6.06
Esculetina	(500µM)	55,00 ± 6.06
Indometacina	(150µM)	160,74 ± 12.74
	(300µM)	313,26 ± 3,78

(Adaptado de Wassermann *et al.*, 2010)

1.2 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori é uma espiroqueta, gram negativa, microaerófila, com 2,5 a 5,0 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de largura, que possui de 4 a 6 flagelos com aproximadamente 30 µm de comprimento (Goodwin *et al.*, 1990). Essa bactéria infecta a mucosa estomacal de humanos (Yoshiyama & Nakazawa 2000), tendo sido isolada pela primeira vez em 1982 por Marshall e Warren (Marshall & Warren, 1984).

Atualmente, *H. pylori* é reconhecido como um agente etiológico de gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico e duodenal (NIH Consensus Conference, 1994). Estima-se que metade da população mundial esteja infectada por essa bactéria, sendo maior, em torno de 90%, em países com baixas condições sanitárias e baixas condições econômicas (Hopkins 1996; Fischbach 2005).

A infecção por *H. pylori* caracteriza-se pela associação exclusiva dessa bactéria às células da mucosa gástrica, mas não ao epitélio do intestino delgado ou em metaplasia intestinal. A infecção é acompanhada por infiltração de células inflamatórias polimorfonucleares no epitélio, o que não é associado especificamente com modificações metaplásicas e formação de granuloma (Dixon, 1995). A intensidade da inflamação pode ser altamente variável, desde uma infiltração mínima da lâmina própria, com arquitetura glandular intacta, até uma inflamação severa, com formação de micro abscessos (Genta & Graham, 1994). Em geral há degeneração das células epiteliais, com depleção de mucina, vacuolização citoplasmática e desorganização de glândulas da mucosa.

Sugere-se que a transmissão desse microrganismo possa ocorrer a partir de três rotas. A primeira, e menos comum, está relacionada ao contato de pacientes com instrumentos endoscópicos contaminados (Akamatsu *et al.*, 1996). A transmissão fecal-oral é talvez a mais importante. Apesar de *H. pylori* ter sido isolado das fezes de crianças infectadas (Thomas *et al.*, 1992), o isolamento desse microrganismo das fezes não é comum, o que sugere que deva ocorrer descamação gástrica intermitente. Por último, a via de transmissão oral-oral foi identificada em alguns casos na África, onde em certas tribos, as mães pré-mastigam o alimento dos filhos (Megraud, 1995).

Muitos fatores de virulência estão envolvidos no mecanismo patológico da infecção por *H. pylori*, incluindo várias enzimas (urease, catalase, lipase e algumas proteases) e toxinas, como a citotoxina vacuolizante, codificada pelo gene *vacA*, e a proteína imunogênica CagA, codificada pelo gene *cagA*, que estão localizadas na ilha de patogenicidade que expressa o gene PAI. A PAI contém também diversos outros genes responsáveis pela virulência, expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-8) em células epiteliais, e expressão de um conjunto de proteínas formadoras de um sistema de secreção do tipo IV (T4SS) que transporta a proteína CagA para o interior de células eucarióticas (Censini *et al.*, 1996; Figueiredo *et al.*, 2005).

Estudos epidemiológicos mostram que a infecção por *H. pylori* parece também estar associada a patologias não relacionadas ao trato gastrointestinal, como a púrpura trombocitopênica idiopática, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (Mendall *et al.*, 1994; Pellicano *et al.*, 1999; Atherton, 2005; Jin *et al.*, 2007). Os dados disponíveis atualmente ligando *H. pylori* com doenças cardiovasculares são muito conflitantes (Christodoulou *et al.*, 2011) e merecem maior atenção.

1.3 A urease de *H. pylori*

A urease é uma enzima bastante abundante em *H. pylori*, podendo compor de 10% a 15% das proteínas totais dessa bactéria. A urease nativa de *H. pylori* possui massa molecular de aproximadamente 1080 kDa, é uma metaloenzima níquel dependente, de organização quaternária dodecamérica (Ha *et al.*, 2001).

A figura 2 ilustra a estrutura cristalográfica do monômero funcional da urease de *H. pylori*, composto de uma subunidade (UreA [27kDa] e uma subunidade UreB [61kDa]) (Ha *et al.*, 2001) em proporção 1:1 (Dunn *et al.*, 1990; Hu & Mobley, 1990).

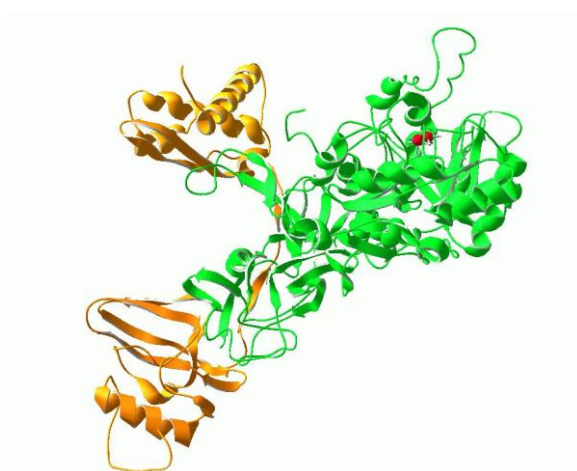


Figura 2. Estrutura cristalográfica do monômero funcional da urease de *H. pylori* (PDB: 1E9Y). A subunidade A aparece em laranja e a subunidade B em verde. Os dois átomos de níquel do sítio ativo da urease, localizado na subunidade B, estão representados como esferas vermelhas.

A afinidade dessa enzima pelo substrato uréia, com um $K_m \sim 0.3 \mu\text{M}$, a torna cataliticamente eficiente nas concentrações submilimolares de uréia presentes nos fluidos humanos (Dunn *et al.*, 1990; Hu & Mobley, 1990).

Foram descritos pelo menos sete genes envolvidos na produção da urease de *H. pylori*. Os genes *ureA* e *ureB* codificam as duas subunidades que compõem a enzima, enquanto que os genes *ureE*, *ureF*, *ureG* e *ureH* codificam proteínas acessórias responsáveis pela incorporação do níquel no centro ativo da urease. O gene *ureI* codifica uma proteína que funciona como um canal na membrana externa da espiroqueta, atuando na internalização da uréia. Além desses genes, uma proteína transportadora de níquel é expressa a partir do gene *nixA* (McGee *et al.*, 1999; Mobley *et al.*, 1995).

O operon da urease de *H. pylori*, contendo os genes estruturais da proteína e genes de proteínas acessórias responsáveis pela montagem do seu metalocentro, foi clonado e expresso em *E. coli*, sendo que a enzima recombinante obtida apresentou atividade ureolítica semelhante ao tipo selvagem (Hu & Mobley, 1993).

A urease de *H. pylori* é considerada um fator de virulência, sendo a sua atividade um marcador utilizado amplamente para fins diagnósticos (Krogfelt *et al.*, 2005). Mutantes de *H. pylori* urease negativos são incapazes de colonizar o estômago de leitões gnotobióticos e tampouco camundongos *nude* (Eaton *et al.*, 1991; Tsuda *et al.*, 1994). Supõe-se que a principal função dessa enzima está relacionada com a formação de um microclima neutro no lúmen gástrico, possibilitando sobrevivência das bactérias em ambientes de pH desfavorável. Inibidores de urease foram utilizados no tratamento de algumas destas patologias, contudo, seu uso foi descontinuado pelo fato de muitos pacientes apresentarem reações colaterais adversas. O uso clínico de ácido acetohidroxâmico, um inibidor de urease, causa depressão na síntese de DNA, afetando a medula óssea, além de ser teratogênico em doses elevadas (Baillie *et al.*, 1986)

A urease de *H. pylori*, assim como a urease de *Canavalia ensiformis* e a urease de *Bacillus pasteurii*, possui a capacidade de induzir agregação em plaquetas de coelho (Olivera-Severo *et al.*, 2006; Wassermann *et al.*, 2010). A agregação induzida por essas proteínas foi testada e se mostra bastante semelhante à induzida por colágeno, e como esse indutor fisiológico, a agregação é dependente da via da 12-lipoxigenase plaquetária (Coffey *et al.*, 2004; Wassermann *et al.*, 2010). A agregação plaquetária induzida pela HPU é independente da atividade ureolítica da proteína, visto que quando exposta a p-hidroxi-mercuro-benzoato, um inibidor irreversível da atividade enzimática, a proteína ainda induz agregação plaquetária.

Na presença da urease, as plaquetas se aderem umas às outras (agregação), sem evidência de lise celular, sendo que a HPU parece se ligar apenas nas plaquetas, e não aos eritrócitos. As plaquetas estimuladas por HPU secretam ATP dos grânulos densos, acompanhado do influxo de cálcio na célula, sendo a cinética da secreção mais lenta e de início posterior ao influxo de cálcio.

