

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

**PAPEL DE UREASES NA NODULAÇÃO DE *Glycine max*
POR *Bradyrhizobium japonicum***

Mônica de Medeiros Silva

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Célia R. Carlini
Co-orientador: Joseph C. Polacco

Porto Alegre, Novembro de 2012

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto
Laboratório de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biociências
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dra. Rose Adele Monteiro
Núcleo de Fixação de Nitrogênio, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Paraná

Prof^a. Dra. Adriana Silva Hemerly
Instituto de Bioquímica Médica
Universidade Federal do Rio de Janeiro

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Proteínas Tóxicas, do Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências da UFRGS, sob orientação da Prof^ª. Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini, e no Departamento de Bioquímica da Universidade de Missouri (Columbia – MO, EUA), sob orientação do Dr. Joseph C. Polacco e do Dr. David Emerich. O trabalho realizado teve suporte financeiro da CAPES, CNPq e FAPERGS.

DEDICO

Ao meu pai.

Aos meus sobrinhos, por alegrarem meus dias.

AGRADEÇO

À minha família, pelo carinho e apoio;

Aos amigos do LAPROTOX, por me ajudarem desde o primeiro dia que entrei no laboratório e pelos momentos de descontração;

Aos amigos da Biologia, aos amigos da Fitossanidade e aos amigos não ligados à UFRGS, sou muito grata por tê-los em minha vida;

Aos amigos que fiz nos EUA, por me ajudarem a enfrentar um longo ano longe de casa e por me fazerem querer voltar;

À Dara, the best roommate ever;

Ao Dr. Emerich, ao Kent, à Nicole e à Elizabeth, pelo aprendizado e, principalmente, pelo carinho com que me receberam;

À Dra. Luciane Passaglia, por sempre estar disposta a ajudar;

Ao Luciano e à Silvia, pelo auxílio sempre que necessário;

Ao meu co-orientador Joe Polacco, pelos ensinamentos e pelo auxílio durante o estágio sanduíche;

À minha orientadora Célia Carlini, pelos ensinamentos, pela dedicação e pela confiança. Muito obrigada por essa oportunidade.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Aspectos estruturais das ureases	15
1.2. Atividades biológicas das ureases	20
1.3. Atividades biológicas independentes da atividade enzimática	23
1.4. Ureases no solo	27
1.5. Fixação Biológica de Nitrogênio	28
1.6. Simbiose entre soja e <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	29
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Material vegetal e condições de germinação	34
3.2. Estirpes de <i>B. japonicum</i> e meios de cultura para cultivo bacteriano	34
3.3. Utilização de fontes de nitrogênio e carbono por <i>B. japonicum</i>	36
3.4. Construção dos mutantes de <i>B. japonicum</i>	37
3.5. Otimização da expressão da urease de <i>B. japonicum</i>	38
3.6. Atividade ureásica	38
3.7. Inibição da atividade enzimática da urease	39
3.8. Purificação da urease de <i>B. japonicum</i>	40
3.9. Obtenção das ureases vegetais	41
3.10. SDS-PAGE	42

3.11. Determinação do conteúdo proteico	43
3.12. Ensaio de agregação plaquetária	43
3.13. Ensaio de quimiotaxia	44
3.14. Ensaio de nodulação	45
3.15. Avaliação da atividade da nitrogenase	46
3.16. Determinação do conteúdo de leghemoglobina	46
3.17. Microscopia eletrônica de transmissão	47
3.18. Análise estatística	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Seleção da estirpe e otimização da expressão da urease de <i>B. japonicum</i>	49
4.2. Purificação da urease de <i>B. japonicum</i>	53
4.3. Caracterização dos mutantes de <i>B. japonicum</i>	57
4.4. Efeito quimiotático de ureases sobre <i>B. japonicum</i>	64
4.5. Ensaio de nodulação	69
5. DISCUSSÃO FINAL	79
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
8. ANEXOS	103

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Absorbância

BJU – Urease de *Bradyrhizobium japonicum*

BPU – Urease de *Bacillus pasteurii*

CNTX – Canatoxina

eSBU – Urease embrião-específica de soja

GST – Glutathione S-transferase

HPU – Urease de *Helicobacter pylori*

JBU – Jackbean (*Canavalia ensiformis*) urease

KAU – Urease de *Klebsiella aerogenes*

kDa – Quilodaltons

LegHb – Leghemoglobina

ρ -HMB – ρ -hidroximercuriobenzoato

PPD – Fenilfosforodiamidato (Phenylphosphorodiamidate)

OD – Optical density (Densidade ótica)

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RPM – Rotações por minuto

SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida para eletroforese com docecil-sulfato de sódio

UFC – Unidades formadoras de colônias

uSBU – Urease ubíqua de soja

LISTA DE FIGURAS

1. Estrutura das ureases.	16
2. Modelo hipotético de ativação das ureases.	19
3. Desenho esquemático das etapas iniciais de formação do nódulo radicular.	30
4. Desenho esquemático do desenvolvimento do nódulo radicular.	32
5. Câmara de Boyden.	44
6. Atividade da urease de <i>B. japonicum</i> em função do tempo de cultivo.	52
7. Perfil de eluição na troca iônica em Q-Sepharose.	54
8. Perfil de eluição da cromatografia de troca iônica Source 15-Q.	55
9. Agregação plaquetária induzida por colágeno ou pela urease de <i>B. japonicum</i> .	56
10. Ilustração esquemática da inserção de Can^r em <i>ureABC</i> e <i>ureG</i> de <i>B. japonicum</i> .	58
11. Confirmação dos mutantes por PCR.	59
12. Atividade ureolítica de <i>B. japonicum</i> tipo-selvagem e mutantes.	60
13. Crescimento de <i>B. japonicum</i> , tipo selvagem (Bj110) e mutantes (ΔureG e ΔureABC), em diferentes fontes de nitrogênio.	63
14. Multiplicação de <i>B. japonicum</i> , tipo-selvagem e mutantes.	64
15. Curva dose-resposta de quimiotaxia induzida pela urease ubíqua de soja (uSBU) ou pela glutatona-S-transferase (GST) sobre <i>B. japonicum</i> .	66
16. Efeito da atividade ureolítica na quimiotaxia de <i>B. japonicum</i> sobre ureases vegetais.	67
17. Quimiotaxia de estirpes de <i>B. japonicum</i> tipo-selvagem e mutantes.	68
18. Resposta quimiotática de <i>B. japonicum</i> USDA110 sobre diferentes compostos.	69
19. Ensaio de nodulação.	71
20. Influência da atividade ureolítica na nodulação de soja por <i>B. japonicum</i> .	73
21. Conteúdo de leghemoglobina (LegHb) em nódulos 21 dias após a inoculação.	75
22. Conteúdo de leghemoglobina em função do tempo de inoculação.	76
23. Atividade da Nitrogenase.	77
24. Microscopia eletrônica de transmissão	78

LISTA DE TABELAS

1. Composição do meio de cultura arabinose-gluconato (AG).	35
2. Composição do meio mínimo (MM).	35
3. Composição do meio de cultura extrato de levedura-manitol (YM).	36
4. Primers utilizados neste estudo.	37
5. Atividade enzimática da urease em estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	49
6. Resposta de <i>B. japonicum</i> , em relação à atividade da urease, à adição de Ni e ureia ao meio de cultura.	51
7. Resposta de <i>B. japonicum</i> , em relação à atividade da urease, à adição de Ni ou ureia ao meio de cultura.	51
8. Purificação da urease de <i>B. japonicum</i> .	55
9. Crescimento em diferentes fontes de carbono.	61

RESUMO

Ureases (EC 3.5.1.5.) catalisam a hidrólise de ureia em NH_3 e CO_2 , sendo sintetizadas por plantas, fungos e bactérias. No solo, a urease é encontrada em microrganismos, raízes de plantas e como uma enzima extracelular ligada a compostos orgânicos e inorgânicos. Em plantas e fungos, as ureases consistem em trímeros ou hexâmeros formados por uma subunidade de 90 kDa, enquanto que enzimas bacterianas são complexos com duas ou três subunidades. A inserção de dois átomos de níquel no sítio ativo requer pelo menos três proteínas acessórias, UreD, UreF e UreG em bactérias, ou seus ortólogos em plantas e fungos. *Bradyrhizobium japonicum* é uma bactéria do solo que forma nódulos fixadores de nitrogênio em plantas de soja. Esse microrganismo produz uma urease, e seu papel na sinalização, tanto para a planta de soja quanto para outros organismos no complexo ambiente da rizosfera, ainda não foi investigado. Desta forma, o presente estudo objetivou purificar e caracterizar a urease de *B. japonicum* (BJU), bem como avaliar o papel desta enzima, tanto a de origem vegetal quanto a de origem bacteriana, no processo de nodulação da soja. A capacidade da enzima em induzir exocitose/secreção foi avaliada no teste de agregação plaquetária, utilizando-se plasma rico em plaquetas obtido de sangue de coelho e monitorando-se a agregação por turbidimetria. Observamos que a urease de *B. japonicum* possui a propriedade de agregar plaquetas, implicando em uma provável atividade indutora de exocitose. Ensaios de quimiotaxia demonstraram a atração exercida pela urease ubíqua recombinante de soja sobre células de *B. japonicum*. Para os ensaios de nodulação, sementes pré-germinadas de soja tipo-selvagem (Williams 82) e de mutantes deficientes na proteína urease (*eu1-sun/eu4*) foram expostas a culturas de *B. japonicum* USDA110 (tipo selvagem), *B. japonicum* Δ ureG

(ausência de atividade ureásica) ou *B. japonicum* $\Delta ureABC$ (ausência de urease), e semeadas em vasos de Leonard modificados. Os nódulos foram contados e pesados em diferentes tempos após a inoculação. Além disso, foi determinado o conteúdo de leghemoglobina destes nódulos e o conteúdo de nitrogênio na parte aérea das plantas, como uma maneira de estimar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio. Plantas deficientes em urease formam nódulos maiores e em menor número que as selvagens, independente do fenótipo da bactéria. O pico de produção de leghemoglobina em plantas tipo-selvagem é maior e anterior ao pico observado nas plantas mutantes. Inibição de toda a atividade enzimática de urease nas plantas selvagens pelo inibidor fenilfosforodiamidato não causou as alterações observadas pela ausência da proteína urease nas plantas mutantes. Esses resultados sugerem que o desenvolvimento do nódulo em plantas requer a proteína urease, de maneira independente de sua atividade enzimática. Em contraste, a urease da bactéria parece não influenciar a nodulação ou a fixação biológica de N_2 na planta. Concluimos que a urease da soja apresenta um papel relevante na simbiose planta - *B. japonicum*, independente de sua atividade ureolítica, e não compartilhado com a urease bacteriana.

ABSTRACT

Ureases (EC 3.5.1.5.) catalyze the hydrolysis of urea in NH_3 and CO_2 , and are synthesized by plants, fungi and bacteria. In the soil, urease occurs in microorganisms and plant roots, and as an extracellular enzyme bound to organic and inorganic compounds. In plants and fungi, ureases consist of trimers or hexamers formed by a subunit of 90 kDa, whereas bacterial enzymes are complexes with two or three subunits. The insertion of two nickel atoms into the active site requires at least three accessory proteins, ureD, ureF, and ureG in bacteria, or their orthologs in plants and fungi. *Bradyrhizobium japonicum* is a soil bacterium that forms nitrogen fixing nodules on soybean plants. This bacterium produces a urease, and its role in signaling for both the soybean plant and other organisms in the complex environment of the rhizosphere, has not yet been investigated. Thus, the present study aimed to purify and characterize *B. japonicum* urease (BJU), and to evaluate the role of this enzyme, from both plant and bacteria, in the process of soybean nodulation. The induction of secretion was assessed by the ability of the enzyme to induce platelet aggregation in rabbit platelet-rich plasma monitored by turbidimetry. We found that the urease of *B. japonicum* possesses the property of aggregating platelets, implying a secretion inducing activity. Chemotaxis assays demonstrated the attraction of recombinant soybean ubiquitous urease upon *B. japonicum* cells. For nodulation assays, pre-germinated seeds of wild-type soybeans (Williams 82) and of mutants deficient in the urease protein (*eu1-sun/eu4*) were exposed to cultures of *B. japonicum* USDA110 (wild-type), *B. japonicum* Δ ureG (lack of urease activity) or *B. japonicum* Δ ureABC (no urease), and planted in modified Leonard jars. The nodules were counted and weighed at different times after inoculation. Additionally, we determined the leghemoglobin content of nodules and

the nitrogen content in the shoots, as a way to estimate the efficiency of biological nitrogen fixation. Plants deficient in urease (*eu1-sun/eu4*) form fewer but larger nodules than wild-type plants, regardless of the phenotype of the bacteria. The peak of leghemoglobin production in wild-type plants is higher and earlier than the peak observed in mutant plants. Inhibition of all the enzymatic activity of urease in wild-type plants by phenylphosphorodiamidate did not result in the alterations seen in mutant plants lacking urease. These results suggest that the development of nodule requires the protein urease, but not its enzyme activity. In contrast, the bacterial urease seems to play no roles in the nodulation and biological N₂ fixation in the plant. We conclude that the soybean urease plays an important role in the soybean - *B. japonicum* symbiosis, which is independent of its ureolytic activity and is not shared by the bacterial urease.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos estruturais das ureases

Ureases (EC 3.5.1.5) são enzimas dependentes de níquel que catalisam a reação de hidrólise da ureia à amônia e carbamato, o qual se decompõe espontaneamente para formar uma segunda molécula de amônia e dióxido de carbono (Dixon et al., 1975). Apresentam ampla distribuição em plantas, fungos e bactérias, mas não são sintetizadas por animais (Carter et al., 2009; Krajewska, 2009).

A urease majoritária da *Canavalia ensiformis* (JBU) possui importância histórica, pois esta foi a primeira enzima a ser cristalizada (Sumner, 1926), comprovando-se assim a natureza protéica das enzimas. Além disso, o primeiro papel biológico para níquel foi determinado quando a JBU foi identificada como uma metalo-enzima dependente de níquel (Dixon et al., 1975).

As ureases de fungos e vegetais formam trímeros ou hexâmeros compostos por uma única cadeia polipeptídica, de aproximadamente 90 kDa (Sirko & Brodzik, 2000; Follmer, 2008; Krajewska, 2009). Em bactérias, as ureases possuem duas ou três subunidades que se alinham na cadeia polipeptídica única das ureases vegetais (Fig. 1), com as quais têm 50-60% identidade de sequência (Moblely, 1995). Estudos recentes do nosso grupo sugerem que a cadeia única das ureases vegetais se desenvolveu pela fusão das cadeias α , β e γ das ureases bacterianas (Braun, comunicação pessoal).

A cristalização das ureases de *Klebsiella aerogenes* (Jabri et al., 1995), *Bacillus pasteurii* (Benini et al. 1999), *Helicobacter pylori* (Ha et al., 2001) e *Canavalia ensiformis* (Balasubramanian e Ponnuraj, 2010), permitiu a caracterização de suas estruturas

quaternárias. As ureases de *K. aerogenes* (KAU) e *B. pasteurii* (BPU) formam um trímero de trímeros $(\alpha\beta\gamma)_3$. A urease de *H. pylori* (HPU) forma um dodecâmero, com quatro trímeros de dímeros $[(\alpha\beta)_3]_4$. A urease majoritária de *C. ensiformis* (JBU, Jack bean urease) foi a primeira proteína a ser cristalizada (Sumner, 1926). No entanto, sua estrutura só foi desvendada em 2010. A JBU é formada por dímeros de homotrímeros $(\alpha_3)_2$ (Balasubramanian e Ponnuraj, 2010; Zambelli et al., 2011). Apesar das diferenças entre os organismos na estrutura quaternária das ureases, a identidade de seqüência primária é maior que 50% entre bactérias e plantas, com similaridade maior que 70% dentro de cada grupo (Moblely et al., 1995).

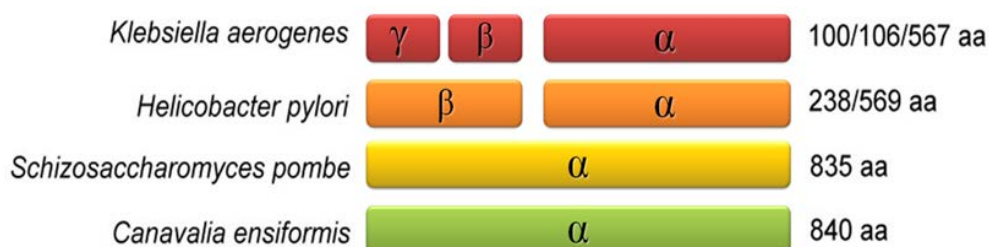


Figura 1: Estrutura das ureases. Ureases vegetais, como a de *C. ensiformis*, e fúngicas, como a de *S. pombe*, possuem apenas um tipo de subunidade, enquanto que as ureases bacterianas possuem duas (*H. pylori*) ou três (*K. aerogenes*) cadeias. O número de aminoácidos de cada subunidade está indicado à direita (Rodrigo L. Braun).

- **Estrutura gênica das ureases**

A urease está presente em todas as plantas analisadas até o momento (Frankenberger e Tabatabai, 1982; Hogan et al., 1983; Witte e Medina-Escobar, 2001) e em todos os tecidos avaliados de plantas de batata e soja (Witte et al., 2001; Polacco e

Winkler, 1984; Torisky e Polacco, 1990). Na maior parte dos genomas vegetais sequenciados, um único gene que codifica a urease é encontrado (Cao et al., 2010), enquanto que na soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e em *C. ensiformis* existem pelo menos três genes estruturais para as enzimas.