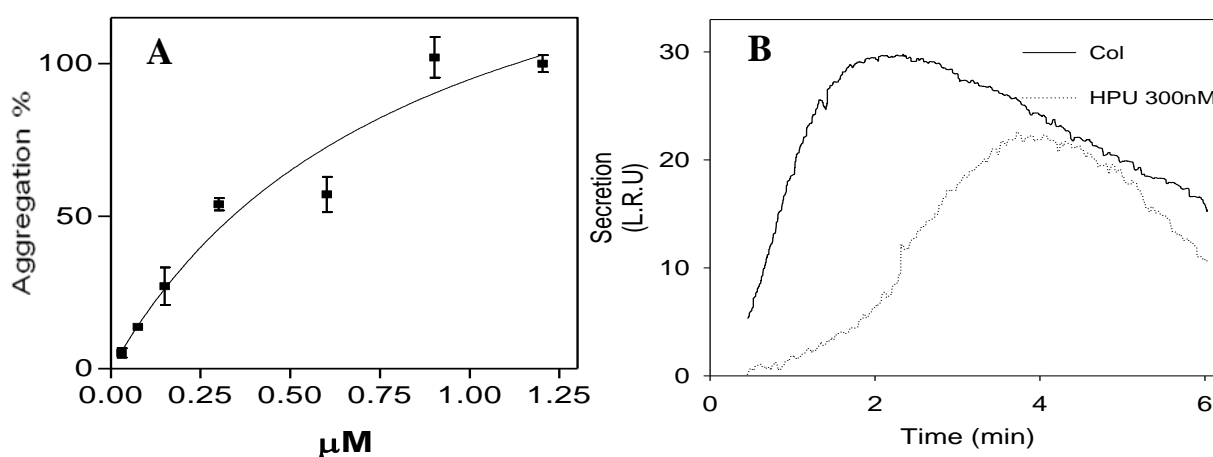


Figura 3. Ativação de plaquetas de coelho induzida pela urease de *H.pylori*. A) Curva dose-efeito da agregação plaquetária induzida por HPU. B) Medida da secreção de ATP (por luminescência) de plaquetas estimuladas por 300 nM HPU e por colágeno. (Adaptada de Wassermann *et al.*, 2010.)

A resposta das plaquetas a ureases, inclusive a HPU, não envolve o fator de agregação plaquetária (PAF, 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina), porém requer abertura de

canais de cálcio voltagem-dependente (Wassermann *et al.*, 2010), e ocorre sem a ativação de fosfolipase C ou produção de inositol trifosfato (IP₃) (Ghazaleh *et al.*, 1997). A agregação plaquetária induzida por HPU é dependente da secreção de ADP (Wassermann *et al.*, 2010), que é armazenado junto com serotonina e ATP nos grânulos densos, e essa secreção requer sinalização através da 12-lipoxigenase plaquetária (Carlini *et al.*, 1985, Barja-Fidalgo *et al.*, 1991). Em 2004, Coffey *et al.* demonstraram que o colágeno e seus peptídeos derivados são capazes de acionar a rota da 12-lipoxigenase em plaquetas. Esses resultados sugerem que a urease e o colágeno podem utilizar a mesma cascata de sinalização para induzir a agregação.

Além de estar envolvida na elevação do pH e formação de micro-clima adequado para a colonização pelo micro-organismo, a HPU, independentemente da atividade ureolítica, apresenta atividade pró-inflamatória, como evidenciada em modelo de edema de pata em camundongos, quimiotaxia de neutrófilos humanos, e proteção contra apoptose de neutrófilos, além de também envolver a indução de 5-lipoxigenase em neutrófilos humanos (Uberti, 2010). Os efeitos biológicos da HPU que se mostram independentes de sua atividade ureolítica são relevantes para a patogênese do *H. pylori*, além de sua contribuição na colonização da mucosa gástrica pela bactéria.

1.4 Plaquetas e agregação plaquetária

Plaquetas são microcélulas anucleadas originadas de megacariócitos. Possuem dois tipos de grânulos: os grânulos densos, que contém ADP, ATP, serotonina, aminas vasoativas e cálcio; e os grânulos-alfa, de conteúdo protéico, com destaque para o fator V, fibrinogênio, vitronectina, trombospondina e o fator de Von Willebrand. Em resposta a agonistas fisiológicos tais como colágeno, trombina, ADP ou PAF, as plaquetas secretam seus grânulos densos, e/ou seus grânulos alfa. Além de respostas do leito vascular aos compostos secretados pelas plaquetas, há mudança de forma (*shape-change*) das plaquetas, que se aderem umas às outras (agregação) e formam um tampão plaquetário, e também adesão das plaquetas à

superfície endotelial e matriz extracelular, fenômenos que compreendem a etapa primária da hemostase.

Plaquetas sanguíneas se revelaram um excelente modelo para se estudar a ação secretagoga da canatoxina e de outras ureases (Carlini *et al.*, 1985; Ghazaleh *et al.*, 1997; Follmer *et al.*, 2004; Olivera-Severo *et al.*, 2006). Estudos prévios do grupo, inicialmente com a canatoxina, e depois estendidos para a urease embrião-específica da soja e a urease de *B. pasteurii*, mostraram que independente da origem, ureases são capazes de ativar plaquetas em concentrações de 10^{-6} a 10^{-8} M. Ureases induzem a exocitose dos grânulos densos, sendo que o ADP liberado causa subsequente a agregação plaquetária. A participação de metabólitos do ácido araquidônico da rota da 12-lipoxigenase, na ativação plaquetária induzida por ureases, foi inferida a partir do efeito de diferentes compostos que são inibidores de enzimas dessa rota (Carlini *et al.*, 1985; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991; Olivera-Severo *et al.*, 2006), e detecção do metabólito 12-HETE formado pelas plaquetas ativadas (Wassermann *et al.*, 2010).

O colágeno é o principal componente da matriz subendotelial e é responsável pela adesão e ativação das plaquetas; para ocorrência desse evento muitos receptores de colágeno estão envolvidos (Clemetson & Clemetson, 2001). Entre todos, a Glicoproteína VI (GPVI), pertencente à superfamília de receptores das imunoglobulinas (Clemetson *et al.*, 1999 e Jandrot-Perrus *et al.*, 2000), desempenha um papel crucial nas respostas das plaquetas ao colágeno.

A GPVI é expressa na superfície das plaquetas como um complexo não-covalente, com uma subunidade sinalizadora, a cadeia γ comum dos imunoreceptores (Jandrot-Perrus *et al.*, 2000; Gibbins *et al.*, 1997). A GPVI participa na adesão das plaquetas ao subendotélio e é responsável pela ativação plaquetária induzida por colágeno, resultando em agregação mediada por difosfato de adenosina (ADP) e por tromboxana A₂, e oferecendo uma superfície

procoagulante para a formação de trombina (Moroi *et al.*,1989; Nieswandt *et al.*, 2001; Nieswandt & Watson, 2003).

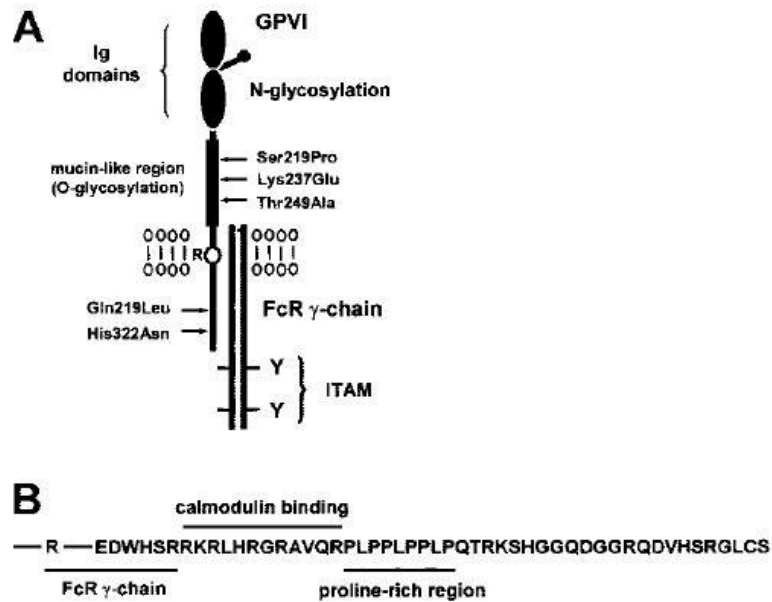


Figura 4. Estrutura do complexo cadeia γ do receptor GPVI/Fc. A GPVI consiste em dois domínios Ig ligados a uma região rica em mucina, que possui numerosos sítios de glicosilação. O domínio transmembrana possui um grupo arginina necessário para associação da cadeia γ através de uma ponte salina. A cauda citosólica consiste de vários domínios, mostrados em B. A cadeia γ do FcR é formada por um homodímero dissulfeto-ligado e possui duas tirosinas em uma seqüência conservada, conhecida como ITAM. A GPVI é altamente polimórfica e os locais que apresentam variações são mostrados. Na cauda citosólica da GPVI estão os locais de interação com a cadeia FcR, calmodulina, e o domínio SH3 de quinases Src. (Adaptada de Nieswandt & Watson, 2003).

1.5 Objetivos

Nosso grupo busca estabelecer as relações estrutura versus função de ureases como proteínas multifuncionais. Nesse trabalho em particular, procuramos estabelecer como a urease de *Helicobacter pylori* interage e ativa plaquetas.

Assim, esse trabalho teve como objetivos:

1. Caracterizar a interação das subunidade UreA e UreB de HPU em plaquetas de coelho, e efeitos dessas na agregação plaquetária induzida por ADP e colágeno;
2. Verificar se a HPU interage com a glicoproteína VI plaquetária, identificando uma etapa comum na sinalização do colágeno e da HPU, resultando na utilização da rota da 12-lipoxigenase.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Urease de *H. pylori*

2.1.1 Manipulação bacteriana

2.1.1.1 Linhagem bacteriana

A linhagem *E. coli* SE5000 [F^- araD193 Δ (argFlac)U169 rpsL150 relA1 ftbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR recA56] foi utilizada como vetor de expressão da urease recombinante de *H. pylori* (gentilmente cedida pelo Prof^o.Dr. Harry L.T. Mobley – University of Michigan Medical School).

2.1.1.1.1 Cultivo bacteriano

O meio de cultura utilizado para o cultivo de *E. coli* foi o Luria-Bertani (LB) (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L, pH 7,0). Para meio sólido, foi adicionado 15g de ágar por litro de meio.

2.1.1.1.2 Vetor plasmidial

O plasmídeo pHP8080 (McGee *et al.*, 1999), contendo o operon da urease de *H. pylori*, foi cedido gentilmente pelo Dr. Harry L.T. Mobley – University of Michigan Medical School, USA. A figura 3 mostra a estrutura do plasmídeo pHP8080.

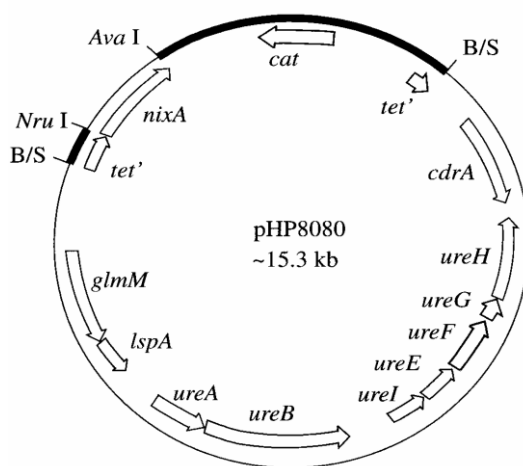


Figura 5. Estrutura do plasmídeo pHP8080, contendo o operon da urease de *H. pylori* linhagem 26695 (*ureABIEFGH*), o gene codificante para proteína transportadora de níquel (*nixA*) e marca de resistência para cloranfenicol (*cat*). Adaptado de McGee *et al.*, 1999.

2.1.2 Expressão da HPU

2.1.2.1 Pré-inóculo

Usando a técnica desenvolvida por *et al.*, 2010, cultivamos as células, preparamos os extratos para a purificação e purificamos a HPU. Em resumo, bactérias congeladas em nitrogênio líquido foram inoculadas em meio de cultura LB com cloranfenicol (20µg/ml). Este pré-inóculo foi cultivado *overnight* (~16 horas) a 37°C, e adicionados 5 ml, na proporção 1:100 v/v, em LB contendo cloranfenicol e Ni₂Cl (1µM). O cultivo foi incubado a 37°C por cerca de 16 horas sob agitação.

2.1.2.2 Preparação de extratos brutos a partir dos cultivos

O cultivo foi centrifugado em Sorvall-Plus RC5b, a 23000 xg, a 4 °C, durante 10 minutos. O material sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em tampão 20 mM NaPB, 5 mM β-mercaptoetanol, 1 mM EDTA, pH 7,0 (PEB). As células suspensas em PEB foram lisadas por ultra-som (Ultrasonic Homogenizer 4710), com 10 pulsos de 30 segundos, em banho de gelo. Esse homogeneizado foi centrifugado a 27000 xg, durante 20 minutos, o precipitado foi descartado. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi submetido a diálise

para retirada do material com baixa massa molecular, usando fita de diálise com corte de 12-14 kDa (Spectra/por Molecular Porus Membrane Tubing, Spectrum Labs.com US) e depois filtrado com filtro para seringa 0,22 μ m (TPP).

2.1.3 Purificação

O método de purificação da HPU recombinante foi desenvolvido por Wassermann *et al.*, 2010.

2.1.3.1 Cromatografia de troca iônica Q-Sepharose

O Extrato bruto foi submetido a cromatografia de troca iônica Q-Sepharose (Amersham Biosciences), na proporção de 1 mL de resina para cada 10 mg de proteína; a resina foi equilibrada em PEB pH 7,0. Após a adsorção da amostra à resina, esta foi lavada com PEB para retirada do material não retido, e então eluída com gradiente descontínuo: 1ª eluição – PEB contendo 100 mM NaCl, pH 7,0; 2ª eluição - PEB com 200 mM NaCl, pH 7,0; 3ª eluição – PEB com 300 mM NaCl, pH 7,0.

2.1.3.2 Cromatografia de troca iônica Source 15-Q

A fração rica em atividade ureolítica oriunda da 2ª eluição da cromatografia em Q-Sepharose foi dialisada, para a retirada do NaCl, e submetida a uma nova cromatografia de troca iônica em coluna Source 15-Q (Amersham Biosciences), esta adaptada em sistema de FPLC (Pharmacia). A coluna foi equilibrada com tampão A (PEB pH 7,5) e o sistema foi programado para gerar um gradiente contínuo de 0% a 25% de tampão B (PEB, 350 mM NaCl, pH 7,5) em 5 mL e um segundo gradiente contínuo de 25% a 75% de tampão B em 20 mL, para eluição da amostra. Após a coleta dos picos cromatográficos, foram realizados ensaios de determinação de atividade ureolítica.

2.1.3.3 Cromatografia de exclusão molecular

A fração rica em urease, obtida na cromatografia de troca iônica Source 15-Q, foi concentrada em membrana com corte de 30 kDa (Amicon, Millipore) e então submetida a cromatografia de gel filtração em coluna Superose 6 (GE Healthcare) equilibrada com PEB, em sistema de FPLC (Pharmacia), obtendo-se assim a urease recombinante purificada.

2.2 Subunidades da Urease de *H. pylori*

2.2.1 Manipulação Bacteriana

2.2.1.1 Linhagem Bacteriana

A linhagem *E. coli* BL21 DE3 RIL [argU (AGA, AGG), ileY (AUA), leuW (CUA)] foi utilizada para a inserção dos vetores pET101, contendo o cDNA da UreA ou o cDNA da UreB (gentilmente cedidos pelo Dr. Cesare Montecucco, da Università di Padova, Itália), com marca de resistência a ampicilina e cloranfenicol, para expressão das subunidades recombinantes da urease de *H. pylori*.

2.2.1.2 Transformação

A preparação de células competentes para transformação seguiu o protocolo adaptado de Sambrook & Russel (2001). As transformações foram feitas por choque térmico e as células transformadas foram plaqueadas em meio de cultura LB após uma hora de recuperação em meio SOC (0,5% extrato de levedura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glicose) a 37 °C.

2.2.2 Confirmação da transformação

Para a confirmação, foram escolhidas 5 colônias de cada placa. As colônias foram incubadas em meio de cultura LB com 100µg/ml de cloranfenicol e ampicilina *overnight* (aproximadamente 16h) a 37 °C. Dessa cultura, 10 µl foram adicionados a água destilada, fervidos por 5 min e centrifugados por 1 min a 1200 xg. O sobrenadante foi utilizado para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com 35 ciclos sendo: 3 min a 94 °C de desnaturação inicial, 30 s a 94 °C de desnaturação, 30 s a 57 °C de anelamento, 60 s a 72 °C de extensão e 10 min a 72 °C de extensão final. Foram utilizados os primers comerciais T7 e T7 Term (Promega). O produto da PCR foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1,2 % para confirmação da clonagem. O gel foi analisado no fotodocumentador Discover (Bio-Rad) com o software Quantity-One.

2.2.3 Indução das células para expressão das proteínas

Células congeladas em nitrogênio líquido foram inoculadas a 37 °C em 2 mL meio de cultura LB com 100 µg/ml de cloranfenicol e 100 µg/ml ampicilina até atingirem a OD de 0,6, quando foram induzidas com 0,5 µM IPTG *overnight* a 37 °C. As células foram então centrifugadas a 2000 xg por 1 min, ao pellet foi adicionado 200 µL de tampão de amostra (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 % SDS, 5 % 2-mercaptoetanol, 10 % glicerol, 0,001 % azul de bromofenol). Após fervura por 10 min, a amostra foi aplicada em um gel 12 % de acrilamida para a confirmação da expressão.