Na leguminosa *C. ensiformis*, foi identificada a existência de uma família de genes de urease, formada por pelo menos três isoformas da proteína. A urease clássica, ou JBU, foi a enzima cristalizada por Sumner, em 1926. A proteína foi sequenciada por Mamya e colaboradores, em 1985, e seu cDNA completo foi clonado por Riddles e colaboradores, em 1991. A canatoxina foi isolada como uma proteína tóxica de *C. ensiformis* por Carlini e Guimarães, em 1981, e posteriormente identificada como uma isoforma da urease (Follmer et al., 2001). Na tentativa de isolar o gene da CNTX foi identificada uma terceira urease, cujo gene foi denominado *jbure-IIb* (acesso AF468788), com 86% de similaridade com a urease clássica (Mulinari et al., 2011).

Na soja, a urease embrião-específica (eSBU), codificada pelo gene *Eu1*, é uma proteína abundante nas sementes, enquanto que a urease ubíqua (uSBU), codificada pelo gene *Eu4*, é encontrada em menor quantidade em todos os órgãos da planta (Torisky e Polacco, 1990; Torisky et al., 1994; Goldraj et al., 2003). As isoformas de urease encontradas na soja são altamente homólogas entre si (cerca de 85%) e também à urease de *C. ensiformis* (Torisky et al., 1994.) Após o sequenciamento do genoma da soja, um terceiro gene que codifica urease foi encontrado. O gene foi denominado *Eu5* e seu produto SBU-III. Através de análises *in silico*, foi identificada a substituição de um aminoácido altamente conservado entre as ureases e a falta de uma alfa hélice no sítio ativo da SBU-III, sugerindo a ausência da atividade ureolítica. Transcritos do gene foram

detectados por RT-qPCR durante a germinação de sementes, em raízes de plantas jovens e em embriões em desenvolvimento (Wiebke-Strohm, 2010).

Em bactérias, os genes estruturais da urease estão organizados em operons, juntamente com os genes das proteínas acessórias. Os genes presentes e a ordem em que os mesmos aparecem no operon variam entre as espécies. Em *K. aerogenes*, por exemplo, os genes estruturais *ureA* (subunidade γ), *ureB* (subunidade β) e *ureC* (subunidade α), são flanqueados por *ureD* a montante e por *ureE*, *ureF* e *ureG*, a jusante (Lee et al., 1992). A mesma ordem aparece no genoma de *Bradyrhizobium japonicum* e *Rhizobium leguminosarum*, porém, com diversas ORFs inseridas entre os genes (Toffanin et al., 2002) e ausência de *ureE* em *B. japonicum* (Kaneko et al., 2002). Em *Bacillus subtilis*, contudo, não foram encontrados genes para as proteínas acessórias, apesar de a bactéria produzir uma urease enzimaticamente ativa (Kim et al., 2005).

- **Proteínas acessórias para ativação das ureases**

A atividade catalítica das ureases está intimamente ligada à presença de dois átomos de Ni^{2+} no sítio ativo (Dixon et al., 1975). A adição correta desses átomos na enzima é um processo altamente complexo e depende da atividade de pelo menos duas proteínas acessórias em plantas e quatro em bactérias.

A ativação da urease foi profundamente estudada na bactéria *K. aerogenes*. A figura 2 apresenta um modelo da ativação de ureases, que envolve a carboxilação de uma lisina do sítio ativo da apoenzima e a incorporação de dois átomos de Ni. A UreD é a primeira proteína a se ligar, mas pouco se sabe sobre sua função pela insolubilidade da proteína recombinante (Carter et al. 2009). Estudos com a proteína fusionada mostraram

que UreD é potencialmente uma proteína ligadora de Ni^{2+} (Carter e Hausinger, 2010). A proteína UreF se liga no complexo formado por UreABCD, provavelmente atuando como uma proteína ativadora de GTPases (Salomone-Stagni et al., 2007). UreG é responsável pela hidrólise de GTP associada a transferência de CO_2 à lisina do sítio ativo (Soriano e Hausinger, 1999), fornecendo a energia necessária para ativação da enzima. Por fim, UreE é uma proteína ligadora de Ni^{2+} , que entrega os átomos ao complexo (Soriano et al., 2000).

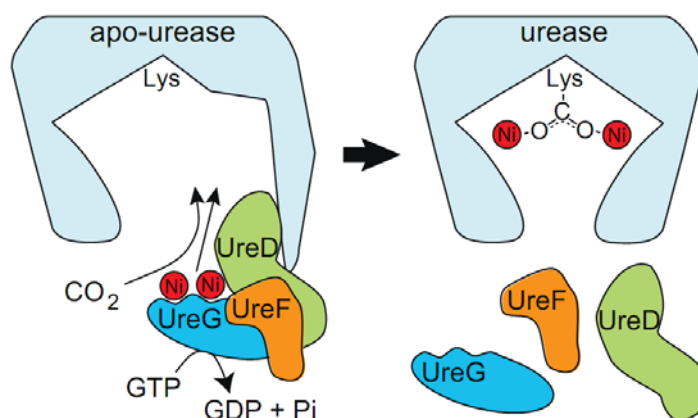


Figura 2: Modelo hipotético de ativação das ureases. Extraído de Witte, 2011. As proteínas acessórias se ligam ao complexo formado pelos genes estruturais da urease (UreA + UreB + UreC) na seguinte sequência: UreD, UreF e UreG. Após a carboxilação de uma lisina do sítio ativo da apoenzima e a incorporação de dois átomos de Ni^{2+} , as proteínas acessórias liberam o complexo.

Na soja, o papel das proteínas acessórias é desempenhado por dois genes, *Eu2* e *Eu3*. Mutações nesses genes levam a perda da atividade tanto da eSBU quando da uSBU (Polacco et al., 1999). O genoma da soja (Schmutz et al., 2009) revelou a existência de dois genes para UreD e dois para UreF, parálogos aos genes bacterianos, mas nenhum gene para UreE foi encontrado (Polacco et al., 2011; Real-Guerra et al., 2012). O gene *Eu3* codifica uma proteína ligadora de Ni^{2+} , sendo ortólogo ao *ureG* de bactérias (Freyermuth et

al., 2000), presente em cópia única no genoma da soja (Real-Guerra et al., 2012). Estudos baseados na estrutura da UreF mostram similaridades desta com proteína ativadoras de GTPases (Salomone-Stagni et al., 2007).

1.2. Atividades biológicas das ureases

- **Ureases vegetais**

O papel das ureases em plantas está relacionado, principalmente, ao reaproveitamento de nitrogênio a partir da ureia proveniente do catabolismo da arginina. A arginina é a principal forma de armazenamento de nitrogênio em sementes (Van Etten et al., 1967), a qual é degradada em ornitina e ureia pela arginase. A importância da urease durante a germinação foi demonstrada em sementes de *Arabidopsis thaliana*. Zonia e colaboradores (1995) observaram um aumento no nível de transcritos da urease, e na atividade da mesma, dois dias após a germinação, bem como o aumento da atividade da arginase. Além disso, na ausência de atividade ureásica a germinação foi inibida, sendo restaurada pela disponibilização de outras fontes de nitrogênio (Zonia et al., 1995).

O aumento na atividade da arginase, com consequente aumento no conteúdo de ureia, também é observado durante a senescência em plantas. Nesta etapa, o nitrogênio armazenado na forma de arginina é metabolizado e transportado para as sementes em desenvolvimento. Todd e Polacco (2004) mostraram que a inibição da atividade de ambas ureases da soja leva ao acúmulo de ureia quando a planta está na fase de enchimento de grãos. O acúmulo de ureia leva a necrose das extremidades das folhas, fenômeno

observado quando as plantas se desenvolvem na ausência de Ni^{2+} (Eskew et al., 1983; Gerendas e Sattelmacher, 1999) e em plantas desprovidas da atividade da uSBU ou da proteína acessória Eu3 (Stebbins et al., 1991), porém as plantas são capazes de completar seu ciclo de vida.

Em contraste, a perda da urease embrião-específica não acarretou danos visíveis à planta nem aumento no conteúdo de ureia, sugerindo que esta enzima não possua função fisiológica importante no metabolismo de nitrogênio (Polacco e Holland, 1993; Stebbins et al., 1991). Inclusive, a eSBU em cultivos *in vitro* de cotilédones afetou negativamente o desenvolvimento dos mesmos, na presença de ureia como fonte de nitrogênio, provavelmente pela liberação de amônia e aumento do pH (Stebbins et al., 1991).

- **Ureases microbianas**

Em microrganismos, a atividade ureásica está envolvida na utilização de ureia como fonte de nitrogênio, na patogenicidade de organismos causadores de doenças em animais e humanos e no metabolismo de ruminantes (Mobley e Hausinger, 1989). A ureia é um dos fertilizantes nitrogenados mais utilizados em todo o mundo. Apesar das plantas poderem captar essa ureia diretamente, por meio de transportadores (Witte, 2011), a maior parte desse composto é rapidamente degradada pela atividade da urease presente em microrganismos do solo. No caso de ruminantes, grande parte da ureia gerada metabolicamente é reciclada no rúmen desses animais, gerando amônia que consiste na principal fonte de nitrogênio para os microrganismos presentes no rúmen (Mobley e Hausinger, 1989).

Ureases bacterianas estão envolvidas na patogênese de diversas condições clínicas, de modo que elas vêm sendo extensivamente estudadas por serem alvos potenciais para o desenvolvimento de drogas ou vacinas. No caso de infecções por *P. mirabilis*, bactéria causadora de patologias do trato urinário, a formação dos cálculos urinários ocorre somente com linhagens urease positivas. O aumento do pH decorrente da hidrólise da uréia pela urease bacteriana resulta na precipitação de íons normalmente solúveis na urina, levando à formação de cristais (Bichler et al., 2002; Mobley & Hausinger, 1989).

A urease de *H. pylori* é considerada um fator de virulência, sendo a sua atividade um marcador para diagnóstico utilizado amplamente (Krogfelt et al., 2005). Acredita-se que a principal função dessa enzima esteja relacionada com a formação de um microclima neutro para o microrganismo no epitélio gástrico, possibilitando sobrevivência das bactérias em ambientes de pH desfavorável, como a mucosa estomacal (Stingl et al., 2002). Apesar de inibidores de urease terem sido utilizados no tratamento de algumas destas patologias, seu uso foi descontinuado pelo fato de muitos pacientes apresentarem reações colaterais adversas. O uso clínico de ácido acetohidroxâmico, um quelante de níquel inibidor de urease, causa depressão na síntese de DNA, afetando a medula óssea, além de ser teratogênico em doses elevadas (Figueiredo et al., 2005, Montecucco et al., 1999).

Apesar do papel da urease ser mais estudado em bactérias, a urease é igualmente sintetizada por vários fungos de importância médica, como *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e espécies de *Aspergillus* e *Trichosporon* (Cox et al., 2000; Mirbod-Donovan et al., 2006; Mirbod et al., 2002). Em *Coccidioides immitis*, por exemplo, foi sugerido um papel da urease na patogenicidade do fungo, atuando na colonização no tecido do

hospedeiro, resultando na formação de abscessos com um microambiente alcalino diferenciado (Mirbod et al., 2002).

A ausência da urease em linhagens mutantes de *Cryptococcus neoformans* prolongou a vida de camundongos, em comparação com a linhagem tipo selvagem (Cox et al., 2000; Olszewski et al., 2004; Osterholzer et al., 2009). Em infecções causadas por *C. neoformans* a urease foi implicada na invasão do sistema nervoso central (Olszewski et al., 2004) e na multiplicação da levedura nos pulmões (Osterholzer et al., 2009). Feder, 2012, utilizando diferentes mutantes da linhagem hipervirulenta R265 de *C. gattii*, demonstrou que a urease está implicada, de maneira independente de sua atividade enzimática, na sobrevivência em macrófagos e na dispersão hematogênica da levedura em camundongos.

Um potencial papel da urease na interação entre organismos foi observado em líquens, formados pelo mutualismo entre algas e fungos. Ureases glicosiladas ligadas à parede em células de algas atuam como ligantes específicos para arginases secretadas por fungos de diferentes líquens. Essas arginases possuem função de lectinas, atuando no reconhecimento entre fungo e alga (Legaz et al, 2004; Sacristán et al, 2006; Vivas et al., 2010).

1.3. Atividades biológicas independentes da atividade enzimática

- **Papel de defesa em plantas**

As ureases estão presentes em grande quantidade em sementes, principalmente em leguminosas e cucurbitáceas (Fahmy et al., 1994; Hogan et al., 1983; Polacco e Holland,

1993). No entanto, como mencionado anteriormente, essas enzimas na semente não possuem papel na assimilação da ureia formada na germinação das mesmas (Stebbins et al., 1991). Foi proposto que, em decorrência da liberação enzimática de amônia, esta isoforma da urease possa estar envolvida na proteção da planta contra insetos, fungos e agentes agressivos a semente (Polacco e Holland, 1993). Resultados do nosso grupo confirmam o envolvimento de ureases em mecanismos de defesa em plantas.

Ureases vegetais, como JBU e uSBU, são letais quando administradas na alimentação de insetos que possuem enzimas digestivas do tipo catepsinas (Carlini e Grossi-de-Sá, 2002; Carlini et al., 1997; Stanisçuaski et al., 2005; Piovesan et al., 2008; Defferrari et al., 2011). O efeito inseticida persiste após o tratamento da urease com um inibidor irreversível, demonstrando que o domínio entomotóxico da proteína não corresponde ao sítio catalítico (Follmer et al., 2004a; Follmer et al., 2004b).

Posteriormente, a atividade inseticida das ureases vegetais foi atribuída a um peptídeo interno de 10 kDa, denominado pepcanatox, liberado a partir da hidrólise da urease pelas enzimas dos insetos sensíveis (Carlini et al., 1997; Ferreira-da-Silva et al., 2000). A construção de um peptídeo recombinante equivalente ao pepcanatox, denominado Jaburetox-2Ec, mostrou que o mesmo apresenta atividade inseticida não só contra insetos com digestão dependente de catepsinas, mas também contra insetos com digestão dependente de tripsinas, os quais são resistentes às ureases nativas (Mulinari et al., 2007; Stanisçuaski et al., 2005; Tomazetto et al., 2007). É interessante citar que esta propriedade não é compartilhada pelas ureases bacterianas, pois a região do peptídeo inseticida de ureases vegetais está ausente em ureases bacterianas, correspondendo à região que conectaria as cadeias α e β (Follmer et al., 2004a).

Além de ser uma proteína inseticida, foi demonstrado que a eSBU, a JBU, a urease de sementes de algodão e a HPU têm propriedades antifúngicas, afetando fungos fitopatogênicos como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium herguei*, *Curvularia lunata* e *Aspergillus glaucus* (Becker-Ritt et al., 2007; Menegassi et al., 2008), além de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Pichia membranifacies*, entre outras (Postal et al., 2012). Assim como a atividade inseticida, a atividade antifúngica é independente da atividade ureolítica, persistindo após o bloqueio do sítio ativo das ureases com ρ -hidroximercuribenzoato, um inibidor covalente irreversível da enzima (Becker-Ritt et al., 2007; Follmer et al., 2001; Postal et al., 2012).

A obtenção de plantas de soja transgênicas com o gene da uSBU suprimido permitiu a observação de que essas plantas são mais suscetíveis a fungos fitopatogênicos. O crescimento de *Rhizotocnia solani*, *Phomopsis sp.*, *Penicillium herguei* em meio de cultura foi maior com a adição de extratos proteicos das plantas transgênicas deficientes na uSBU, quando comparado com o extrato obtido de plantas não transgênicas. Além disso, foi demonstrado que as plantas transgênicas apresentam mais lesões causadas por *Phakopsora pachyrhizi*, causador da ferrugem asiática da soja, do que plantas suscetíveis, sugerindo uma infecção mais agressiva do patógeno (Wiebke-Strohm et al., 2012).

- **Indução de secreção e atividade pró-inflamatória**

Antes mesmo da descoberta de que a CNTX era uma isoforma de urease, estudos mostraram sua capacidade de induzir secreção em diferentes tipos celulares. Em ensaios *in vitro*, essa proteína apresenta uma potente atividade secretagoga quando administrada em

doses nanomolares, induzindo a secreção de grânulos plaquetários e a agregação plaquetária (Carlini et al, 1985), a secreção de dopamina e serotonina em sinaptosomas de cérebro de rato (Barja-Fidalgo et al., 1991b), a liberação de histamina em mastócitos (Grassi-Kassisse & Ribeiro-DaSilva, 1992), a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas (Barja-Fidalgo et al., 1991a), e a liberação de enzimas lisossomais em macrófagos (Ghazaleh et al., 1992).

In vivo, a proteína em dose sub-letais induz hipóxia, hipoglicemia e tem atividade pro-inflamatória, esta última caracterizada pela indução de migração de neutrófilos e monócitos nas cavidades peritoneal e pleural quando injetada em ratos (Barja-Fidalgo et al., 1992; Benjamin et al., 1992). Tais efeitos secretagogos da proteína são mediados por eicosanóides e por alterações dos níveis intracelulares de cálcio (Carlini et al., 1985; Barja-Fidalgo et al., 1991a; 1991b; Ghazaleh et al., 1997).

Posteriormente, em estudos comparando duas ureases vegetais, a JBU e a eSBU, e uma bacteriana, a BPU, verificou-se que todas possuem o efeito secretagogo observado com a CNTX, apesar de apresentarem diferenças em relação as doses efetivas (Follmer et al., 2004a). A urease de *B. pasteurii*, mesmo apresentando maior atividade na clivagem de ureia, é menos ativa sobre plaquetas, cerca de 20 vezes menos em termos de massa, o que demonstra que essas propriedades biológicas são independentes e corrobora os resultados de inibição química da atividade ureásica com manutenção de efeitos biológicos (Follmer et al., 2004a; Olivera-Severo et al., 2006).

Além disso, a agregação plaquetária induzida pelas ureases de *B. pasteurii* (Olivera-Severo et al., 2006) e de *H. pylori* (Wassermann et al., 2010) também é modulada por eicosanóides derivados de lipoxigenases, como descrito para a CNTX (Carlini et al., 1985; Barja-Fidalgo et al., 1991b). A HPU ainda induz a migração de neutrófilos humanos,

protege-os da apoptose e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio dos mesmos, demonstrando a atividade pró-inflamatória dessa molécula (Uberti, 2010). Como *H. pylori* é um patógeno não invasivo, o estímulo à resposta inflamatória ocorre por meio de substâncias secretadas, e é provável que a urease esteja envolvida nesse processo.