2.2.4 Purificação das subunidades recombinantes da HPU

O procedimento de purificação foi o mesmo para as duas subunidades. As células induzidas foram centrifugados em Sorvall-Plus RC5b, a 12000 g, a 4°C, durante 20 min. O material sobrenadante foi desprezado, as células no precipitado ressuspensas em tampão de

lise (NaPB 20mM, NaCl 500mM, imidazol 5mM, PMSF 1mM e benzamidina 1 mM em pH 7,5) e então submetidas a lise em ultra-som (Ultrasonic Homogenizer 4710), com 20 ciclos de 10 seg. Em seguida, o lisado foi centrifugado a 17000 g por 20 min, e o sobrenadante foi filtrado em filtros para seringa 0,22 μ m (TPP). Esses sobrenadantes foram denominados EBureA e EBureB, conforme a célula de origem, e então submetidos ao(s) próximo(s) passos de purificação.

2.2.4.1 Cromatografia de afinidade em metal imobilizado

O EBureA ou EBureB foram submetidos a cromatografia em resina de afinidade em coluna de níquel imobilizado. Isso foi possível por que o vetor pET101 introduz uma cauda de 6 histidinas na proteína recombinante, e as histidinas tem afinidade por Ni e ficam retidas na resina. Em seguida, a proteína recombinante é eluída da coluna de afinidade utilizando-se um tampão contendo imidazol, que compete com as histidinas da proteína ao se ligar no metal imobilizado na resina.

Os extratos brutos foram submetidos à cromatografia de afinidade em resina Chelating Sepharose Fast Flow (GE) com 100 mM de NiCl₂ imobilizado, e equilibrada em tampão de equilíbrio (NaPB 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM em pH 7,5). Após a etapa de adsorção dos extratos na coluna, a resina foi lavada com tampão de equilíbrio para retirar o material não retido, e em seguida eluída com gradiente descontínuo de Imidazol: 1^a Eluição – Tampão de equilíbrio com 50 mM de imidazol e 2^a Eluição – Tampão de equilíbrio com 300 mM de imidazol. Após a eluição as frações ricas em UreA e UreB foram submetidas a filtração em membrana de 10 kDa (Amicon, Milipore).

2.3 Medida de conteúdo protéico e atividade enzimática

2.3.1 Conteúdo Protéico

A determinação do conteúdo protéico das amostras foi realizada a partir da absorção no ultravioleta em comprimento de onda de 280 nm, utilizando cubetas de quartzo com passo óptico de 1 cm, ou através do método colorimétrico do Coomassie Blue, conforme Bradford, 1976. O coeficiente de extinção molar das subunidades UreA e UreB foi calculado com ProtParam Tool (Expasy <http://expasy.org/>).

2.3.2 Detecção de atividade ureásica

Alíquotas de amostras de todas as etapas de purificação, tanto da HPU como da UreA e UreB, foram incubadas com 10mM de uréia, a 37°C, em tampão PBS 1X pH 7,5 (tampão fosfato 20 mM, 150 mM NaCl pH 7,5). A amônia liberada pela urease foi quantificada colorimetricamente pelo método de fenol-hipoclorito (Weatherburn M.W., 1967), utilizando-se uma curva padrão de sulfato de amônio. Uma unidade enzimática de urease foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de amônia por minuto, em pH 7,5 a 37 °C.

2.4 Ensaio de agregação plaquetária

Seguiu-se a metodologia descrita em Olivera-Severo *et al.*, 2006. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado a partir de sangue de coelho coletado da artéria central auricular, na presença de citrato de sódio na concentração final de 0,313%(p/v). As amostras de sangue foram centrifugadas a 200 xg, por 20 min a 18 °C. A agregação plaquetária e o “shape-change” foram monitorados por turbidimetria, usando Lummi-agregômetro (Chrono-Log Co. Havertown, Pa.), com registro por 10 min.

2.5 Western Blot

Lisados celulares foram desnaturados em tampão de amostra (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 % SDS, 5 % 2-mercaptoetanol, 10 % glicerol, 0,001 % azul de bromofenol) e aquecidos em banho-maria fervente por 1 min. As amostras foram resolvidas em 12 % SDS-PAGE e as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) a 300mA por 60min. Marcadores de massa molecular “Rainbow” (GE Healthcare Amersham) foram utilizados para estimar as massas moleculares. As membranas foram bloqueadas com TTBS (20 mM Tris HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Tween-20, 2,5% caseína) contendo 1% BSA, e como sondas foram usados os seguintes anticorpos policlonais desenvolvidos em coelho, na diluição de 1:10.000: anti-urease β (sc-22742, Santa Cruz Biotecnology) e anti-urease α (sc-21016, Santa Cruz Biotecnology). Após 3 lavagens de 5 min com TTBS, as membranas de PVDF foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (ZyMed, 1:10000) e reveladas pela adição de 0,02 % NBT, 0,03 % BCIP 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,0 5% Tween 20, pH 8,9 .

2.6 Alinhamentos e estrutura cristalográfica

Os alinhamentos foram feitos em parceria com o MSc. Rodrigo Ligabue Braun, do Grupo de Bioinformática Estrutural, CBiot, UFRGS. As sequencias foram obtidas na base de dados de proteínas do National Center for Biotechnology Information - NCBI (Wheeler *et al.*, 2008) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências da UreA e UreB da urease de *H. pylori* foram agrupadas, comparadas com as sequências de 3 peptídeos de colágeno e do colágeno inteiro por alinhamentos múltiplos via ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) disponível em: (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html).

A representação estrutural do dodecâmero da HPU foi realizada por meio do visualizador molecular PyMol 1.3 (Schrödinger, LLC). A estrutura tridimensional da enzima foi obtida do

RSCB Protein Data Bank (Berman *et al.*, 2002), onde encontra-se depositada sob o código 1E9Z (Ha *et al.*, 2001).

2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA com pós-teste Turkey-Kramer utilizando o programa InStat GraphPad e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS

3.1 Transformação, expressão e purificação da UreA e UreB

Os vetores pET101 contendo UreA e UreB foram inseridos em células de *E. coli* BL21 DE3 e em seguida feito a confirmação da clonagem através de uma PCR de colônia em gel de agarose 1,2%, como mostra a figura 6.



Figura 6. Confirmação da transformação bacteriana em Gel de agarose 1,2 %. No poço 1 no poço 20 padrões de tamanho molecular. Nos poços 2 a 6, produto de PCR das células clonadas com o vetor contendo o gene da UreA. Nos poços 7 a 11, produto de PCR das células clonadas com o vetor contendo o gene da UreB. Revelado com brometo de etídeo.

O próximo passo foi a verificação da expressão dessas proteínas recombinantes através de SDS-PAGE e Western blot, como mostram as figuras 7 e 8. Após as confirmações, passamos para a purificação. Enquanto a purificação da UreB na cromatografia de afinidade foi eficiente, observamos ainda a presença de contaminantes no caso da UreA, como mostra a figura 9.

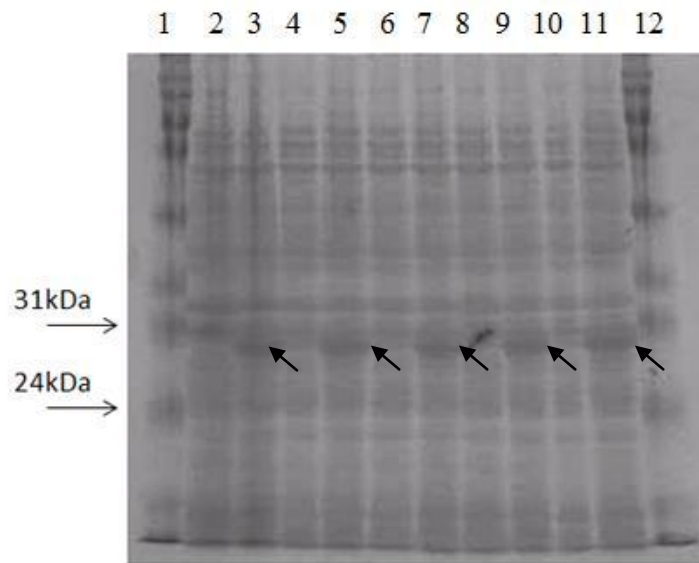


Figura 7. SDS-PAGE mostrando colônias de *E. coli* transformada para UreA, induzidas e não induzidas. Gel de poliacrilamida 12 % mostrando a indução das células com 5 μ M de IPTG. As setas pretas indicam a expressão da UreA, com 27 kDa. Canaletas 1 e 12, padrões de massa molecular Rainbow (GE Healthcare Amersham).