1.4. Ureases no solo

A presença de ureases no solo foi primeiramente observada por Rotini, em 1935. Essas enzimas podem ser encontradas em microrganismos, plantas (Polacco, 1977; Mobley e Hausinger, 1989) e ainda como uma enzima extracelular imobilizada em componentes orgânicos e inorgânicos do solo (Burns et al., 1972; Nannipieri et al., 1978). Foi demonstrado que a atividade da urease é protegida da desnaturação térmica e da proteólise pela sua imobilização em géis de Ca^{2+} -poligalacturonato, os quais possuem composição e morfologia similar à mucilagem produzida pela raiz (Ciurli et al., 1996).

A ureia é o fertilizante nitrogenado mais utilizado em todo o mundo (Witte, 2011), sendo que seu conteúdo em nitrogênio é disponibilizado para a planta pela ação da urease. Entretanto, a alta atividade da urease nos solos leva a perdas na agricultura, devido à volatilização da amônia formada pela hidrólise da ureia (Han et al., 2004; Kumar e Wagenet, 1984; Watson et al., 1994). Desta maneira, mais da metade do nitrogênio disponibilizado na forma de fertilizante não é absorvida pelas plantas (Hirel et al., 2007). Além das perdas econômicas, a utilização ineficiente da ureia leva a poluição da água com nitrato e da atmosfera com amônio e óxido nítrico (Hirel et al., 2007).

A aplicação de inibidores de urease em conjunto com fertilizantes tem sido utilizada como estratégia para diminuir as perdas relacionadas à atividade da urease. Esses

compostos retardam a hidrólise da ureia e, deste modo, prolongam a disponibilidade da mesma no solo (Bremner e Krogmeier, 1988). Apesar da obtenção de resultados expressivos em experimentos em laboratório, com as perdas sendo reduzidas em até 78 % pela aplicação dos inibidores (San Francisco et al., 2011; Soares et al., 2012), em experimentos a campo e a longo prazo, não há grande diferença na produtividade das culturas (Grohs et al., 2011).

1.5. Fixação Biológica de Nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) representa uma alternativa barata e eficiente para suprir as plantas com o nitrogênio necessário para seu desenvolvimento. Esse processo consiste na redução do nitrogênio atmosférico (N_2) a duas moléculas de amônia (NH_3), sendo catalizado somente por microrganismos procarióticos que possuem o complexo enzimático da nitrogenase. O tipo de nitrogenase mais abundante e mais estudado é o complexo formado pela MoFe-proteína, um tetrâmero que consiste de dois pares de subunidades distintas ($\alpha_2\beta_2$), e a Fe-proteína, um dímero de subunidades idênticas (γ_2). Para a fixação de nitrogênio, a Fe-proteína é primeiramente reduzida, sendo esta forma capaz de transferir elétrons para a MoFe-proteína, com consumo de ATP. A MoFe-proteína contém o sítio de ligação ao substrato, sendo a subunidade responsável pela redução do N_2 . Esta reação tem um custo energético bastante alto, consumindo 16 ATPs para cada duas moléculas de NH_3 formadas (Huergo et al., 2012; Rees e Howard, 2000; Seefeldt et al., 2009).

A nitrogenase é inativada irreversivelmente por oxigênio, de modo que ela precisa ser mantida em células com características morfológicas e bioquímicas diferenciadas

(Gage et al., 2004). Em leguminosas, a interação com bactérias fixadoras de nitrogênio leva a formação de nódulos radiculares, órgãos especializados que criam o microclima ideal para a atividade da nitrogenase. A formação do nódulo está sujeita ao reconhecimento específico entre bactéria e hospedeiro, o qual depende de sinais de ambos os parceiros (Jones et al., 2007). Em geral, as bactérias que interagem com as leguminosas para FBN pertencem à família Rhizobiaceae, incluindo os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium* (Gage et al., 2004). Em contrapartida à disponibilização de nitrogênio pelas bactérias, as plantas fornecem fontes de carbono aos simbioses.

1.6. Simbiose entre soja e *Bradyrhizobium japonicum*

A soja é a principal leguminosa cultivada no país, ocupando quase 45 % da área atualmente cultivada (Barcellos et al., 2007). Em 2011, o Brasil foi responsável por 29 % da produção mundial deste grão, ficando atrás somente dos Estados Unidos, este com 33 % (SoyStats, 2012). A aplicação de fertilizantes nitrogenados não é recomendada para a cultura da soja no país (Comissão de Química e Fertilidade do Solo, 2004). Isso demonstra que as estirpes aqui utilizadas como inoculantes, *B. japonicum* e *B. elkanii* (Peres e Vidor, 1980), são eficientes a ponto de oferecer à planta todo o nitrogênio necessário para o seu desenvolvimento.

Espécies do gênero *Bradyrhizobium* eram inicialmente classificadas no gênero *Rhizobium*, sendo separadas principalmente em função de sua lenta multiplicação em meio de cultura, da posição de seus flagelos e das plantas que infectam. *B. japonicum* são bacilos gram-negativos, aeróbios e possuem um flagelo polar ou subpolar (Jordan, 1982).

A nodulação é iniciada por meio de uma troca de sinais entre a planta e a bactéria. Um desenho esquemático dos primeiros passos da interação pode ser observado na figura 3. O processo começa pela quimiotaxia positiva de células de *B. japonicum* por exudatos radiculares (Barbour et al., 1991), compostos por aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, compostos fenólicos e outros metabólitos secundários, mucilagem e proteínas (Bais et al., 2006; Brencic e Winans, 2005). Os isoflavonoides presentes no exudato vegetal, principalmente genisteína e daidzeína, são percebidos por *B. japonicum*, ativando os genes de nodulação (*nod*) para produzir e secretar os fatores Nod (Fig. 3, etapa 1), os quais consistem em lipo-quitoooligossacarídeos (Geurts e Bisseling, 2002; Smit et al., 1992). Por sua vez, os fatores Nod são reconhecido por receptores tipo quinase com motivos Lisina (LysM) presente nas células da epiderme da raiz (Oldroyd e Downie, 2008). Esse reconhecimento é altamente específico e desencadeia uma cascata de sinalização que leva à infecção e divisão das células corticais da raiz (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Jones et al., 2007; Oldroyd e Downie, 2008).

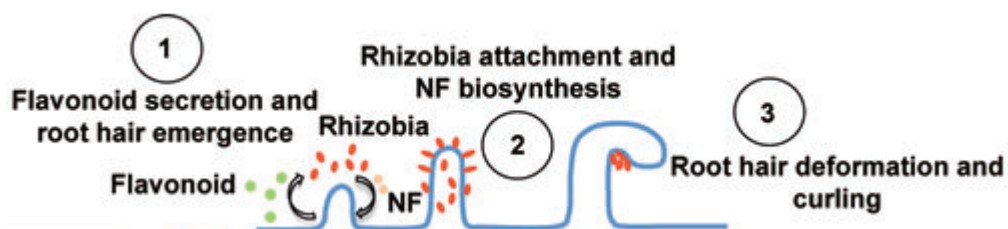


Figura 3: Desenho esquemático das etapas iniciais de formação do nódulo radicular. 1 – Flavonoides secretados pela planta induzem os genes de nodulação na bactéria; 2 – Adesão das bactérias à superfície dos pelos radiculares e secreção dos fatores Nod; 3 – Deformação do pelo radicular e aprisionamentos das bactérias (Adaptado de Ferguson et al., 2010).

A adesão das bactérias aos pelos radiculares é outro ponto chave da simbiose (Fig. 3, etapa 2). As lectinas vegetais estimulam a adesão das bactérias pela ligação específica com polissacarídeos presentes na superfície das células bacterianas (Lodeiro et al. 2000; Oldroyd e Downie, 2008). Lectinas bacterianas também podem estar envolvidas na especificidade durante o processo de adesão (Lodeiro e Favelukes, 1999). Então, os pelos radiculares sofrem alterações morfológicas e aprisionam as células bacterianas (Fig 3, etapa 3).

Os estádios subsequentes de desenvolvimento do nódulo são apresentados na figura 4 (Continuação da figura 3). A invasão da raiz pelas bactérias é iniciada por meio de invaginações da membrana plasmática de células de raízes levam a formação de estruturas tubulares (*infection threads*) que dirigem as células bacterianas às camadas subjacentes das células corticais (Fig. 4, etapa 4; Turgeon e Bauer, 1985; Brewin, 1991). Concomitantemente, as células corticais são estimuladas a reiniciar a mitose, culminando com a formação do primórdio do nódulo (Brewin, 1991; Gage, 2004; Truchet et al., 1991; Stokkermans e Peters, 1994). Após a invasão do tecido vegetal, as bactérias são internalizadas por células corticais, formando simbiossomas (Fig. 4, etapas 5 e 6), nos quais se diferenciam em bacteroides fixadores de nitrogênio (Mylona et al., 1995).

A soja forma nódulos determinados, cilíndricos, no interior dos quais as células bacterianas se diferenciam, se multiplicam e senescem simultaneamente (Gage, 2004). Os simbiossomas ocupam a maior parte da região central do nódulo, juntamente com algumas células vegetais não infectadas, responsáveis pela síntese de compostos nitrogenados, os ureídeos, que serão transportados para a planta. A atividade da nitrogenase dos simbiossomas está intimamente ligada com a presença da leghemoglobina (Appleby, 1984; Dakora, 1995). Essa proteína é essencial para manter uma baixa concentração de O₂ livre

no interior do nódulo, além de facilitar o fornecimento de O_2 para a respiração dos bacteroides (Downie, 2005). A soja apresenta quatro tipos principais de leghemoglobinas: Lba, Lbc1, Lbc2 e Lbc3 (Appleby, 1984). A proporção dessas proteínas se altera à medida que o nódulo se desenvolve. Nos estádios iniciais, as leghemoglobinas do tipo Lbc são mais abundantes, e a proporção de Lba aumenta com o desenvolvimento do nódulo (Sato et al., 2001).

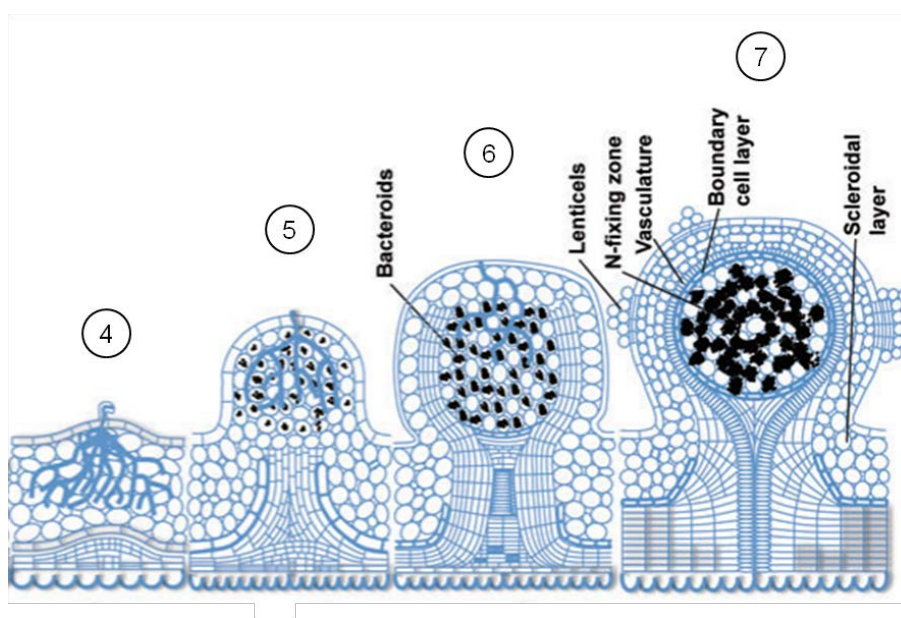


Figura 4: Desenho esquemático do desenvolvimento do nódulo radicular. 4 – Progressão no interior do córtex das estruturas tubulares formadas por invaginações da membrana plasmática das células vegetais; 5 – Invasão do primórdio do nódulo pelas bactérias e formação dos simbiossomos; 6 – Diferenciação das bactérias em bacteroides fixadores de nitrogênio; 7 – Nódulo maduro (Adaptado de Ferguson et al., 2010).

2. OBJETIVOS

O interesse científico em estudar ureases se justifica por essas enzimas constituírem um conjunto de proteínas homólogas para as quais ainda há muitas questões estruturais e biológicas pouco compreendidas. Considerando a multifuncionalidade das ureases e a escassez de trabalhos estudando essa enzima na simbiose entre plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio, o objetivo geral deste trabalho foi testar a hipótese de que tanto as ureases vegetais quanto as ureases bacterianas podem estar envolvidas na comunicação entre planta e simbionte.

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- Determinar as condições ótimas de expressão da BJU;
- Avaliar a atividade indutora de secreção da BJU sobre plaquetas de coelho;
- Avaliar o potencial quimiotático da uSBU sobre *B. japonicum*;
- Avaliar a importância das ureases de soja e de *B. japonicum* na nodulação;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições de germinação

Foram utilizadas sementes de soja tipo selvagem (*Glycine max* (L.) Merr cv. Williams 82) disponíveis comercialmente (Missouri Seed Foundation). As sementes mutantes *eu1-sun/eu4* (*background* Williams 82) pertencem à coleção mantida pelo Dr. Joseph C. Polacco (University of Missouri, USA) e foram descritos anteriormente (Meyer-Bothling et al., 1987; Meyer-Bothling e Polacco, 1987; Polacco et al., 1989; Goldraij et al., 2003).

As sementes foram desinfectadas por imersão em etanol 96% por 4 min, etanol 70% por 2 min e hipoclorito de sódio 2% por 4 min, seguidas de cinco lavagens com água destilada estéril. Após o tratamento, as mesmas foram germinadas em meio ágar-água 0,6% por três dias, a 25 °C.

3.2. Estirpes de *B. japonicum* e meios de cultura para cultivo bacteriano

A estirpe de *B. japonicum* USDA110 foi cedida pelo Prof. Dr. Gary Stacey (University of Missouri, USA). As estirpes de *B. japonicum* SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5032, SEMIA 5038, SEMIA 5039, SEMIA 5079, SEMIA 5080 e SEMIA 5085, foram cedidas pelo Centro de Fixação Biológica de Nitrogênio da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Porto Alegre, RS.

A composição dos meios de cultura utilizados neste trabalho está descrita nas tabelas 1, 2 e 3. O pH dos meios foi ajustado para 6,8 e, quando necessário, foram adicionados os antibióticos cloranfenicol ($30 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou canamicina ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Tabela 1: Composição do meio de cultura arabinose-gluconato (AG).

Reagente	Quantidade (g.L^{-1})
Extrato de levedura	1
Arabinose	1
Gluconato de sódio	1
Na_2HPO_4	0,125
Na_2SO_4	0,25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,18
FeCl_3	0,004
CaCl_2	0,013
HEPES	1,3
MÊS	1,1

Tabela 2: Composição do meio mínimo (MM).

Reagente	Quantidade (por L)
K_2HPO_4	0,3 g
KH_2PO_4	0,3 g
NH_4NO_3	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
Glicerol	4 mL
1000x elementos traço ^(a)	1 ml
FeCl_3 (10mM em 1M HCl)	1 ml
1N NaOH	1 ml
HEPES	1,3 g
MÊS	1,1 g

^(a) 5 g.L^{-1} de CaCl_2 , $0,145 \text{ g.L}^{-1}$ de H_3BO_3 , $0,07 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,005 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,004 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,108 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $0,125 \text{ g.L}^{-1}$ de NaMoO_4

Tabela 3: Composição do meio de cultura extrato de levedura-manitol (YM).

Reagente	Quantidade (g.L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	0,5
NaCl	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Extrato de levedura	0,4
Manitol	10,0

3.3. Utilização de fontes de nitrogênio e carbono por *B. japonicum*

Como fontes de carbono para o cultivo de *B. japonicum*, foram testados o gluconato de sódio, L-arabinose, lactose, glicose, sacarose e glicerol, todos na concentração de 0,1 %. Para avaliação do uso de fontes de nitrogênio, utilizou-se ureia, glutamato de sódio e nitrato de amônio, nas concentrações de 1, 2,5 e 5 mM. Os compostos foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm e adicionados ao meio mínimo.

As bactérias foram cultivadas em meio AG até atingirem OD₆₀₀ de 0,4. As células foram então diluídas com solução salina (0,9 % de NaCl) até OD₆₀₀ de 0,1, a qual corresponde a 10⁸ células/mL. Em seguida, foram feitas diluições seriadas em solução salina e 100 µL da suspensão contendo 10³ células/mL foram espalhados em placas contendo meio mínimo-ágar com adição das diferentes fontes de carbono ou nitrogênio. Após incubação a 28 °C por cerca de sete dias, o crescimento das bactérias foi avaliado.

3.4. Construção dos mutantes de *B. japonicum*

Os mutantes com deleção dos genes codificando UreG ($\Delta ureG$) e UreA, UreB e UreC ($\Delta ureABC$) foram construídos pelo Dr. William Franck, sob orientação do Prof. Dr. Gary Stacey, na Universidade de Missouri (EUA). Os primers utilizados neste estudo estão listados na tabela 4.

Tabela 4: Primers utilizados neste estudo.

Nome	Sequência*
ureABC-F	GTTCGGACGCACTGCGATGG
ureABC-R	CGTAATGATTTCGACCTTCG
ureG-F	TGTGGTCGCCGCGATGCACG
ureG-R	CATGGACGTCGATCGCACGT
PS1	GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
PS2	CATATGAATATCCTCCTTAG
Delta ureABC-F	GCTGTGGTTGAATTGACGTGTTGAACGGAAGAGATTT <u>CGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
Delta ureABC-R	AAACCGTCCCCGGACAGGCTCCGGGGACCGGGCGCTATT <u>CATATGAATATCCTCCTTAG</u>
Delta ureG-F	GGGCCTGGCTTTTCGCCAGGACGACGATAGGAAAAGAAATCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Delta ureG-R	GTTAACGGCGGAAAACCCCTGTGCCAAGTCGTCGCGTTTCGCATATGAATATCCTCCTTAG

* As sequências sublinhadas se referem a PS1 e PS2.