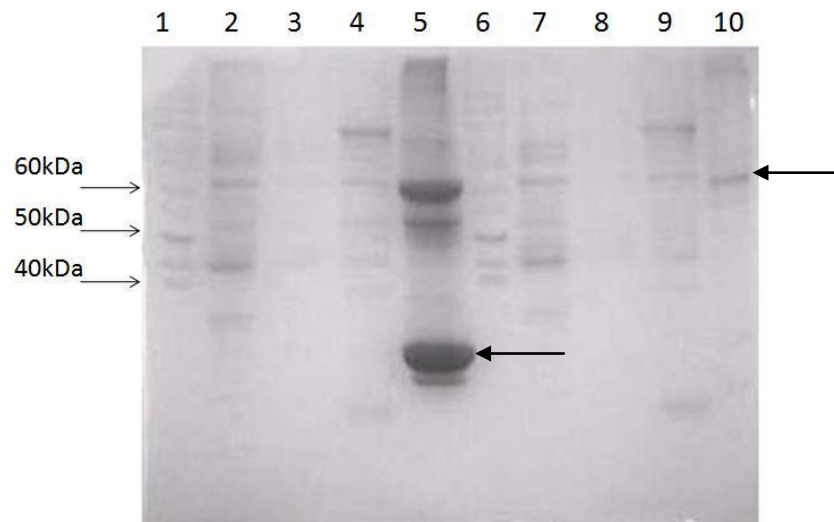


Figura 8. Gel de purificação de UreA e UreB. Em 1 e 6, marcadores de peso molecular. As canaletas 2 e 7 correspondem aos extratos brutos. As canaletas de 2 a 5 mostram diferentes etapas da purificação da UreA, e as canaletas de 7 a 10 representam as diferentes etapas da purificação de UreB. As setas pretas indicam as bandas correspondentes a UreA (27kDa) e UreB (61kDa).

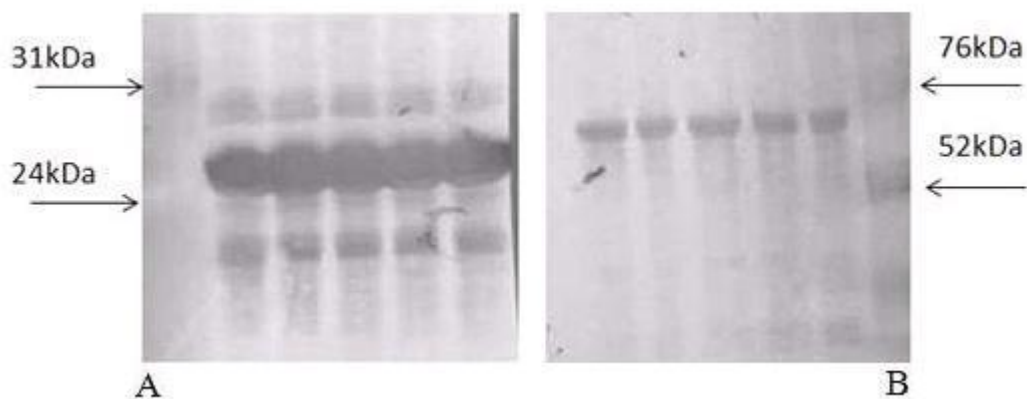


Figura 9. Western Blot de UreA e UreB. Em A, bandas da UreA (27KDa), sendo cada canaleta correspondente a um colônia de bactérias diferente. Em B, bandas da UreB (61kDa), sendo cada canaleta correspondente a uma colônia de bactérias diferente.

3.2 Interação plaquetas UreA e UreB

Afim de verificar qual região da HPU interage com plaquetas, testamos o efeito de cada subunidade em separado para os ensaios de agregação de plaquetas. Testadas em concentrações variando de 30 nM a 3 μ M, a interação das subunidades UreA e UreB recombinantes com plaquetas não resulta em agregação plaquetária, contrastando com os controles positivos, colágeno e ADP (figura 10 e 11). Por outro lado, quando plaquetas foram pré-incubadas por 5 min com a UreA ou a UreB, observamos uma inibição parcial dose-dependente da agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP (figuras 10 e 11), confirmando que essas interagem com a plaqueta, provavelmente interagindo com algum componente da superfície celular.

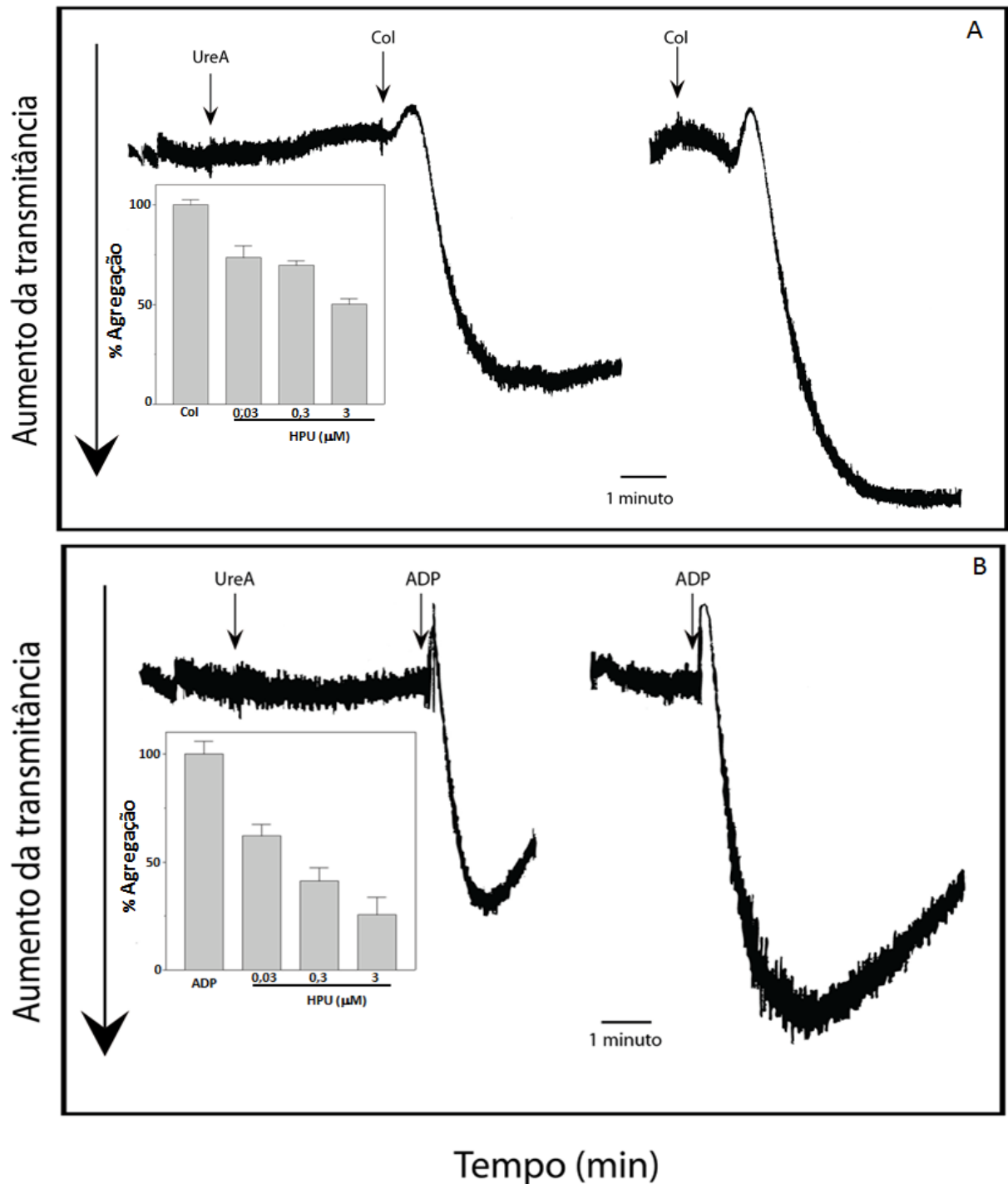


Figura 10. UreA inibe parcialmente a agregação induzida por colágeno (painel A) e ADP (painel B). As plaquetas foram incubadas por 5 min a 37 °C na presença de UreA em concentrações crescentes, conforme indicado. Em seguida, a agregação foi induzida com 5 μg colágeno ou 10 μM de ADP. A agregação foi acompanhada no Lummi-agregometro (na ilustração, doses de 1,5 μM UreA) e em leitor de placas SpectraMax M3 (insets), com leituras a cada 11 s durante 20 min a 650 nm. Os resultados no inset são expressos como a porcentagem de agregação máxima produzida por colágeno ou ADP, para triplicatas. Os dados foram analisados por ANOVA com pós-teste Turkey-Kramer os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Valores de $p < 0,001^{***}$.

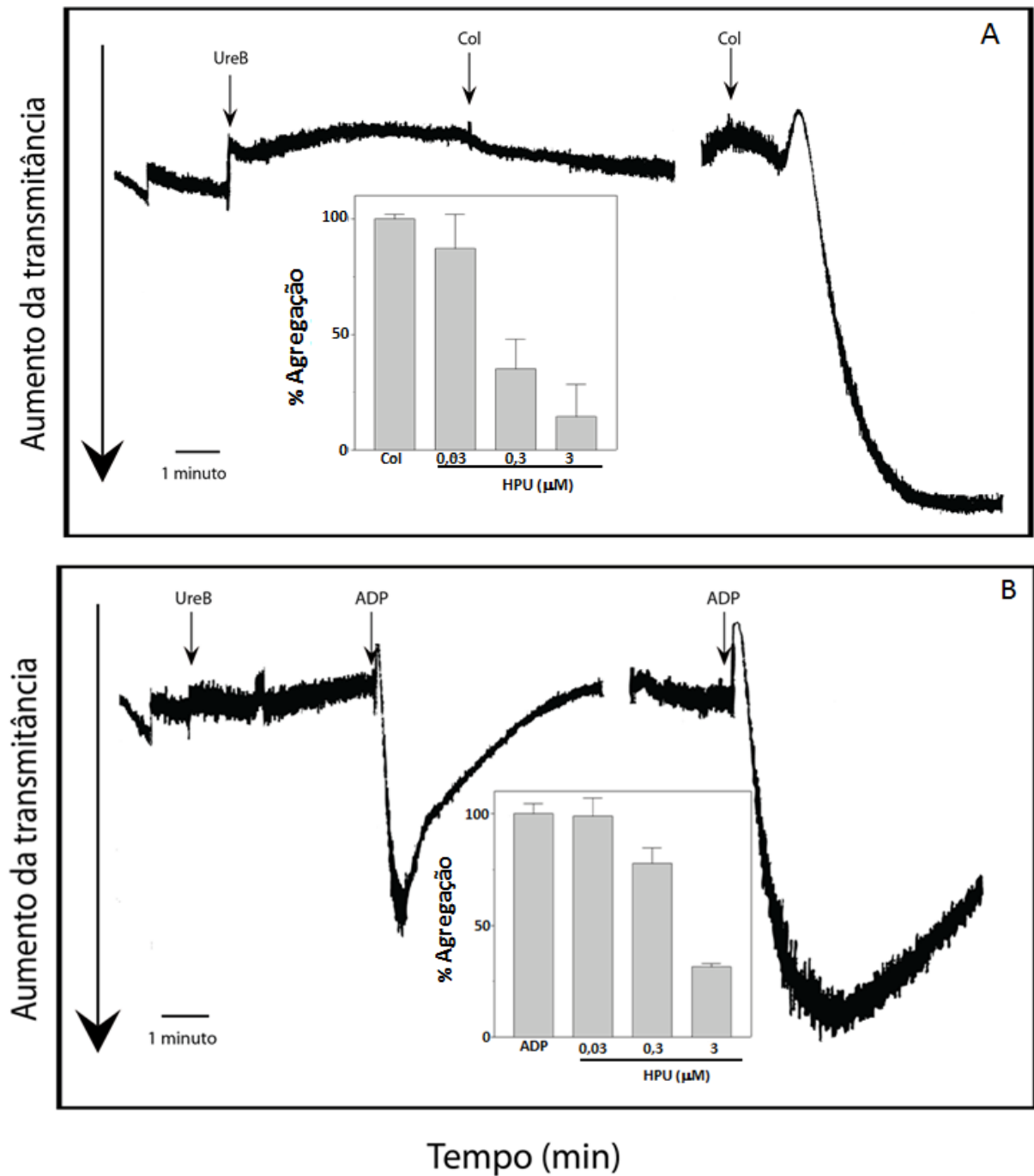


Figura 11. UreB inibe parcialmente a agregação induzida por colágeno (painel A) e ADP (painel B). As plaquetas foram incubadas por 5min a 37°C na presença de UreB em concentrações crescentes, conforme indicado. Em seguida, a agregação foi induzida com 5 μg colágeno ou 10 μM de ADP. A agregação foi acompanhada no Lummi-agregometro (na ilustração, doses de 1,5 μM UreB) e em leitor de placas SpectraMax M3 (insets), com leituras a cada 11 segundos durante 20 min a 650 nm. Os resultados no inset são expressos como a porcentagem de agregação máxima produzida por colágeno ou ADP, para triplicatas. Os dados foram analisados por ANOVA com pós-teste Turkey-Kramer os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Valores de $p < 0,001$ ***.

3.3 Alinhamentos

Com base nos resultados descritos anteriormente, buscamos, através de alinhamentos, possíveis pontos de similaridade das partes expostas da HPU com o colágeno. As sequências das proteínas foram retiradas do NCBI (Wheeler *et al.*, 2008) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e alinhadas com ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html). Foram feitos alinhamentos das subunidades A e B da HPU contra a sequência de colágeno.

```

                10      20      30      40      50      60
COLxxx0      -----
HPU_beta     MKLTPKELDKLMLHYAGELAKKRKEKGIKLNYVEAVALISAHIMEEARAGKKTAAELMQE

Prim.cons.   MKLTPKELDKLMLHYAGELAKKRKEKGIKLNYVEAVALISAHIMEEARAGKKTAAELMQE

                70      80      90      100     110     120
COLxxx0     ---GKPG-----PPG-----PPGPPGPPGPPGP-----
HPU_beta     GRTLLKPDDVMDGVASMIHEVGIEAMFPDGTKLVTVHTPIEANGKLVPGELFLKNEDITI
                **          * *          * *          **
Prim.cons.   GRTL2KP2DVM DGVASMIHEVGIEAMFP2GTKLVTVH2P2222222PG2LFLKNEDITI

                130     140     150     160     170     180
COLxxx0     -PGP-----PGPPG-----PPGP
HPU_beta     NEGKKA VSVK VKNV GDRP VQIGSHFHF FEVNRCLDFDREKTFGKRLDIAAGTAVRFE PGE
                *          * *          * *          **
Prim.cons.   N2G2KAVSVK VKNV GDRP222GSHFHF FEVNRCLDFDREKTFGKRLDIAAGTAVRF2PG2

                190     200     210     220     230
COLxxx0     P-----GKPG-----
HPU_beta     EKSVELIDIGNRRIFGFNALVDRQADNESKKIALHRAKERGFHGAKSDDNYVKTIKE
                * *
Prim.cons.   2KSVELIDIGNRRIFGFNALVDRQADNESKKIALHRAKERG22GAKSDDNYVKTIKE

```

Alignment data :
Alignment length : 238
Identity (*) : 14 is 5.88 %
Strongly similar (:) : 0 is 0.00 %
Weakly similar (.) : 4 is 1.68 %
Different : 220 is 92.44 %
Sequence 0001 : COLxxx0 (37 residues).
Sequence 0002 : HPU_beta (238 residues).

Figura 12. Alinhamento da sequência de aminoácidos da UreA com colágeno. As sequências de aminoácidos foram retiradas do banco de dados do NCBI e o alinhamento foi feito utilizando o software ClustalW.


```
Different : 543 is 95.43 %  
Sequence 0001 : COL_Ax0 ( 37 residues).  
Sequence 0002 : HPU_alpha ( 569 residues).
```

Figura 13. Alinhamento da sequência de aminoácidos da UreB com colágeno. As sequências de aminoácidos foram retiradas do banco de dados do NCBI e o alinhamento foi feito utilizando o software ClustalW.

A partir dos resultados obtidos no alinhamento, construímos uma representação tridimensional da estrutura do dodecâmero de HPU (Figura 14) para localização das regiões de UreA e UreB que apresentam homologia com colágeno, e verificar se estão expostas na superfície da molécula.

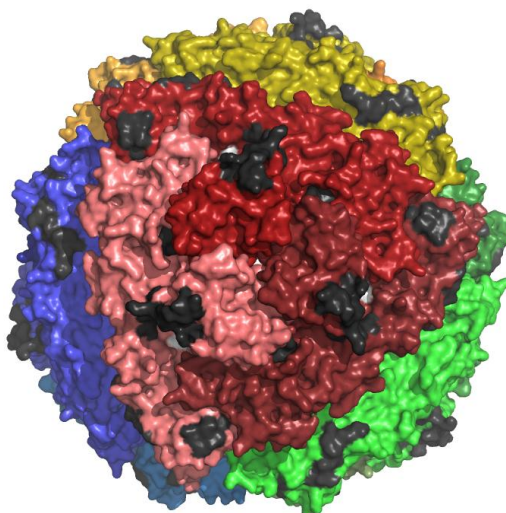


Figura 14. Representação estrutural da HPU. Em preto são mostradas regiões do alinhamento da UreA com o colágeno, e em branco regiões de alinhamento da UreB com o colágeno. As demais cores, cada uma, representa uma unidade funcional (UreA+UreB).