Para gerar os mutantes, os genes de interesse foram amplificados com primers ureABC-F e ureABC-R ou ureG-F e ureG-R. Os produtos de PCR contém toda a sequência dos genes de interesse, além de cerca de 400 pb nas regiões 5' e 3' dos genes. Os produtos de PCR foram inseridos no vetor suicida pKnockout (Windgassen et al., 2000), gerando pKO Ω – URE. Um cassete de canamicina de pHP45 Ω – Km (Fellay et al., 1987) foi amplificado com os primers PS1 e PS2, sendo este produto utilizado como molde para outra PCR com os primers Delta ureABC-F/R e Delta ureG-F/R, gerando pKO Ω – URE – Km. Esses primers adicionam ao gene da canamicina 40 bases homólogas às regiões que flanqueiam os genes de interesse. Este foi transferido de *Escherichia coli* DH5 α para *B.*

japonicum USDA110 por conjugação triparental com o plasmídeo helper pRK2073 (Leong et al., 1982). Mutantes foram selecionados por resistência a canamicina ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

3.5. Otimização da expressão da urease de *B. japonicum*

A atividade enzimática da urease foi avaliada em nove estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*. As bactérias foram cultivadas em meio YM a 28°C , sob agitação de 180 rpm. Após cinco dias de cultivo, as bactérias foram coletadas por centrifugação, suspensas em tampão PEB pH 7,5 (20 mM de fosfato de sódio, 1 mM de EDTA, 5 mM de β -mercaptoetanol) e submetidas a lise por ultrassom (10 pulsos de 10 s). O sobrenadante foi recuperado após 20 min de centrifugação a 18000 g e utilizado para quantificação da atividade ureásica.

A atividade da BJU foi avaliada após a modificação do meio YM pela adição de diferentes concentrações de NiCl_2 (0,01, 0,1, 1 e $10 \mu\text{M}$) e ureia (0,1, 1 e 10mM). Células de *B. japonicum* USDA110 foram cultivadas no meio YM modificado e manipuladas como descrito acima para avaliação da atividade ureásica.

3.6. Atividade ureásica

A atividade ureásica foi quantificada por método colorimétrico com reagente de fenilnitroprussiato–hipoclorito (Weatherburn, 1967), que se baseia na quantificação de amônia liberada a partir da hidrólise da ureia.

Alíquotas de 10 μL de amostra foram adicionadas a 10 mM de solução de ureia e tamponadas com 20 mM de fosfato de sódio, pH 7,5, em um volume final de 100 μL . A reação foi incubada a 37 °C e a amônia formada foi determinada colorimetricamente, por leitura a 570 nm. Uma curva padrão com sulfato de amônio na faixa de 1 a 3,5 μg foi realizada para quantificação enzimática das amostras. Uma unidade de atividade ureásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de amônia por minuto, em 20 mM de NaPB pH 7,5 a 37 °C.

Alternativamente, a atividade ureásica foi avaliada com a utilização de uma solução contendo um indicador de pH. As amostras (culturas bacterianas ou sementes) foram incubadas em 1 mL da solução indicadora de urease (0,1 M de ureia, 5 mg.L^{-1} de vermelho de cresol, 10 mM fosfato de potássio, pH 7,5) e mantidas à temperatura ambiente. Amostras positivas para a atividade ureásica passavam de amarelas a rosas (Meyer-Bothling e Polacco, 1987).

3.7. Inibição da atividade enzimática da urease

A atividade ureolítica foi inibida com a utilização de 50 μM de *p*-hidroximercuribenzoato (*p*-HMB), como descrito em Follmer et al., 2001. O inibidor foi mantido em contato com a proteína durante 16 h, a 4 °C. O excesso de inibidor foi removido por diálise previamente a realização dos ensaios.

A inibição da atividade ureásica durante o desenvolvimento da planta foi realizada de acordo com Todd e Polacco (2004). O inibidor fenilfosforodiamidato (PPD) foi adicionado na solução nutritiva disponibilizada às plantas na concentração de 100 μM .

3.8. Purificação da urease de *B. japonicum*

Obtenção do extrato bruto

A estirpe *B. japonicum* USDA110 foi utilizada para purificação da urease bacteriana. As bactérias foram cultivadas em meio YM acrescido de 0,1 μ M de NiCl_2 e 1 mM de ureia a 28 °C, sob agitação de 180 rpm. Quando o cultivo atingiu OD_{600} de 1,0, as bactérias foram coletadas por centrifugação, suspensas em tampão PEB pH 7,5 e submetidas a lise por ultrassom (10 pulsos de 1 min). Após centrifugação a 60000 g por 20 min, o extrato bruto obtido foi filtrado em membrana com poros de 0,45 μ m.

Cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose

O extrato bruto foi aplicado na resina Q-Sepharose (Amersham-Biotech Pharmacia), previamente equilibrada em tampão PEB pH 7,5, em uma proporção de 5 A_{280} de proteína por mL de resina, e re-circulado cinco vezes no leito da resina. Após a remoção das proteínas não retidas com o tampão de equilíbrio, as proteínas retidas foram eluídas com gradiente descontínuo de 0,1 a 0,5 M de NaCl em tampão PEB pH 7,5. As frações ricas em atividade ureásica foram reunidas e preparadas para a etapa subsequente.

Cromatografia de troca iônica em Source 15-Q

A coluna Source 15-Q (GE-Lifesciences), montada em sistema FPLC (Pharmacia) e monitorada por A_{280} , foi equilibrada em tampão PEB pH 8,0. As frações reunidas na etapa anterior foram dialisadas para retirada do excesso de sal e aplicadas na coluna. Posteriormente, as proteínas foram eluídas com um gradiente contínuo de 0 a 1 M de NaCl

no tampão. As frações ricas em atividade ureásica foram reunidas, dialisadas em tampão PEB pH 7,5 e mantidas a 4 °C para uso subsequente.

3.9. Obtenção das ureases vegetais

Urease de *Canavalia ensiformis* (JBU)

A urease de *Canavalia ensiformis*, tipo C-III (Sigma Aldrich), foi solubilizada em tampão fosfato 20 mM, pH 7,0.

Urease embrião-específica de soja (eSBU)

A eSBU foi purificada de acordo com Follmer e colaboradores (2004a), a partir de farinha de soja delipidada (Sigma Aldrich). Para sua utilização nos ensaios, a proteína foi dialisada em tampão fosfato 20 mM, pH 7,0.

Urease ubíqua recombinante de soja (uSBU)

O protocolo de purificação da uSBU foi adaptado a partir de Martinelli, 2007. Células de *E. coli* BL21-RIL:pGEX-4T-2 foram cultivadas em meio 2xYT (16 g.L⁻¹ de triptona, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ de cloreto de sódio, pH 7,0) contendo ampicilina (150 µg.mL⁻¹) e cloranfenicol (40 µg.mL⁻¹) e mantidas a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Quando as bactérias atingiram OD₆₀₀ de 0,7 a expressão da uSBU fusionada a Glutathione S-transferase (GST-uSBU) foi induzida pela adição de 0,55 mM de IPTG, mantendo-se a cultura a 24 °C, sob agitação de 200 rpm. Após 15h de indução, as bactérias foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em tampão fosfato-salina (PBS, 140 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1,8 mM de KH₂PO₄, pH 7,3) e submetidas

à lise por ultrassom. O extrato bruto foi obtido por centrifugação a 60000 rpm por 25 min, filtrado em membranas de 0,45 µm e aplicado na resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare). A resina foi previamente equilibrada com 20 volumes de PBS e o extrato foi re-circulado pela coluna cinco vezes. As proteínas não retidas foram eluídas com 10 mL de PBS. A proteína de fusão GST-uSBU retida foi eluída da coluna em frações de 1 mL com tampão de eluição contendo 10 mM de glutathione reduzida em 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0.

A proteína GST (não fusionada à uSBU) foi purificada para utilização como controle nos ensaios. Para isso, células de *E. coli* BL21:pGEX-4T-2 foram cultivadas em meio 2xYT, com adição de 150 µg.mL⁻¹ de ampicilina, e mantidas a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Quando as bactérias atingiram OD₆₀₀ de 0,7, a expressão da GST foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG e a cultura foi mantida a 37 °C por 3 h, sob agitação de 200 rpm. A purificação foi seguida como descrito acima.

3.10. SDS-PAGE

As eletroforeses foram realizadas de acordo com Laemmli e colaboradores (1970), utilizando-se géis com 10% poliacrilamida em condições desnaturantes. As quantidades de material aplicadas no gel, bem como os padrões de massa molecular utilizados, estão descritos no respectivo experimento. Os géis foram corados com Coomassie Blue coloidal ou revelados por nitrato de prata, conforme Wray e colaboradores (1981).

3.11. Determinação do conteúdo proteico

A determinação do conteúdo de proteínas das amostras e durante as etapas de purificação foi feita através da medida da absorbância de luz ultravioleta em comprimento de onda de 280 nm (A_{280}), em cubetas de quartzo com 1 cm de passo óptico, em espectrofotômetro (UV/Vis Spectrophotometer Hitachi).

Alternativamente, foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976). Em placa de 96 poços foi incubado um volume de 5 μ L de amostra em 250 μ L de Reagente de Bradford. Após 30 min de reação em temperatura ambiente, foi feita a leitura de absorbância a 595 nm. Uma curva padrão com albumina sérica bovina (BSA) na faixa de 0,5 a 5 μ g foi utilizada como referência. As placas foram analisadas em espectrofotômetro Spectra Max [®] (Molecular Device).

3.12. Ensaio de agregação plaquetária

A medida de agregação plaquetária foi feita por turbidimetria de acordo com Born e Cross (1963). Plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado a partir de sangue de coelho coletado da artéria auricular na presença de 0,31% (v/v) citrato de sódio. As amostras foram centrifugadas a 200 g por 15 min em temperatura ambiente. A agregação plaquetária foi analisada em um Lummi-agregômetro (Chrono-log Co.) por até 10 min, como descrito por Olivera-Severo e colaboradores (2006).

3.13. Ensaio de quimiotaxia

A metodologia descrita nesse estudo foi adaptada de Coelho et al., 2004, utilizando-se uma câmara de Boyden (Neuro Probe, Inc.), a qual pode ser visualizada na figura 5. A câmara é composta por dois compartimentos, inferior e superior, separadas por uma membrana porosa descartável.

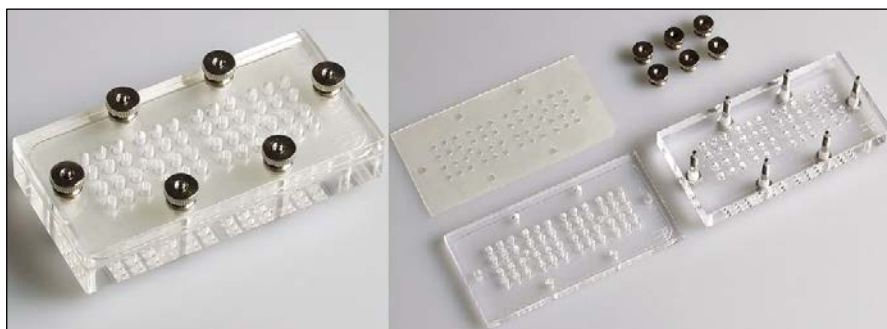


Figura 5: Câmara de Boyden (<http://neuroprobe.com/products/ap48.html>).

B. japonicum USDA110 foi cultivada em meio AG a 28 °C, sob agitação, até atingir OD₆₀₀ de 0,4. As bactérias foram diluídas em solução salina (0,9 % de NaCl) até OD₆₀₀ de 0,1 (10⁸ células/mL) e submetidas a diluição seriada em solução salina até 10⁶ células/mL. As bactérias (28 µL) foram adicionadas ao compartimento inferior da câmara de Boyden, o qual foi coberto por uma membrana com poros de 2 µm. Em seguida, o compartimento superior foi colocado na câmara e esta foi selada. As substâncias-teste (50 µL) foram adicionadas aos poços do compartimento superior e a câmara foi mantida à temperatura ambiente por 1 h. Após esse período, foram coletados 20 µL da solução dos poços do compartimento superior, os quais foram diluídos em 80 µL de solução salina.

Essas amostras foram espalhadas em placas contendo meio AG sólido, as quais foram a seguir incubadas a 28 °C. As unidades formadoras de colônias foram contadas de cinco a seis dias após o plaqueamento.

3.14. Ensaio de nodulação

Os ensaios foram realizados de acordo com Shah e Emerich (2006), com modificações. As estirpes de *B. japonicum* foram cultivadas em meio AG a 28 °C, sob agitação, até atingirem OD₆₀₀ de 0,4. Sementes de soja foram germinadas como descrito no item 3.1 e as plântulas foram inoculadas dois (sementes tipo-selvagem) ou três dias (sementes mutantes) após a germinação, mergulhando-as por 30 min na suspensão bacteriana. Logo após, as plântulas foram transferidas para vasos de Leonard modificados (Leonard, 1943) contendo vermiculita:perlita:areia (1:1:1) ou frascos magenta contendo vermiculita:areia (2:1). Sempre que necessário, os vasos foram completados com água estéril ou uma solução nutritiva livre de nitrogênio, composta por 1mM de CaCl₂, 0,5 mM de KH₂PO₄, 10 µM de citrato de ferro, 0,25 mM de MgSO₄, 0,25 mM de K₂SO₄, 1 µM de MnSO₄, 2 µM de H₃B₀₃, 0,5 µM de ZnSO₄, 0,2 µM de CuSO₄, 0,1 µM de CoSO₄ e 0,1 µM de Na₂MoO₄ (Broughton e Dilworth, 1971).

Os nódulos formados nas raízes de 16 a 42 dias após a inoculação foram coletados e pesados. A parte aérea das plantas foi armazenada em estufa a 65 °C para secagem e posterior avaliação do conteúdo de nitrogênio.

3.15. Determinação da atividade da nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo ensaio de redução de acetileno (Schwinghamer et al., 1970) em segmentos de raiz contendo nódulos intactos. Os segmentos foram cortados da parte superior da raiz e rapidamente colocados em frascos de vidros vedados com tampas de borracha. A reação foi iniciada pela adição de 2 mL de acetileno, gerado a partir do carbureto de cálcio. Amostras de 0,2 mL da fase gasosa foram coletadas a cada 2 min, por um período de 10 min, e analisadas em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (FID – Varian 3800). Foi utilizada uma coluna TG-BOND Alumina KCl (30m x 0,53 mm x 10 µm, Thermo Scientific) com 11 psi de hélio como gás carreador. A temperatura da coluna foi fixada a 40 °C por 1 min, seguido de gradiente de 20 °C/ min, até 120 °C, sendo mantida por mais 1 min. A temperatura do injetor foi ajustada em 180 °C e a do FID em 200 °C, com gás hidrogênio a 55 psi e ar comprimido a 33 psi.

A taxa de produção de etileno foi determinada em um mínimo de três plantas em cada ponto e os valores foram normalizados pela massa fresca dos nódulos. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima necessário para formar 1 µmol de etileno por hora.

3.16. Determinação do conteúdo de leghemoglobina

Os nódulos foram transferidos para tubos de reação de 2 mL, contendo uma esfera de aço de 5 mm. Foi adicionado 1 mL de PBS e o material foi macerado e homogeneizado no sistema TissueLyser (Qiagen), com pulsos de 3 min, na frequência de 30 Hz. Em

seguida, as amostras foram submetidas a dois ciclos de centrifugação, o primeiro a 3000 g por 10 min e o segundo a 18000 g por 20 min. O sobrenadante foi coletado e o conteúdo de leghemoglobina foi estimado pela absorvância a 410 nm (Appleby e Bergersen, 1980).

3.17. Microscopia eletrônica de transmissão

Amostras dos nódulos foram fixados em 25 % de glutaraldeído em tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,0) durante 1 h à temperatura ambiente, e depois mantida a 4 ° C durante 16 h. Em seguida, as amostras foram lavadas com três trocas de tampão fosfato 0,1 M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 2,0 % durante 1 h. As amostras foram novamente lavadas com tampão como descrito acima, antes de serem desidratadas com acetona a 30 %, 50 %, 70 %, 95 % e 100 %, com incubação de 30 min cada. Os tecidos foram embebidos gradualmente em resina Epon e mantidos a 60 °C durante 72 h para a polimerização. Os blocos resultantes foram seccionados com uma espessura de 800 nm em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT) com navalha de diamante e coradas uma solução aquosa contendo azul de toluidina a 1% e fucsina básica. Cortes ultrafinos (100 nm de espessura) foram preparadas usando o mesmo ultramicrotomo e pós-contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão (Philips modelo EM208S - Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS).

3.18. Análise estatística

Todos os ensaios foram avaliados por “one-way” ANOVA e as médias foram comparadas pelos testes de Tukey ou Bonferroni. As análises foram feitas com software GraphPad Prism (versão 5.0 para Windows). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção da estirpe e otimização da expressão da urease de *B. japonicum*

Inicialmente, foi realizada uma etapa de triagem para escolha da estirpe a ser utilizada para a purificação da urease nativa de *B. japonicum*. Foram feitas análises de quantificação enzimática de nove estirpes cultivadas em meio YM a 28 °C por cinco dias. Na tabela 5, podemos observar a variação nos conteúdos de proteínas e de urease no extrato bruto entre as estirpes avaliadas. As estirpes SEMIA 5038 (isolada a partir da estirpe USDA110) e USDA110 apresentaram maior atividade enzimática, tanto em termos de atividade total como atividade específica. *B. japonicum* USDA110 foi selecionada para purificação da urease, uma vez que nos estudos posteriores esta estirpe seria utilizada para deleção dos genes *URE*.

Tabela 5: Atividade enzimática da urease em estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*. As bactérias foram cultivadas em meio YM por cinco dias a 28 °C, sob agitação de 180 rpm. Uma unidade de urease consiste na quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de amônia por minuto, em 20 mM NaPB pH 7,5 à 37°C.

Estirpe	Atividade (U.mL ⁻¹)	Qtd ptn (mg.mL ⁻¹)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)
SEMIA 566	0,104	0,88	0,118
SEMIA 586	0,081	0,58	0,139
SEMIA 5032	0,083	0,60	0,139
SEMIA 5038	0,210	1,11	0,189
SEMIA 5039	0,062	0,71	0,087
SEMIA 5079	0,059	0,62	0,096
SEMIA 5080	0,080	0,81	0,098
SEMIA 5085	0,078	0,61	0,127
USDA110	0,102	0,47	0,216

Em seguida, a produção de urease de *B. japonicum* (BJU) estirpe USDA110 (Bj110) foi avaliada com a utilização do meio YM, o qual foi modificado pela adição de concentrações variadas de níquel (Ni), necessário para ativação da enzima, e ureia, substrato da urease (Tab. 6). Após cinco dias de cultivo, observou-se uma variação na produção de urease de 0,040 a 0,340 U.mL⁻¹ de suspensão bacteriana nas condições testadas. A melhor condição para produção da urease foi obtida com a adição de 0,1 µM de Ni e 1 mM de ureia no meio de cultura. Posteriormente, essas duas substâncias foram avaliadas separadamente. O meio de cultura foi acrescido de 0,1 µM de Ni ou 1 mM de ureia. Verificou-se que, quando utilizadas em conjunto, obtém-se um maior conteúdo proteico e uma alta atividade enzimática, em comparação com cultivos em que foi adicionado somente Ni ou somente ureia (Tab. 7). Deste modo, os cultivos posteriores, visando a purificação da urease bacteriana, foram realizados em meio YM acrescido de 0,1 µM de Ni e 1 mM de ureia.

Sabe-se que a regulação da expressão de urease em função da disponibilidade de nitrogênio varia entre diferentes microrganismos. A expressão da urease pode ser reprimida por amônia (ou por ureia, devido à liberação de amônia), pode ser induzida por ureia ou em condições em que o nitrogênio está limitado, ou ainda pode haver expressão constitutiva da enzima (Moblely e Hausinger, 1989). Em relação a bactérias fixadoras de nitrogênio, a urease de duas estirpes de *Bradyrhizobium* spp. foram induzidas por ureia (Sen et al., 2008), enquanto que as enzimas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* e *R. meliloti* não são induzidas na presença de ureia como fonte de nitrogênio (Miksch e Eberhardt, 1994; Toffanin et al., 2002).

Tabela 6: Resposta de *B. japonicum*, em relação à atividade da urease, à adição de Ni e ureia ao meio de cultura. Foi utilizado meio YM com a adição de 0,01, 0,1, 1 ou 10 μM de níquel, e 0,1, 1 ou 10 mM de ureia. As culturas foram mantidas por cinco dias a 28 °C, sob agitação de 180 rpm. A atividade ureolítica presente no extrato bruto de cada cultura foi avaliada pelo método do fenol-nitroprussiato. Uma unidade de urease consiste na quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de amônia por minuto.

Níquel (μM)	Ureia (mM)	OD ₆₀₀	Atividade (U.mL ⁻¹)	Proteína (mg.mL ⁻¹)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)
0,01	0,1	0,517	0,040	0,47	0,086
0,01	1	0,554	0,032	0,62	0,044
0,01	10	0,263	0,128	0,59	0,167
0,1	0,1	0,681	0,173	0,80	0,131
0,1	1	1,392	0,340	0,96	0,214
0,1	10	0,250	0,118	0,37	0,250
1	0,1	0,743	0,148	0,85	0,106
1	1	0,690	0,107	0,75	0,104
1	10	0,286	0,132	0,50	0,192
10	0,1	0,683	0,145	0,79	0,104
10	1	0,644	0,110	0,84	0,072
10	10	0,201	0,102	0,47	0,165
0	0	0,721	0,089	0,81	0,069

Tabela 7: Resposta de *B. japonicum*, em relação à atividade da urease, à adição de Ni ou ureia ao meio de cultura. Foi utilizado meio YM com a adição de 0,1 μM de níquel e/ou 1 mM de ureia. As culturas foram mantidas por cinco dias a 28 °C, sob agitação de 180 rpm. A atividade ureolítica presente no extrato bruto de cada cultura foi avaliada pelo método do fenol-nitroprussiato. Uma unidade de urease consiste na quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de amônia por minuto.

Níquel (μM)	Ureia (mM)	OD ₆₀₀	Atividade (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
0	1	1,883	0,118	0,62	0,191
0,1	0	0,387	0,051	0,46	0,112
0,1	1	1,300	0,180	0,97	0,186
0	0	0,525	0,051	0,48	0,106

Em seguida, a produção da BJU foi avaliada em relação à curva de crescimento bacteriana. A estirpe Bj110 foi cultivada em meio YM a 28 °C, sob agitação de 180 rpm. Uma alíquota foi coletada em diferentes tempos para avaliação da atividade ureolítica. A atividade enzimática aumentou com a multiplicação bacteriana, atingindo seu pico quando as bactérias atingiram a OD₆₀₀ igual a 1,0 (Fig. 6). Deste modo, esta OD₆₀₀ foi selecionada para experimentos posteriores. Segundo Sen e colaboradores (2008), uma maior expressão da urease de *Bradyrhizobium* spp. ocorre em condições limitantes de nitrogênio. No presente estudo, o pico de atividade da urease coincidiu com o pico de crescimento das bactérias e uma provável redução no nível de nitrogênio presente no meio de cultura.

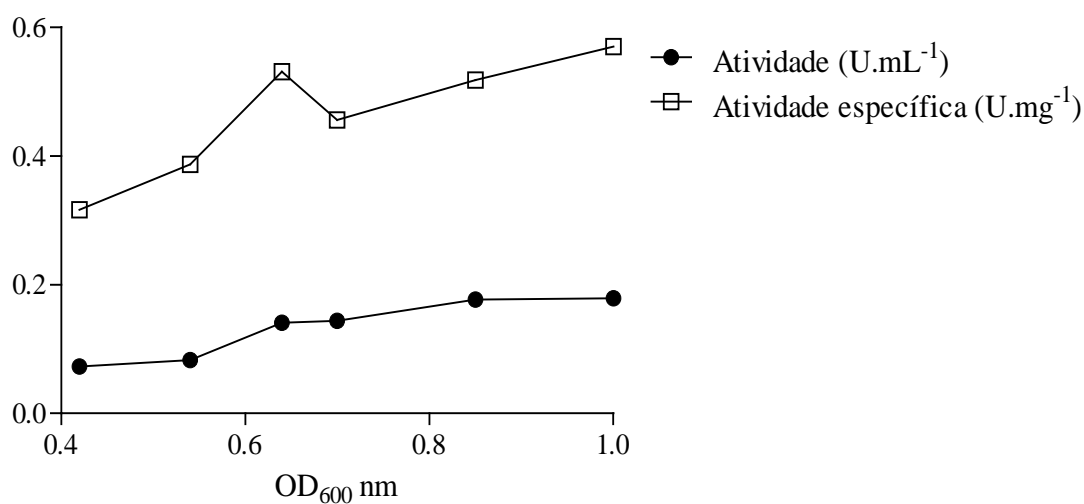


Figura 6: Atividade da urease de *Bradyrhizobium japonicum* em função do tempo de cultivo. *B. japonicum* USDA110 foi cultivada em meio YM, com adição de 0,1 µM de níquel e 1 mM de ureia, a 28 °C, sob agitação de 180 rpm. Uma alíquota foi coletada em diferentes tempos para avaliação da atividade ureolítica. Uma unidade de atividade ureásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de amônia por minuto.

4.2. Purificação da urease de *B. japonicum*

A otimização da expressão da BJU foi seguida da purificação da enzima, com base em protocolos desenvolvidos previamente por nosso grupo para outras ureases (Follmer et al., 2001; Follmer et al., 2004a; Menegassi et al., 2008). A metodologia empregada para obtenção da BJU compreendeu duas etapas sequenciais de cromatografia de troca iônica sequenciais, nas resinas Q-Sepharose e Source 15-Q.

As bactérias foram cultivadas em meio YM, suplementado com 0,1 μ M de níquel e 1 mM de ureia, a 28 °C, sob agitação de 180 rpm. Quando o cultivo bacteriano atingiu OD₆₀₀ igual a 1, as bactérias foram centrifugadas, suspensas em tampão PEB pH 7,5 e submetidas à lise celular por ultrassom. O extrato bruto foi aplicado na resina Q-Sepharose e as proteínas retidas foram eluídas com gradiente descontínuo de NaCl, variando de 0, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 M, em pH 7,5. A Figura 7 demonstra o perfil de eluição obtido nesta etapa de purificação. O pico de atividade da BJU foi obtido na eluição com 0,3 M de NaCl. Comportamento similar na cromatografia de troca iônica foi observado para as ureases vegetais de *C. ensiformis* (Follmer et al., 2001), soja (Follmer et al., 2004a) e algodão (Menegassi et al., 2008) e também para a urease de *H. pylori* (Wassermann et al., 2010).

A fração de 0,3 M NaCl, rica em atividade enzimática, foi dessalinizada por diálise e submetida a uma nova cromatografia de troca iônica na resina Source 15-Q. As proteínas foram eluídas com gradiente contínuo de 0 a 1 M de NaCl, em pH 8,0, sendo o pico de atividade eluído com força iônica de 0,25 a 0,3 M de NaCl. O perfil de eluição da cromatografia pode ser observado na figura 8. As frações correspondentes aos picos de atividade das cromatografias foram visualizadas por SDS-PAGE (*inset* - Figura 8), no qual pode ser observada uma banda de aproximadamente 60 kDa, correspondente a subunidade

α da BJU. Após as duas etapas de purificação, a BJU foi obtida com um rendimento enzimático de 24,5 % e um índice de purificação de 4,3 vezes (Tabela 8), sendo constatada a presença de contaminantes minoritários.

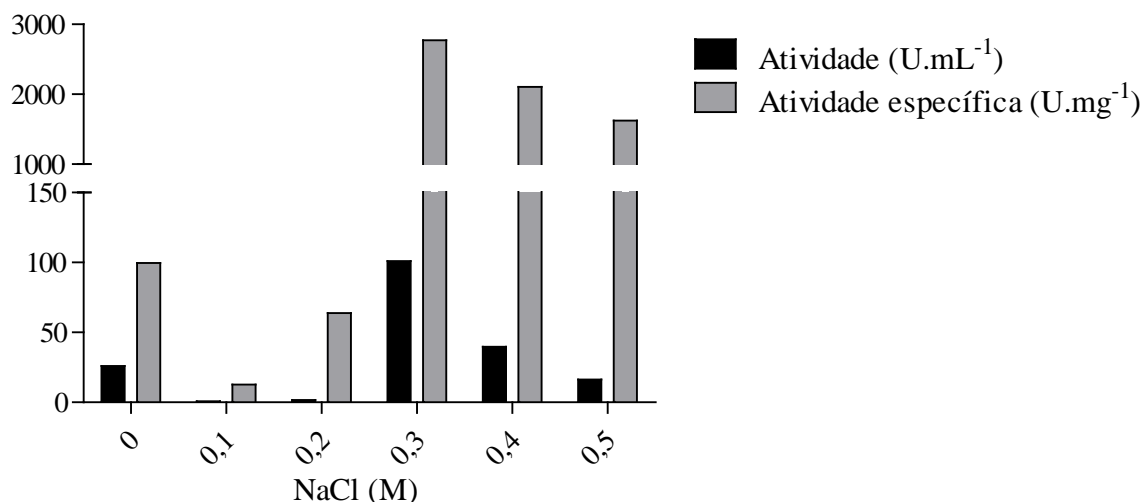


Figura 7: Perfil de eluição na troca iônica em Q-Sepharose. As proteínas foram eluídas com gradiente descontínuo de 0 a 0,5 M de NaCl. As barras mostram a quantificação da atividade enzimática (U.mL⁻¹) e da atividade específica (U.mg⁻¹) das frações obtidas na cromatografia. Uma unidade de atividade ureásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de amônia por minuto.

O próximo passo consistiu na caracterização da BJU em relação a sua atividade indutora de exocitose. Para esse fim, nosso grupo utiliza como modelo experimental a agregação de plaquetas de coelho. Estudos prévios, inicialmente com a canatoxina e depois estendidos para as ureases embrião-específica de soja (eSBU), de *B. pasteurii* (BPU) e de *H. pylori* (HPU), mostraram que independente da fonte, ureases são capazes de ativar plaquetas em concentrações de 10^{-6} a 10^{-8} M (Carlini et al., 1995; Follmer et al, 2004a; Menegassi et al., 2008; Olivera-Severo et al., 2006; Wassermann et al., 2010). As ureases

induzem a exocitose dos grânulos densos plaquetários, e o ADP liberado leva à agregação plaquetária, medida pela variação da transmitância de luz em suspensões de plaquetas.

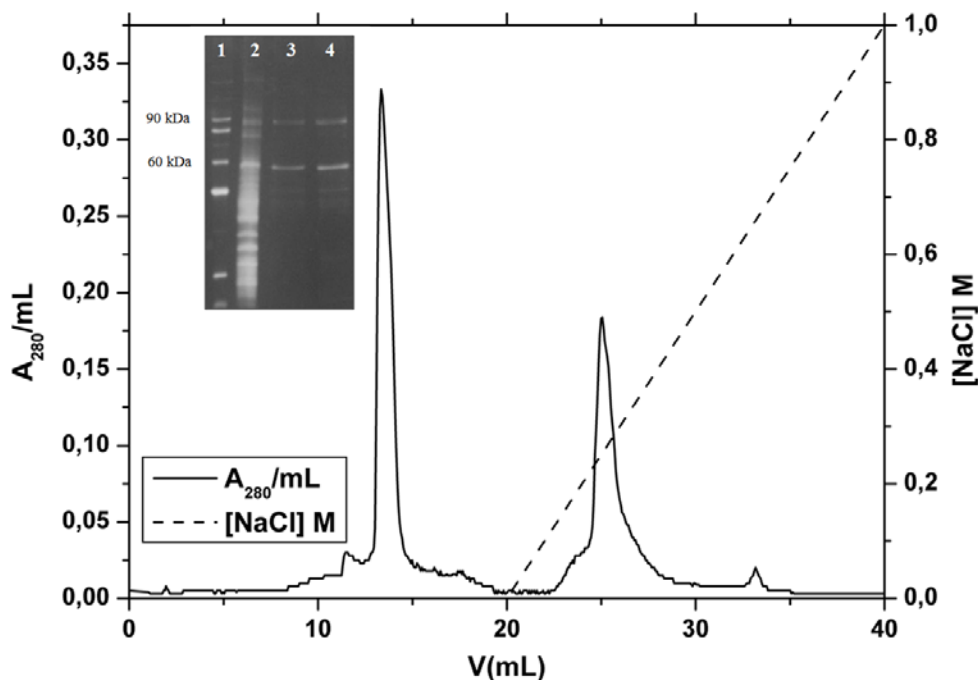


Figura 8: Perfil de eluição obtido na cromatografia de troca iônica Source 15-Q. Troca iônica realizada em sistema FPLC, pH 8,0, com eluição em gradiente de 0 a 1,0 M NaCl em 20 mL. Fluxo 0,5 mL/min, coleta das frações por picos em A_{280} . O pico de atividade foi eluído entre 0,25 e 0,3 M NaCl. Alíquotas (3 μ g) do extrato bruto e das frações correspondentes aos picos de atividade das duas cromatografias foram visualizadas por SDS-PAGE (inset), corados com nitrato de prata (negativo na foto). A banda de aproximadamente 60 kDa corresponde a subunidade maior da BJU. 1 – Marcador de massa molecular, 2 – Extrato bruto, 3 – Q-Sepharose, 4 – Source 15-Q.

Tabela 8: Purificação da urease de *B. japonicum*. Uma unidade de atividade ureásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de amônia por minuto.

Fracões	Volume (mL)	Proteína (mg.mL ⁻¹)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U)	Rendimento (%)	Índice de purificação
Extrato bruto	25	1,8	45	0,8	100	1
Q-Sepharose	100	0,04	4	2,8	31	3,5
Source 15-Q	10	0,25	2,5	3,4	24,5	4,3

A figura 9 ilustra o padrão de agregação induzido por colágeno (Fig. 9a) ou pela BJU purificada (Fig. 9b) em uma suspensão de plaquetas de coelho. O colágeno foi utilizado como controle positivo (Fig. 9a), por ser um dos indutores fisiológicos de agregação plaquetária. Assim como observado com todas as ureases estudadas até o momento, a BJU foi capaz de induzir a agregação plaquetária, comparável na cinética e na extensão com a resposta das plaquetas ao colágeno.