3.4 Interação da HPU com plaquetas

Com base nos resultados de inibição parcial da agregação induzida pelo colágeno pelas subunidades da HPU, as regiões de homologia detectada da HPU com o colágeno, e dados anteriores do grupo mostrando que HPU e colágeno recrutam a 12-lipoxigenase plaquetária, testamos o papel da glicoproteína VI (GPVI), um conhecido receptor plaquetário ao colágeno, na resposta das plaquetas a HPU. Na figura 15 mostramos que, quando as plaquetas são incubadas por 10 min a 37°C na presença do anticorpo anti GPVI, não ocorre agregação induzida por HPU, assim como não há agregação induzida por colágeno.

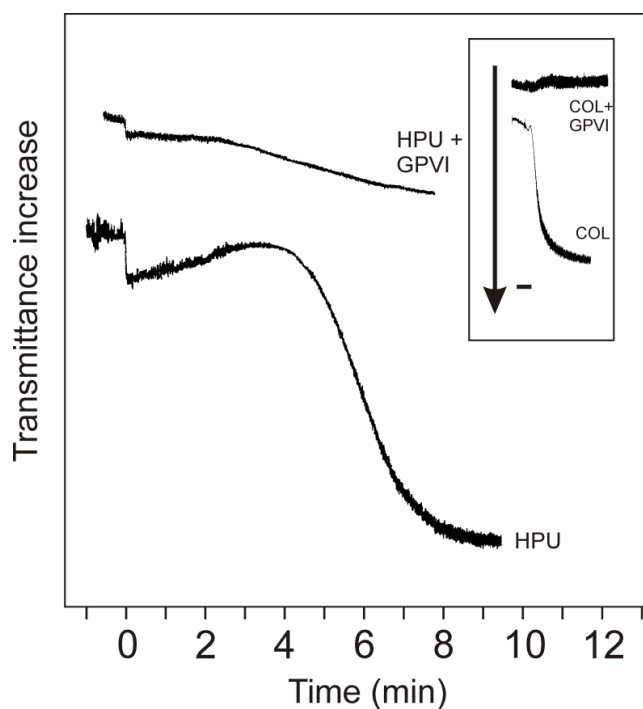


Figura 15. Envolvimento do GPVI na agregação plaquetária induzida por HPU. Agregação plaquetária induzida por HPU (300 nM) ou 20 µg/mL colágeno é completamente abolida na presença do anticorpo anti-GPVI. As plaquetas foram pré-incubadas com anti-GPVI (1 µg/mL) por 10 min a temperatura ambiente sem agitação; depois a agregação foi induzida pela adição de HPU ou colágeno (tempo zero) e foi monitorada turbidimetricamente por 8 min com Lummi-agregômetro (Chrono-Log).

4 DISCUSSÃO

As ureases, apesar de apresentarem organização terciária bastante diversa e serem amplamente distribuídas entre plantas, bactérias e fungos, são altamente conservadas quanto sua estrutura quaternária e mecanismos catalíticos. Nosso grupo tem demonstrado que as ureases vegetais e microbianas compartilham propriedades não enzimáticas, como a capacidade de ativar exocitose, recrutar a rota dos eicosanóides, e apresentar potencial pró-inflamatório (Carlini *et al.*, 1985; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991; Olivera-Severo *et al.*, 2006; Wassermann *et al.*, 2010). Uberti, 2010 mostrou que a HPU tem grande potencial quimiotático, ativa a produção de ROS e retarda a apoptose em neutrófilos, dados sugestivos de que a urease de *H. pylori* pode estar envolvida na patogenicidade dessa bactéria, e não somente com a formação de um microclima que possibilita a sua sobrevivência no ambiente gástrico.

Nesse trabalho produzimos em *E. coli* as subunidades UreA e UreB na forma solúvel e demonstramos que essas são capazes de interagir com as plaquetas, o que evidencia que as proteínas recombinantes adquiriram pelo menos parte do seu enovelamento original. Apesar de não agregarem as plaquetas se adicionadas separadamente, mesmo em concentrações até 10 vezes maiores do que a de dose de HPU que induz agregação plaquetária, as figuras 10 e 11 mostram que UreA e UreB inibem parcialmente a resposta das plaquetas ao colágeno de uma forma dose dependente. Esses dados sugerem que UreA e UreB interagem direta ou indiretamente com o principal receptor de colágeno das plaquetas, a GPVI, bloqueando a interação do agonista com seu receptor.

A resposta das plaquetas ao ADP também é parcialmente inibida na presença de quantidades crescentes das subunidades, e além disso a reação é revertida muito mais rapidamente que quando em condições normais. Nosso grupo demonstrou que a agregação por HPU é dependente de ADP: quando plaquetas são incubadas com apirase, sequestrador de

ADP, a agregação induzida por HPU é fortemente inibida (Wassermann *et al.*, 2011). Pode-se observar no traçado de agregação induzida por ADP na presença das subunidades UreA ou UreB (figuras 10 e 11), que a fase primária da agregação (ação direta do ADP) parece não estar afetada (mesma cinética da reação não inibida). O início abrupto da inibição a meio termo da agregação máxima sugere as subunidades interferem na segunda fase da agregação induzida pelo ADP, caracterizada pelo processo secretagogo que libera os grânulos densos, reduzindo assim a amplitude da resposta das plaquetas ao ADP.

Para entender melhor a interação da urease de *H. pylori* com as plaquetas, partimos para uma análise *in silico*, onde observamos que existem regiões similares entre a HPU e o colágeno. Essas análises foram realizadas primeiramente com as sequências de cada uma das subunidades da urease, e depois reunidas para montar a representação estrutural do dodecâmero de HPU mostrado na figura 14. Para confirmação dessa análise, partimos para testes experimentais com a urease recombinante de *H. pylori*, bem como suas subunidades separadamente.

Dados expostos na figura 15 apontam para a participação de receptores da membrana de plaquetas na ativação e agregação plaquetária induzida por HPU, em particular a glicoproteína VI, uma vez que, quando um anticorpo é utilizado para bloquear este receptor, não há qualquer resposta de ativação das plaquetas em presença da HPU. Nessa condição, sequer a mudança de forma (*shape change*) das plaquetas ativadas por HPU (Wassermann *et al.*, 2010) é observada.

O fato da HPU e do colágeno, um dos principais agonistas fisiológicos de plaquetas, interagirem com a mesma glicoproteína VI na superfície plaquetária e recrutarem a mesma rota de transdução de sinal, envolvendo a 12-lipoxigenase, pode ser altamente relevante, ainda mais em se considerando o potencial pró-inflamatório da HPU. Essas propriedades não enzimáticas da HPU podem estar na base da correlação positiva que estudos epidemiológicos

(Atherton, 2005; Jin *et al.*, 2007) mostram existir entre portadores de *H. pylori* e doenças cardiovasculares.

5 CONCLUSÕES

H. pylori tem grande importância nos estudos relativos à saúde pública mundial por ser um importante patógeno, de dispersão global, associado a doenças do trato digestório e estar indiretamente associado a doenças cardiovasculares tromboembólicas. Nosso grupo vem demonstrando outras funções da HPU como potencial pró-inflamatório, capacidade de ativar e agregar plaquetas através da rota da 12-lipoxigenase, mecanismos que indicam a existência de uma correlação positiva entre a bactéria e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares tromboembólicas como efeito indireto.

Nesse trabalho mostramos que a produção de subunidades recombinantes UreA e UreB em *E. coli* gera cadeias polipeptídicas solúveis e capazes de interagir com plaquetas, apesar de não serem capazes de ativar/agregar plaquetas. Em contra partida, inibem parcialmente a agregação plaquetária induzida por dois importantes agonistas da agregação, colágeno e ADP. Os alinhamentos das sequências dos peptídeos UreA e UreB identificam regiões homólogas ao colágeno, presentes na superfície tridimensional da HPU, evidenciadas na inibição da ativação por HPU quando na presença do anticorpo anti-GPVI, principal receptor de colágeno em plaquetas. Esse fato indica que a HPU compartilha receptores de membrana e provavelmente rotas de sinalização com o colágeno; o conjunto destes resultados aponta para uma importante participação da urease de *H. pylori* em processos fisiopatológicos por um mecanismo diferente da sua atividade enzimática. Estas contribuições são relevantes na elucidação dos mecanismos de virulência e no desenvolvimento de patologias causadas por e/ou “atribuídas” ao *H. pylori*.

6 PERSPECTIVAS PARA A SEQUÊNCIA DESSE TRABALHO

- Caracterizar a ligação das UreA e UreB recombinantes com o receptor GPVI: estequiometria, afinidade, reversibilidade, competição com HPU e colágeno, ativação da 12-lipoxigenase e quinases, etc
- Verificar a participação de outros receptores de colágeno na agregação plaquetária induzida por urease de *H. pylori*.
- Verificar se UreA e UreB recombinantes possuem (ou interferem em) outras propriedades biológicas da HPU, em particular seus efeitos pro-inflamatórios: edema de pata em camundongos, quimiotaxia, inibição de apoptose e produção de ROS de neutrófilos, etc.

7 REFERÊNCIAS

1. Akamatsu, T., Tabata, K., Hirong, M., Kawakami, H., & Uyeda, M. (1996). Transmission of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. *Am. J. Infect. Control* 24, 396-401.
2. Andrews R. K., Blakeley R. L., Zerner B., 1984. Urea and urease. *Adv. Inorg. Biochem.* 6, 245–283.
3. Atherton, J.C. (2005). The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annual Review of Pathology* 1, 63-96.
4. Bailie, N.C. et al. (1986). Teratogenic effect of acetohydroxamic acid in clinically normal beagles. *American Journal of Veterinary Research* 47(12), 2604-11.
5. Barja-Fidalgo, C., Guimarães, J.A., & Carlini, C.R. (1991). Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon* 29, 453-460.
6. Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G. L., Iype, L., Jain, S., Fagan, P., Marvin, J., Padilla, D., Ravichandran, V., Schneider, B., Thanki, N., Weissig, H., Westbrook, J. D., Zardecki, C. (2002) The Protein Data Bank. *Acta Cryst.* D58, 899-907.
7. Carlini, C.R., Guimaraes, J.A., & Ribeiro, J.M. (1985). Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. *Br. J. Pharmacol.* 84, 551-560.
8. Censini S, Lange C, Xiang Z. et al. (1996). Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci*; 93: 14648-14653.

9. Christodoulou, D.K., Milionis, H.J., Pappa, P., Katsanos, K.H., Sigounas, D., Florentin, M., Elisaf, M., Tsianos, E.V. (2011) Association of *Helicobacter pylori* infection with cardiovascular disease: is it just a myth? Eur J Intern Med 22, 191-1994.
10. Clemetson, J.M., Polgar, J., Magnenat, E., Wells, T.N., Clemetson K.J. (1999). The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and natural killer receptors. J Biol Chem 274, 29019-29024.
11. Clemetson, K.J. & Clemetson, J.M. (2001). Platelet collagen receptors. Thromb Haemost 86, 189-197.
12. Coffey M.J., Jarvis G.E., Gibbins J.M., Coles B., Barrett N.E., Wylie O.R., O'Donnell V.B. (2004) Platelet 12-lipoxygenase activation via glycoprotein VI – involvement of multiple signaling pathways in agonist control of H(P)ETE synthesis. Circulation Res. 2004; 94: 1598–605.
13. Dixon, M.F. (1995). Histological responses to *Helicobacter pylori* infection: gastritis, atrophy and preneoplasia. Baillieres Clin. Gastroenterol. 9, 467-486.
14. Dunn, B.E., Campbell, G.P., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J. (1990). Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. J. Biol. Chem. 265, 9464-9469.
15. Eaton, K.A., Brooks, C.L., Morgan, D.R., Krakowka, S. (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. Infect. Immun. 59, 2470-2475.
16. Figueiredo, C., Machado, J. C. & Yamaoka, Y. (2005). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter, 10 (Suppl. 1), 14–20.
17. Fischbach, W., Chan, A. O. O., Wong, B. C. Y. (2005) *Helicobacter pylori* and gastric malignancy. Helicobacter, Supplement 10, 34-39.

18. 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.
19. Follmer C, Real-Guerra R, Wasserman GE, Olivera-Severo D, Carlini CR. (2004a). Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur J Biochem.* 271, 1357-63.
20. Genta, R.M. & Graham, D.Y. (1994). Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of *Helicobacter pylori*: a topographic study of *H. pylori* density and distribution. *Gastrointest. Endosc.* 40, 342-345.
21. Ghazaleh, F.A., Francischetti, I.M., Gombarovits, M.E.C., Carlini, C.R. (1997) Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin: methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP. *Arch. Biochem. Biophys.* 339, 362–367.
22. Gibbins, J.m., Okuma, M., Farndale, R., Barnes, M., Watson. S.P. (1997). Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett* 413, 255-259.
23. Goodwin, C.S., Armstrong, J.A. (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9,1-13.
24. Ha, N.C., Oh, S.T., Sung, J.Y., Cha, K.A., Lee, M.H., Oh, B.H. 2001. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature structural biology.* 8, 505- 509.
25. Hopkins, R. J., Girardi, L. S., Turney, E. A. (1996) Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and reduced duodenal and gastric ulcer recurrence: A review. *Gastroenterology* 110, 1244-1252.

26. Hu, L.T. & Mobley, H.L. (1990). Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 58, 992-8.
27. Hu, L.T. & Mobley, H.L. (1993). Expression of catalytically active recombinant *Helicobacter pylori* urease at wild-type levels in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 61, 2563-69.
28. Jandrot-Perrus, M., Busfield, S., Lagrue, A.H., Xiong, X., Debili, N., Chickering, T., Le Couedic, J.P., Goodearl, A., Dussault, B., Fraser, C., Vainchenker, W., Villeval, J.L. (2000). Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 96, 1798-1807.
29. Jin SW, Her SH, Lee JM, Yoon HJ, Moon SJ, Kim PJ, Baek SH, Seung KB, Kim JH, Kang SB, Kim JH, Kim KY. (2007). The association between current *Helicobacter pylori* infection and coronary artery disease. *The Korean journal of internal medicine* 22,152-6.
30. Krogfelt, K. A., Lehours, P. & Mégraud, F. (2005). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 10 (Suppl. 1), 5–13.
31. Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G., 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
32. Marshall, B.J. & Warren, J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1, 1311-1315.
33. McGee, D.J., May, C.A., Garner, R.M., Himplsl, J.M., Mobley, H.L. (1999). Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. *J Bacteriol.* 181(8):2477-84.
34. Megraud, F. (1995). Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9 (Suppl 2), 85-91.

35. Mendall M.A., Goggin, P.M., Molineaux, N., Levy, J., Toosy, T., Strachan, D., Camm, A.J., Northfield, T.C. (1994) Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. Br. Heart J. 71: 437–9.
36. Mobley, H.L., Island, M.D., Hausinger, R.P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. Microbiol Rev. Sep; 59 (3):451-80.
37. Moroi, M., Jung, S.M., Okuma, M., Shinmyozu, K. (1989). A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. J Clin Invest 84, 1440-1445.
38. National institute of Health – Consensus Conference. (1994). *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. JAMA; 272:65-9.
39. Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J.W., Zirngibl, H., Fässler, R. (2001). Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. Embo J 20, 2120-2130.
40. Nieswandt, B. & Watson S.P. (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? Blood 102, 449-461.
41. Olivera-Severo, D., Wassermann, G. E., Carlini, C. R. (2006a) Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria?. Braz. J. Med. Biol. Res. 39, 851 - 861.
42. Olivera-Severo, D., Wassermann, G. E., Carlini, C. R. (2006b) *Bacillus pasteurii* urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. Arch. Biochem. Biophys. 452, 149 – 155.
43. Pellicano, R. (1999). *Helicobacter pylori*: from the stomach to the heart. European Journal of Gastroenterology & Hepatology 11(11), 1335-7.

44. Polacco, J.C. & Holland, M.A. (1993). Roles of Urease in Plant-Cells. *Int Rev Cytol.* 145, 65-103.
45. Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular Cloning*. 3^a ed. 3 vol. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
46. Sirko, A. & Brodzik, R. (2000) Plant ureases: Roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica* 47, 1189-1195.
47. Schrödinger, L.L.C. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3.
48. Thomas, J.E., Gibson, G.R., Darboe, M.K., Dale, A., Weaver, L.T. (1992). Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 340, 1194-1195.
49. Tsuda, M., Karita, M., Mizote, T., Morshed, M.G., Okita, K., & Nakazawa, T. (1994). Essential role of *Helicobacter pylori* urease in gastric colonization: definite proof using a urease-negative mutant constructed by gene replacement. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 6 (Suppl 1), S49-S52.
50. Uberti, A.F. (2010). Urease de *Helicobacter pylori*: ativação de plaquetas e neutrófilos. Tese (Biologia Molecular e Celular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
51. Wassermann, G. E., Olivera-Severo, D., Uberti, A. F., Carlini, C. R. (2010). *Helicobacter pylori* urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14, 2025 - 2034.
52. Wheeler D. L., Barrett T., Benson D. A., Bryant S. H., Canese K., Chetvernin V., Church D. M., Dicuccio M., Edgar R., Federhen S., Feolo M., Geer L. Y., Helmberg W., Kapustin Y., Khovayko O., Landsman D., Lipman D. J., Madden T. L., Maglott D. R., Miller V., Ostell J., Pruitt K. D., Schuler G. D., Shumway M., Sequeira E., Sherry S. T., Sirotkin K., Souvorov A., Starchenko G., Tatusov R. L., Tatusova T. A., Wagner L., Yaschenko E.

- (2008). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 36 (D), 13-21.
53. Yoshiyama, H., Nakazawa, T. (2000) Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes and Infection* 2, 55-60.
54. Zerner B., 1991. Recent advances in the chemistry on an old enzyme, urease. *Bioorg. Chem.*, 19, 116-131.