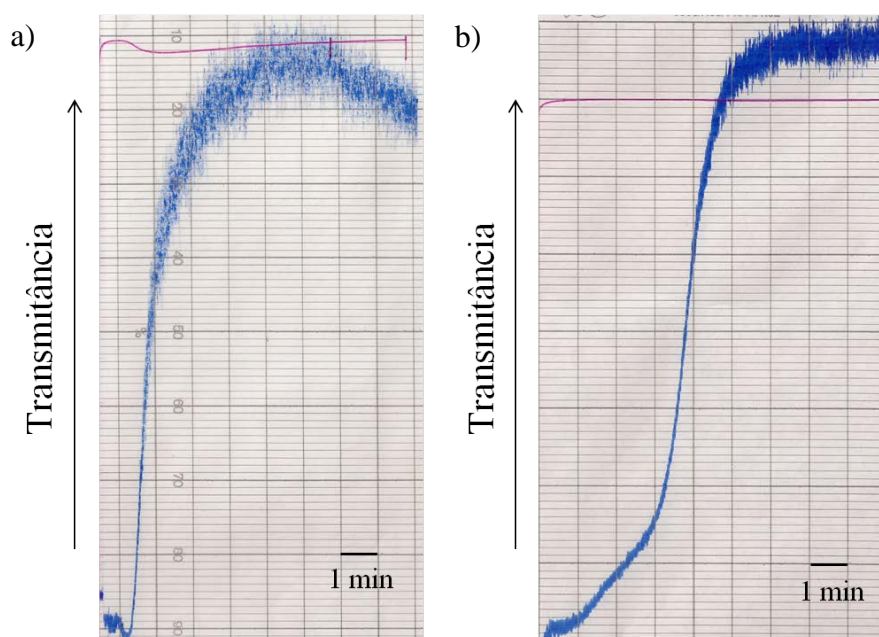


Figura 9: Agregação plaquetária induzida por colágeno ou pela urease de *B. japonicum*. Colágeno (a, $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ou BJU (b, $0,6 \mu\text{M}$) foram adicionados a plasma rico em plaquetas preparado a partir de sangue de coelho. O colágeno foi utilizado como controle positivo por ser um dos indutores fisiológicos de ativação plaquetária. A ocorrência de agregação plaquetária foi observada pelo aumento da transmitância em lumi-agregômetro e registrada por 10 min.

Esse é um resultado importante, pois mostra que tanto ureases vegetais quanto bacterianas, independente de suas estruturas quaternárias diferenciadas, conservaram a propriedade de induzir excitose em alguns tipos celulares. Esta propriedade pode estar relacionada com o papel fisiológico da proteína nos organismos produtores de urease.

4.3. Caracterização dos mutantes de *B. japonicum*

As ureases apresentam estruturas altamente conservadas e mecanismo catalítico bastante similar, evidenciando sua conservação durante o processo evolutivo. No entanto, o papel fisiológico desta enzima, principalmente em plantas, ainda é pouco entendido. Para isso, estudos *in vivo* utilizando organismos deficientes na urease podem trazer um grande avanço na compreensão das propriedades biológicas dessa enzima.

Com o objetivo de estudar o papel da urease na interação entre soja e *B. japonicum*, dois mutantes de *B. japonicum* foram construídos no Laboratório de Interação Legume-Micróbio, da Universidade de Missouri (EUA). Uma das estirpes mutantes não produz a urease, denominada $\Delta ureABC$, por ter deleção dos 3 genes estruturais que codificam a proteína. A segunda estirpe mutante produz uma apoenzima, ou seja, uma urease sem atividade enzimática pela falta de incorporação dos átomos de Ni no sítio ativo, denominada $\Delta ureG$, por ter deleção do gene que codifica a proteína acessória UreG. Resultados do nosso grupo mostram que as ureases, tanto vegetais quanto microbianas, possuem atividades biológicas que são independentes de sua atividade enzimática (Carlini e Polacco, 2008), tornando importantes estudos com mutantes em que a proteína está presente, porém, enzimaticamente inativa. Na figura 10, a abordagem utilizada para

construção dos mutantes de *B. japonicum* é ilustrada, consistindo na inserção do gene que confere resistência ao antibiótico canamicina através de recombinação homóloga, nas regiões que flaqueiam os genes alvos no genoma de *B. japonicum*.

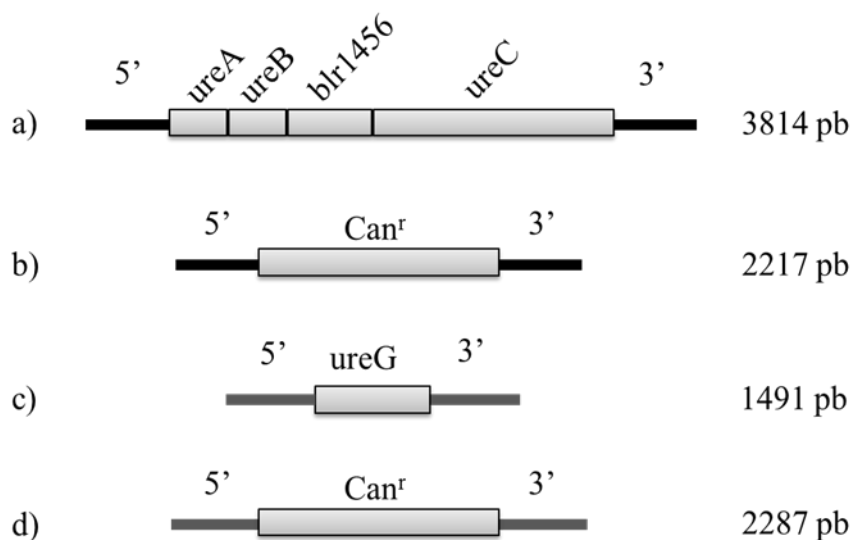


Figura 10: Ilustração esquemática da inserção de *Can^r* em *ureABC* e *ureG* de *B. japonicum*. a) Região dos genes estruturais da urease, *ureA*, *ureB* e *ureC*; b) Genes estruturais da urease interrompidos pelo gene *Can^r*; c) Região do gene acessório *ureG*; d) *ureG* interrompido pelo gene *Can^r*. Os números em pares de bases (pb) se referem ao tamanho da sequência amplificada por PCR.

Os mutantes foram confirmados por PCR (Fig. 11) e pela ausência de atividade ureolítica (Fig. 12). Na amplificação por PCR, o tamanho dos fragmentos de *ureABC* e *ureG* em Bj110 é de 3814 pb (Figs. 10a e 11) e 1491 pb (Fig. 10c e 11), respectivamente. Por recombinação homóloga das regiões que flanqueiam os genes de interesse, promove-se a inserção do gene de resistência a canamicina (*Can^r*). Desta maneira, na PCR, observa-se que o DNA do mutante $\Delta ureABC$ gera um fragmento de 2212 pb (Fig. 10b e 11), enquanto

que não há alteração em *ureG*. Por sua vez, a partir do DNA do mutante $\Delta ureG$ é amplificado um fragmento de 2287 pb (Fig. 10d e 11), sem haver alteração em *ureABC*.

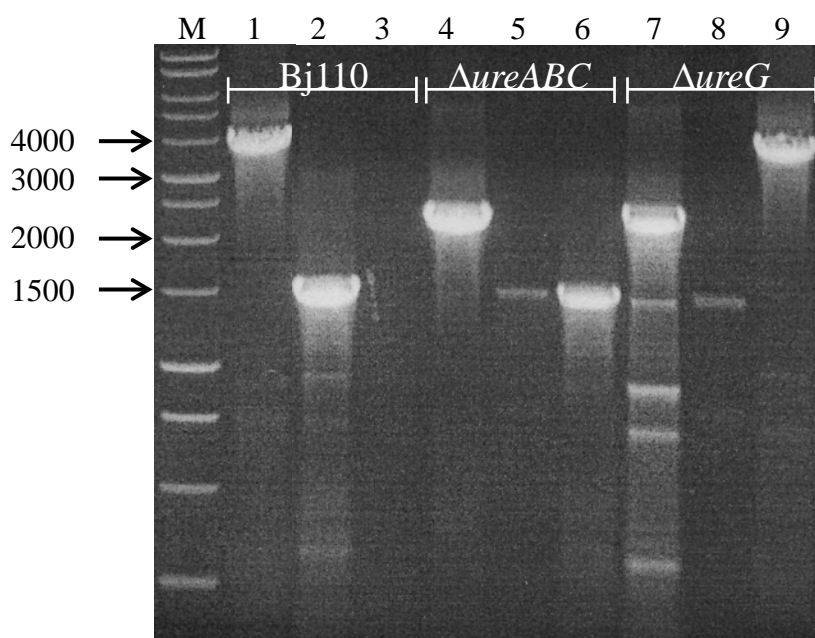


Figura 11: Confirmação dos mutantes por PCR. O DNA genômico da bactéria tipo selvagem *B. japonicum* USDA110 (Bj110) e dos mutantes de deleção ($\Delta ureABC$ e $\Delta ureG$) foi extraído e submetido à PCR com primers específicos. 1 – *ureABC* intacto, 2 – *ureG* intacto, 3 – Can^r , 4 – Interrupção de *ureABC* por Can^r , 5 – Can^r , 6 – *ureG* intacto, 7 – Interrupção de *ureG* por Can^r , 8 – Can^r , 9 – *ureABC* intacto.

Para verificação da atividade ureolítica, as bactérias foram cultivadas em meio AG a 28 °C, sob agitação. As células foram coletadas por centrifugação e suspensas em uma solução contendo 100 mM de ureia e vermelho de cresol, um indicador de pH. A hidrólise da ureia pela urease leva a liberação de amônia com consequente alcalinização do meio, que pode ser facilmente observada pela mudança na coloração do indicador. Claramente, os mutantes $\Delta ureG$ e $\Delta ureABC$ não apresentam atividade ureolítica, pois após a incubação

o meio apresenta a coloração original, que é amarelada, contrastando com o meio contendo a bactéria tipo-selvagem, Bj110, que se torna rosado em função da alcalinização promovida pela atividade ureásica. Além disso, as bactérias mutantes não são capazes de se multiplicar em meio mínimo contendo ureia como única fonte de nitrogênio (dados não mostrados).

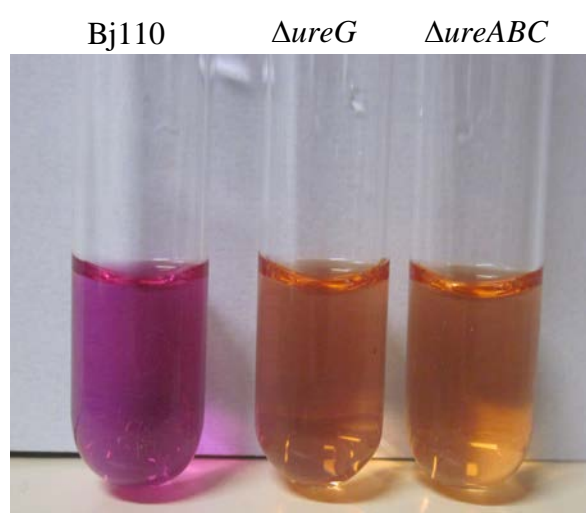


Figura 12: Atividade ureolítica de *B. japonicum* tipo-selvagem e mutantes. Culturas bacterianas foram coletadas por centrifugação e suspensas na solução indicadora de urease. A mudança da cor amarela para a cor rosa indica alcalinização do meio resultante da atividade ureolítica.

Quando cultivadas em meio de cultura AG-ágar ou em MM-ágar, não são observadas alterações na morfologia das colônias dos mutantes em relação ao tipo-selvagem. As três estirpes formam colônias brancas, convexas e com bordas lisas. As estirpes foram ainda caracterizadas pelo sua habilidade de utilização de diferentes fontes de nitrogênio e carbono, em MM-ágar. Os resultados do crescimento em diferentes fontes de carbono podem ser observados na tabela 9. Os compostos foram adicionados na concentração de 0,1 % em MM-ágar e 100 µL de bactérias, de uma suspensão contendo

10³ células/mL, foram espalhadas na superfície do meio. Após incubação a 28 °C por cerca de sete dias, o tamanho das colônias bacterianas avaliado visualmente. Não houve diferenças entre mutantes e tipo-selvagem em qualquer uma das fontes utilizadas. O gluconato de sódio se mostrou como a melhor fonte de carbono para o crescimento bacteriano, seguido pela L-Arabinose e pelo glicerol.

Tabela 9: Crescimento em diferentes fontes de carbono. As bactérias foram cultivadas em meio arabinose-gluconato até atingirem OD₆₀₀ de 0,4. Foram feitas diluições seriadas em solução salina (0,9 % de NaCl) e 100 µL de uma suspensão contendo 10³ células/mL foram espalhados em placas contendo meio mínimo-ágar com adição das diferentes fontes de carbono. O tamanho das colônias foi estimado visualmente após 7 dias de cultivo a 28 °C.

Fonte de carbono	Bj110	<i>ΔureG</i>	<i>ΔureABC</i>
Gluconato de sódio	+++	+++	+++
L-Arabinose	++	++	++
Glicerol	++	++	++
Glicose	+	+	+
Sacarose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Manitol	+	+	+

Para avaliação do uso de fontes de nitrogênio pelas bactérias, utilizou-se ureia, glutamato e nitrato de amônio, nas concentrações de 1, 2,5 e 5 mM. As três estirpes cresceram melhor com a adição de glutamato como fonte de nitrogênio (Figs. 13d, 13e e 13f), sendo observado que o crescimento das colônias bacterianas acompanhou o aumento da concentração desse composto no meio (dados não mostrados). O NH₄NO₃ mostrou-se uma boa fonte de nitrogênio, independente da concentração utilizada. Tanto para o glutamato como para o NH₄NO₃, não foram observadas diferenças entre o crescimento das três estirpes cultivadas em meio mínimo-ágar. Esperávamos que não houvesse crescimento

das estirpes mutantes quando cultivadas em meio mínimo-ágar contendo ureia como fonte de nitrogênio. Entretanto, pode-se observar nas figuras 13b ($\Delta ureG$) e 13c ($\Delta ureABC$) que ambos mutantes formaram colônias, ainda que nitidamente menores do que as colônias da estirpe selvagem, Bj110 (Fig. 13a). Isso provavelmente ocorreu pela presença de contaminantes nitrogenados em baixas concentrações no meio de cultura. Por fim, a melhor concentração de ureia para o crescimento de Bj110 foi de 1 mM. Em concentrações mais altas, o crescimento foi menos acelerado, possivelmente pela toxicidade da amônia formada na quebra da ureia.

Apesar de observarmos diferenças aparentemente não significativas entre as bactérias no tamanho das colônias formadas em placas contendo meio sólido, resultados diferentes foram obtidos no crescimento em meio líquido. As bactérias foram adicionadas a 100 mL de meio AG a partir de uma suspensão de 10^8 células/mL de cada. Os cultivos bacterianos foram mantidos a 28 °C, sob agitação, e alíquotas foram retiradas em intervalos para leitura da OD₆₀₀. Desta maneira, observamos que Bj110 apresenta um crescimento mais acelerado quando comparado com os mutantes (Fig. 14). Essa diferença no crescimento pode ser observada também quando as bactérias crescem em meio AG-ágar, mas não é observado em MM-ágar. A principal diferença entre os meios é a adição de extrato de levedura no meio AG, o qual pode estar sendo utilizado de maneira mais eficiente por Bj110.

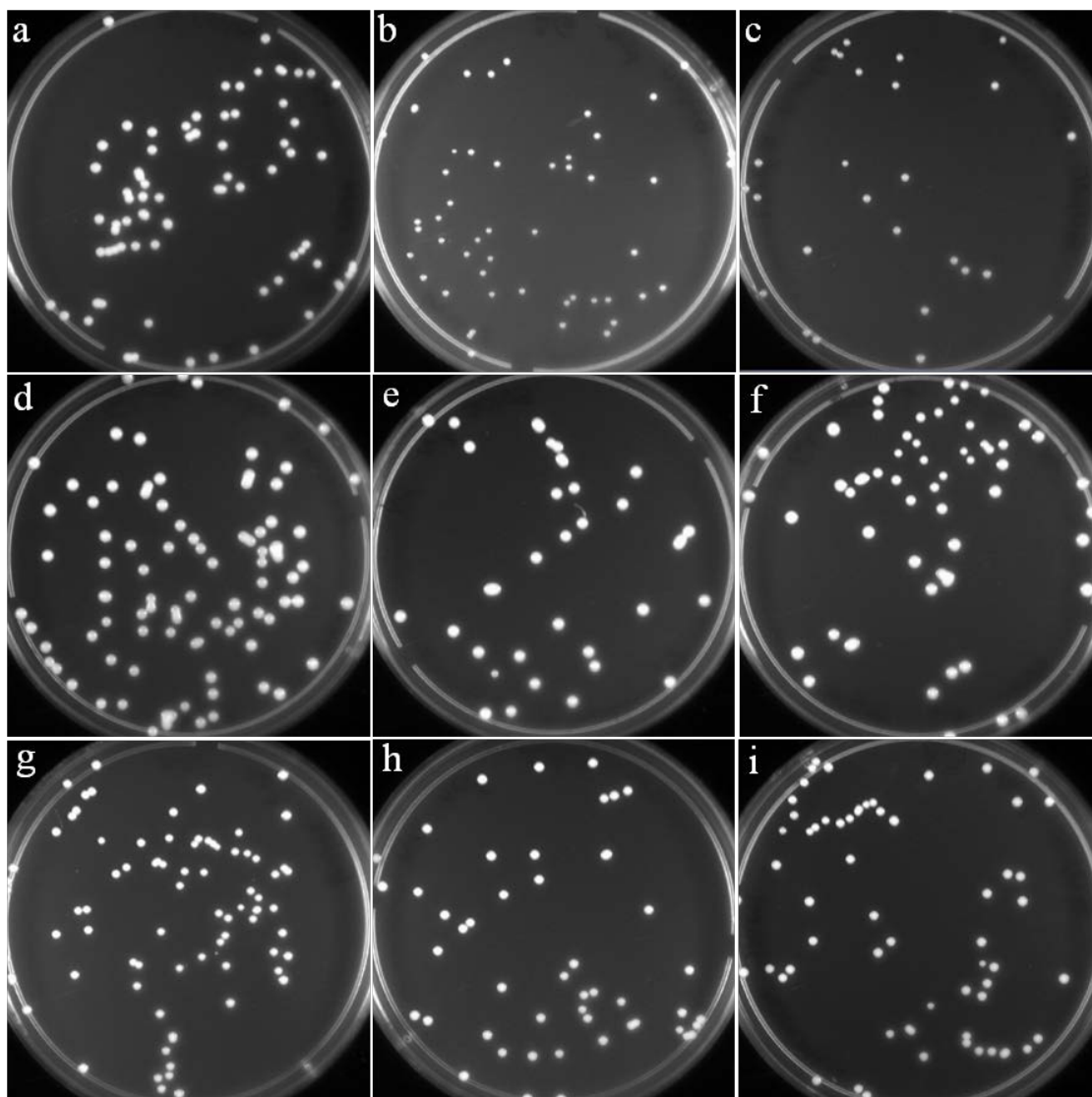


Figura 13: Crescimento de *B. japonicum*, tipo selvagem (Bj110) e mutantes ($\Delta ureG$ e $\Delta ureABC$), em diferentes fontes de nitrogênio. As bactérias foram cultivadas em meio arabinose-gluconato até atingirem OD_{600} de 0,4. Em seguida, foram feitas diluições seriadas em solução salina (0,9 % de NaCl) e 100 μ L de uma suspensão contendo 10^3 células/mL foram espalhadas em placas contendo meio mínimo-ágar com adição das diferentes fontes de nitrogênio. As fotos ilustram as colônias bacterianas após sete dias a 28 °C. a) Bj110 cultivada com 1 mM de ureia, b) $\Delta ureG$ cultivada com 1 mM de ureia, c) $\Delta ureABC$ cultivada com 1 mM de ureia, d) Bj110 cultivada com 2,5 mM de glutamato, e) $\Delta ureG$ cultivada com 2,5 mM de glutamato, f) $\Delta ureABC$ cultivada com 2,5 mM de glutamato, g) Bj110 cultivada com 2,5 mM de NH_4NO_3 , h) $\Delta ureG$ cultivada com 2,5 mM de NH_4NO_3 , i) $\Delta ureABC$ cultivada com 2,5 mM de NH_4NO_3 .

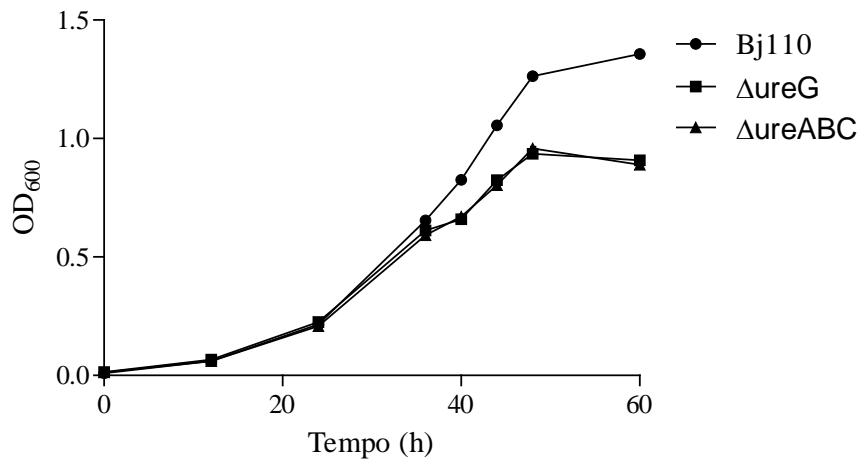


Figura 14: Multiplicação de *B. japonicum*, tipo-selvagem e mutantes. As bactérias foram cultivadas em meio arabinose-gluconato, a 28 °C, e alíquotas foram retiradas em intervalos para leitura da OD₆₀₀. Cada ponto representa a média de triplicatas, sendo que o desvio padrão está inserido dentro dos símbolos.

4.4. Efeito quimiotático de ureases sobre *B. japonicum*

Inicialmente sugerido em estudos com a urease da bactéria do solo, *Bacillus pasteurii* (Olivera-Severo et al., 2006), nessa tese trabalhamos com a hipótese de que as ureases de soja e/ou de *B. japonicum* estão potencialmente envolvidas na sinalização entre a planta e a bactéria. Resultados anteriores do grupo com a isoforma de urease de *C. ensiformis*, a canatoxina (Barja-Fidalgo et al., 1992), e com urease bacteriana HPU (Uberti, 2010) mostraram que essas proteínas são quimiotáticas para neutrófilos e outras células pró-inflamatórias. Considerando esses dados, avaliamos a hipótese de uma possível atividade quimiotática da uSBU, urease presente nas raízes de soja, sobre *B. japonicum*. O ensaio foi realizado em câmara de Boyden (Fig. 5, material e métodos) e, inicialmente, foram realizados ensaios de otimização dos seguintes parâmetros: diâmetro dos poros da membrana, tempo de incubação e concentração de células bacterianas. Com esses testes,

foi determinada a utilização da membrana com poros de 2 μm , o tempo de incubação de 60 min e a aplicação de uma suspensão bacteriana contendo 10^6 células/mL.

A uSBU utilizada no ensaio é uma proteína recombinante fusionada a GST produzida em *E. coli*. A purificação da uSBU é feita por cromatografia de afinidade com a resina Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare), sendo a proteína eluída com glutathione reduzida (Martinelli, 2007). Inicialmente, foi realizado um ensaio para avaliar o grau de atração de células de *B. japonicum* induzida por diferentes concentrações de uSBU e da proteína fusionada à uSBU, a Glutathione-S-transferase (GST), utilizada como controle. Para realização do ensaio, o compartimento inferior da câmara foi preenchido com 28 μL de uma suspensão de células de *B. japonicum* e o compartimento superior com 50 μL de uSBU ou GST em concentrações variando de 0,1, a 9 μM . Na figura 15, pode-se observar que o aumento da concentração de uSBU foi acompanhado pelo aumento nas unidades formadoras de colônias (UFC) de *B. japonicum*, recuperadas no compartimento superior da câmara de Boyden. Já, a quimiotaxia induzida por GST aumentou até a concentração de 3 μM e depois se manteve estável.

Foi demonstrado anteriormente que a uSBU não é ativada enzimaticamente, faltando a incorporação de Ni durante sua produção em *E. coli* (Martinelli, 2007). Deste modo, o efeito da presença ou ausência da atividade ureolítica na quimiotaxia foi avaliado com a utilização das ureases vegetais eSBU (soja, embrião-específica) e da JBU (*C. ensiformis*, isoforma majoritária), as quais são enzimaticamente competentes. A eSBU foi purificada de acordo com o protocolo estabelecido por Follmer e colaboradores (2004a) e a JBU, em alto grau de pureza, foi obtida comercialmente. A atividade catalítica das ureases foi inibida pelo tratamento com *p*-hidroximercuribenzoato (*p*-HMB), um agente oxidante de cisteínas (Follmer et al., 2001). As ureases foram adicionadas ao

compartimento superior da câmara de Boyden na concentração de 3 μM cada. Não foram observadas diferenças significativas na quimiotaxia induzida por ureases com e sem atividade ureolítica, como revelado pela contagem de UFC das bactérias recuperadas do compartimento superior da câmara de Boyden (Figura 16). Deste modo, concluímos que o efeito quimiotático de ureases vegetais é percebido também por bactérias, além de células eucariotas como neutrófilos e monócitos, e consiste em mais uma atividade biológica das ureases que independe de sua atividade catalítica.

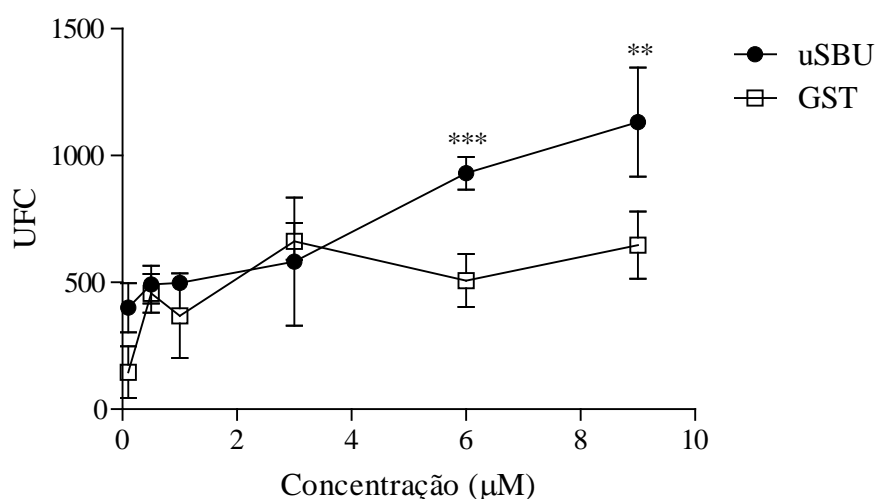


Figura 15: Curva dose-resposta de quimiotaxia induzida pela urease ubíqua de soja (uSBU) ou pela glutatona-S-transferase (GST) sobre *B. japonicum*. O experimento foi realizado em câmara de Boyden, contendo 10^6 células/mL de Bj110 no compartimento inferior e diferentes concentrações de uSBU ou GST (controle) no compartimento superior. Após 1h de incubação à temperatura ambiente, as células que migraram para o compartimento superior da câmara foram recuperadas e plaqueadas para contagem de UFC. Os pontos representam a média \pm DP de triplicatas. Pontos marcados com ** ($p < 0,01$) ou *** ($p < 0,001$) diferem significativamente em relação ao controle na mesma dose, pelo teste de Bonferroni.

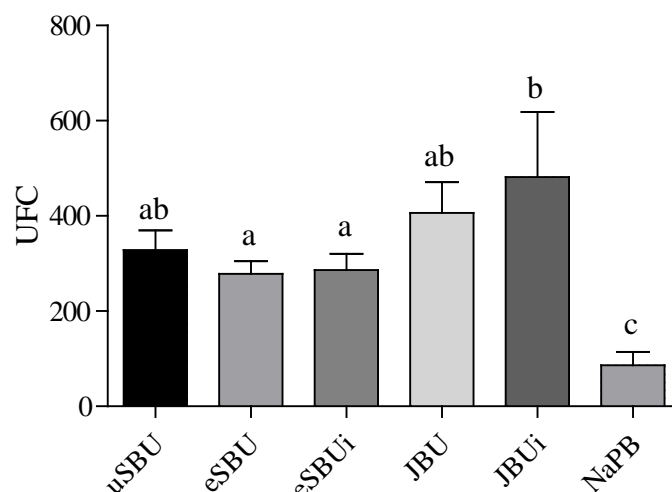


Figura 16: Efeito da atividade ureolítica de ureases vegetais na quimiotaxia de *B. japonicum*.

As ureases inibidas foram incubadas por 16h a 4 °C com 50 μM de *p*-hidroximercuribenzoato (*p*-HMB). O excesso de inibidor foi removido por diálise previamente à realização do ensaio. Todas as proteínas foram testadas na concentração de 3 μM. Após 1h de incubação à temperatura ambiente, as células que migraram para o compartimento superior da câmara foram recuperadas e plaqueadas para contagem de UFC. eSBU: urease embrião-específica da soja; eSBUi: eSBU inativada; JBU: urease de *C. ensiformis*; JBUi: JBU inativada; uSBU: urease ubíqua de soja recombinante. As barras representam a média ± DP de triplicatas.

Ensaio de quimiotaxia com os mutantes de *B. japonicum* indicaram que a ausência da proteína ($\Delta ureABC$) ou de sua atividade ureolítica ($\Delta ureG$) nas bactérias não alterou a atração das mesmas pela uSBU. A figura 17 mostra que não há diferença significativa no número de células de *B. japonicum* tipo-selvagem ou dos mutantes, atraídas pela uSBU durante o ensaio.

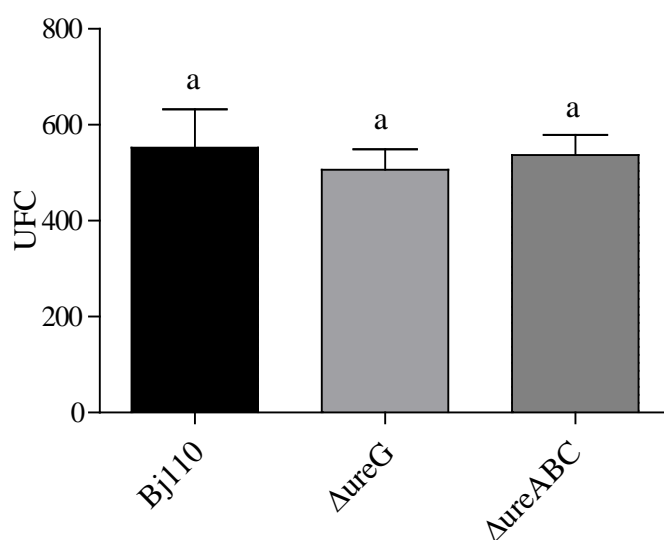


Figura 17: Resposta quimiotática de *B. japonicum* tipo-selvagem e mutantes induzida por uSBU. O experimento foi realizado em câmara de Boyden, contendo 10^6 células/mL de *B. japonicum* no compartimento inferior e $9 \mu\text{M}$ de uSBU no compartimento superior. Após 1h de incubação à temperatura ambiente, as células que migraram para o compartimento superior da câmara de Boyden foram recuperadas e plaqueadas para contagem de UFC. As barras representam a média \pm DP de seis replicatas. Colunas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Por fim, foi avaliada a resposta de células de *B. japonicum* ao efeito quimiotático induzido por diferentes proteínas, uSBU, GST, lectinas de soja (SBA) e de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), albumina (BSA), e do flavonoide genisteína, obtida de soja. Pode-se observar, na figura 18, que a migração de células bacterianas foi mais acentuada quando a uSBU foi utilizada como indutor. GST, SBA, PHA-L e BSA também foram capazes de induzir a migração de *B. japonicum*, porém diferindo significativamente da uSBU. Como demonstrado em outros estudos, a genisteína mostrou-se um fraco atrativo para *B. japonicum* (Barbour et al., 1991; Kape et al., 1991), sendo sua principal função a indução dos genes *NOD*.

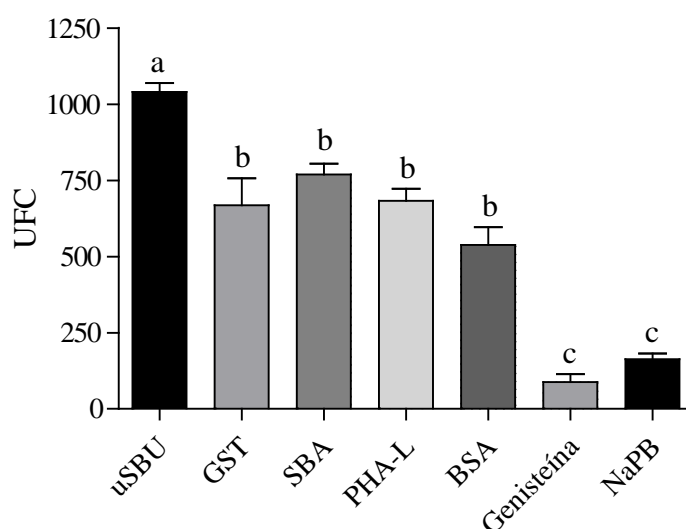


Figura 18: Resposta quimiotática de *B. japonicum* USDA110 induzida por diferentes compostos. Atração quimiotática sobre *B. japonicum* USDA110 induzida por 10 μ M de: urease ubíqua recombinante da soja (uSBU), a proteína de fusão GST, a lectina de soja (SBA), a lectina de *Phaseolus vulgaris*, a albumina (BSA) e a genisteína de soja. Tampão fosfato de sódio (NaPB) 20 mM foi utilizado como controle. Após 1h de incubação à temperatura ambiente, as células que migraram para o compartimento superior da câmara de Boyden foram recuperadas e plaqueadas para contagem de UFC. Colunas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.5. Ensaio de nodulação

Para avaliar o papel das ureases, vegetal e bacteriana, na nodulação e fixação biológica de nitrogênio, ensaios de nodulação foram montados utilizando plantas de soja e *B. japonicum* selvagens e mutantes em genes de ureases. As bactérias mutantes foram descritas no item 4.3. As sementes de soja mutantes foram cedidas pelo Dr. Joseph C. Polacco, Univ. Missouri, Columbia, MO, que ao longo de muitos anos, obteve e caracterizou diversos mutantes de soja deficientes em uma ou mais proteínas, estruturais e acessórias, das ureases. Neste trabalho, utilizamos sementes do duplo-mutante *eu1-sun/eu4*

(*eu1/eu4*), criado pelo cruzamento entre plantas que não produziam a eSBU (*eu1-sun/eu1/sun*), codificada pelo gene estrutural *Eu1*, e plantas (*eu4/eu4*) que produziam uma uSBU, codificada pelo gene *Eu4*, contendo uma mutação que a deixa enzimaticamente inativa (Meyer-Bothling e Polacco, 1987; Polacco et al., 1989; Goldraj et al., 2003).

Após a inoculação, as plantas foram transferidas para vasos de Leonard, recebendo solução nutritiva livre de nitrogênio ou água quando necessário. Os vasos foram mantidos em câmaras de crescimento a 28 °C, com fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro. A avaliação do efeito das inoculações sobre a formação dos nódulos foi feita pela determinação da massa fresca e do número de nódulos para cada tratamento, além da quantificação do conteúdo de leghemoglobina dos nódulos.

A figura 19 mostra os resultados dos ensaios de inoculação em relação ao número e à massa fresca de nódulos. Podemos observar que as plantas tipo-selvagem apresentam um número maior de nódulos quando comparadas às plantas mutantes, independente da estirpe inoculada (Fig. 19a). Não observamos diferenças quanto à massa fresca total de nódulos por planta (Fig. 19b). Porém, quando levamos em conta a massa fresca de cada nódulo, há um marcante aumento no tamanho dos nódulos nas plantas mutantes *eu1/eu4*, novamente independente da estirpe utilizada para inoculação. Esses resultados nos mostram que a urease bacteriana parece não ter um papel relevante na nodulação. Por outro lado, os dados mostram que ausência das ureases de soja afeta a nodulação por *B. japonicum*, reduzindo o número de nódulos e aumentando a massa daqueles que se formam, implicando um papel dessas proteínas nesse processo.

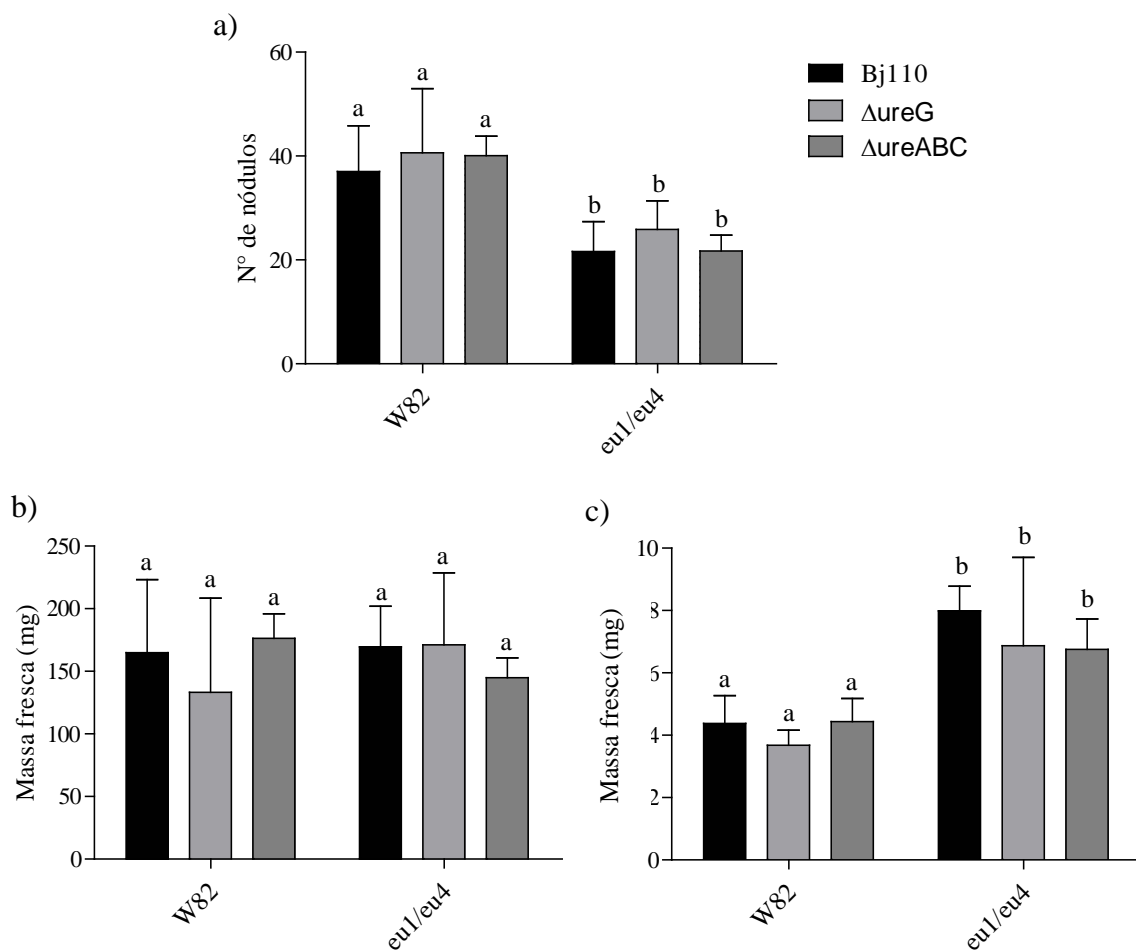


Figura 19: Ensaio de nodulação. Plantas de soja tipo-selvagem (W82) e mutante deficiente nas ureases embrião-específica e ubíqua (*eu1/eu4*) foram inoculadas com *B. japonicum* tipo-selvagem (Bj110), com uma estirpe mutante que produz uma apourease ($\Delta ureG$), ou com uma estirpe mutante que não produz urease ($\Delta ureABC$). A quantidade e a massa de nódulos foram avaliadas 21 dias após a inoculação. a) Quantidade de nódulos por planta. b) Massa fresca total de nódulos por planta. c) Razão entre a massa fresca total de nódulos e o número de nódulos. As barras representam a média de cinco vasos Leonard, cada um contendo de 2 a 3 plantas. Barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Até o momento, são escassos os trabalhos que avaliam o papel de ureases na simbiose entre plantas e microrganismos. Com a utilização de uma estirpe mutante no gene *ureE* de *R. leguminosarum*, Toffanin e colaboradores (2002) mostraram que a atividade ureásica não é importante na fixação biológica de nitrogênio em ervilha. Essa mutação

impede a formação correta do sítio ativo, pois na ausência da proteína acessória UreE não há incorporação de Ni na apoenzima. Entretanto, essa mutação não afeta a síntese das apoenzimas, as quais estão presentes apesar de destituídas de atividade enzimática, e poderiam estar contribuindo para o processo de nodulação de maneira independente da atividade ureolítica.

Para avaliarmos a importância somente da atividade ureolítica durante a nodulação de soja por *B. japonicum*, foi utilizado um inibidor específico da urease denominado fenilfosforodiamidato (PPD), um análogo da ureia que se liga ao sítio ativo da enzima (Benini et al., 1999; Ciurli et al., 1999). Neste caso, foram utilizadas plantas e bactérias tipo-selvagem, W82 e Bjl10, respectivamente. As plântulas foram inoculadas como descrito acima e o inibidor foi adicionado à solução nutritiva adicionada nos vasos de Leonard. A inibição foi mantida durante todo o período do ensaio. As plantas foram avaliadas 21 dias após a inoculação por meio da contagem e pesagem dos nódulos.

Ao final do experimento, a atividade ureásica foi avaliada em nódulos e folhas, confirmando a inibição da enzima pelo PPD. Mesmo assim, não foram observadas diferenças tanto no número quanto na massa fresca de nódulos nas plantas em que a atividade da urease foi inibida (+ PPD, Fig. 20a e b). Em concordância com nossos dados, Todd e Polacco (2004) não observaram alterações no conteúdo de proteína total, ureídeos e ureia em plantas de soja inoculadas, tratadas ou não com PPD. Esses resultados contrastam com os dados mostrados na figura 19, indicando que o possível papel da urease na nodulação não depende da atividade ureolítica, quer da enzima vegetal ou da bacteriana.

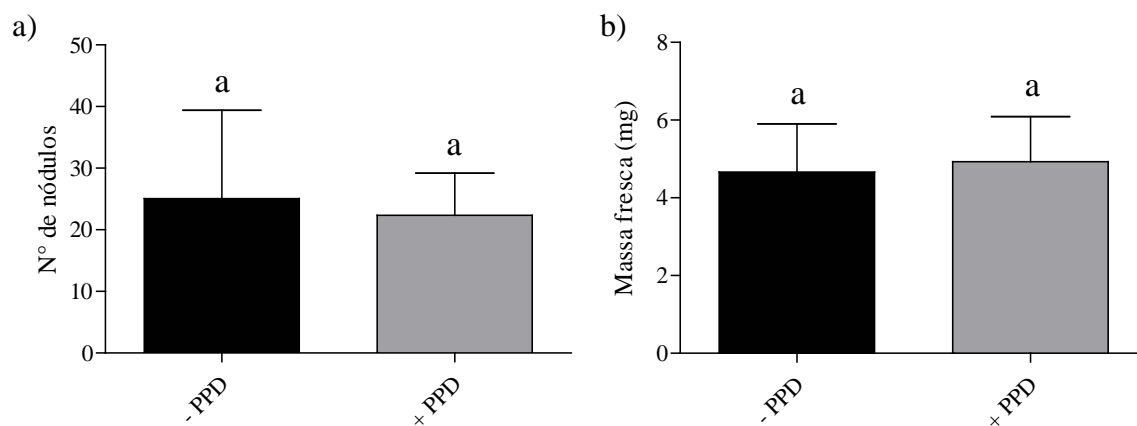


Figura 20: Influência da atividade ureolítica na nodulação de soja por *B. japonicum*. Plântulas de soja tipo-selvagem (W82) foram inoculadas com *B. japonicum* USDA110. O tratamento consistiu na adição (+ PPD) ou não (- PPD) do inibidor fenilfosforodiamidato (PPD) na solução nutritiva disponibilizada às plantas. A quantidade e a massa de nódulos foram avaliadas 21 dias após a inoculação. a) Quantidade de nódulos por planta. b) Razão entre a massa fresca total de nódulos e o número de nódulos. As barras representam a média de cinco vasos Leonard, cada um contendo de 2 a 3 plantas. Barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

O próximo passo foi verificar se há alteração na capacidade de fixação de nitrogênio nos nódulos formados nas associações planta-bactéria com as diferentes mutações em genes de urease. Um método que pode ser utilizado para essa finalidade é a quantificação da leghemoglobina (LegHb). A presença dessa proteína nos nódulos está ligada a atividade da nitrogenase, a qual é extremamente sensível a O_2 , de modo que a LegHb mantém um ambiente com baixo O_2 livre no nódulo (Downie, 2005). Dakora, em 1995, mostrou uma correlação direta entre a concentração de LegHb em nódulos formados em soja e grão-de-bico com o conteúdo de nitrogênio e de ureídeos e com a atividade de redução de acetileno pela nitrogenase. Deste modo, a estimativa da concentração de LegHb consiste em uma maneira indireta de medir a atividade da nitrogenase e, conseqüentemente, a eficiência da fixação biológica de nitrogênio.

O conteúdo de LegHb foi avaliado por espectrofotometria a 410 nm. Para isso, os nódulos foram macerados em tampão fosfato-salina (PBS) e o sobrenadante foi recolhido por centrifugação. Quando o conteúdo de LegHb foi normalizado pela quantidade de proteína presente em cada extrato, não foram observadas diferenças entre as inoculações (Figura 21a). Porém, quando o mesmo foi normalizado pela razão massa fresca por nódulo (estimada dividindo-se a massa fresca total pelo número de nódulos), pode-se observar um maior conteúdo de LegHb em Williams 82, independente da estirpe bacteriana utilizada (Figura 21b). Esse resultado pode ser um indício de que a atividade da nitrogenase é mais alta na planta urease-competente (tipo-selvagem).

Na simbiose entre rizóbios e leguminosas, ocorre a formação de um novo órgão, o nódulo, o qual depende tanto da planta quanto da bactéria para funcionar corretamente. Por ser um órgão complexo, torna-se difícil avaliar seu funcionamento em um ponto específico do ciclo de vida da planta. Assim, a quantidade de LegHb foi estimada em diferentes pontos do desenvolvimento do nódulo, de 16 a 42 dias após a inoculação.

Na figura 22, pode-se observar que as curvas de acúmulo de LegHb de plantas tipo-selvagem e de plantas mutantes seguem o mesmo padrão, independente da estirpe utilizada. As plantas tipo-selvagem começam com uma quantidade menor de LegHb, a qual sobe rapidamente, atingindo o pico aos 21 dias após a inoculação. Já as plantas mutantes, apesar de apresentarem uma maior quantidade de LegHb aos 16 dias após a inoculação, atingem a quantidade máxima dessa proteína somente 35 dias após a inoculação (Fig. 22). O padrão alterado de acúmulo de leghemoglobina nas plantas *eu1/eu4* mostra que a ausência da urease de alguma maneira comprometeu a simbiose entre a planta e a bactéria, retardando o pico de leghemoglobina, de 21 dias, na planta selvagem, para cerca de 35 dias.

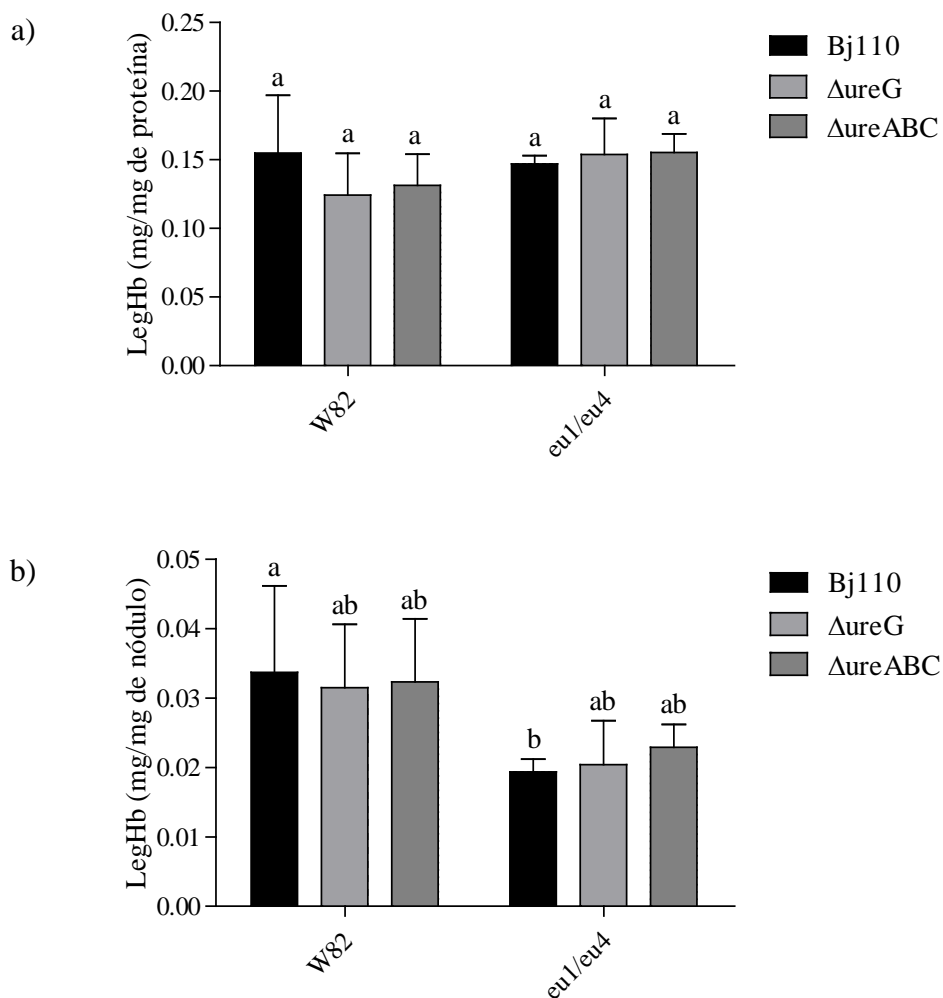


Figura 21: Conteúdo de leghemoglobina (LegHb) em nódulos. Plântulas de soja tipo-selvagem (W82) e um mutante deficiente nas ureases embrião-específica e ubíqua (*eu1/eu4*) foram inoculadas com *B. japonicum* tipo-selvagem (Bj110), com uma estirpe mutante que produz uma apourease ($\Delta ureG$), ou com uma estirpe mutante que não produz urease ($\Delta ureABC$). O conteúdo de LegHb foi medido por absorvância a 410 nm em extratos de nódulos coletados 21 dias após a inoculação. a) Conteúdo de LegHb expresso pelo teor de proteína no nódulo. b) Conteúdo de LegHb expresso por massa fresca de nódulos. As barras representam a média \pm DP de triplicatas. Barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

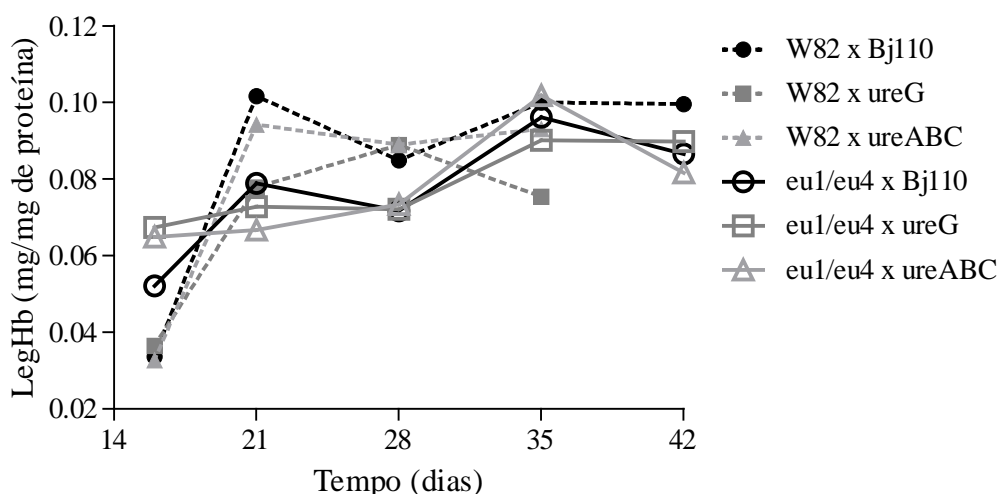


Figura 22: Conteúdo de leghemoglobina em função do tempo de inoculação. Foram utilizadas plantas de soja tipo selvagem (W82), e plantas mutantes sem urease (*eu1/eu4*), as quais foram inoculadas com *B. japonicum* tipo selvagem (Bj110), com uma estirpe mutante que produz uma apourease ($\Delta ureG$), ou com uma estirpe mutante que não produz urease ($\Delta ureABC$). O conteúdo de LegHb foi medido por absorbância a 410 nm, em extratos de nódulos coletados de 16 a 42 dias após a inoculação. Cada ponto corresponde à média de três a seis replicatas.

No caso das plantas de soja tipo-selvagem, a eficiência na fixação de nitrogênio foi ainda avaliada em relação à atividade da nitrogenase pelo método de redução de acetileno a etileno. A atividade enzimática foi mais alta quando tanto planta quanto bactéria possuíam ureases ativas (W82 x Bj110), porém somente aos 21 dias após a inoculação (Fig. 23). Nas plantas inoculadas com *B. japonicum* $\Delta ureABC$, o pico da atividade da nitrogenase foi posterior e menor, quando comparado com a interação com Bj110 (Fig. 23).

Em conjunto, esses resultados nos mostram que a deficiência de urease na planta, aparentemente sem implicar a urease da bactéria, causa alterações na fisiologia dos nódulos com consequentes alterações na eficiência da fixação biológica de nitrogênio.

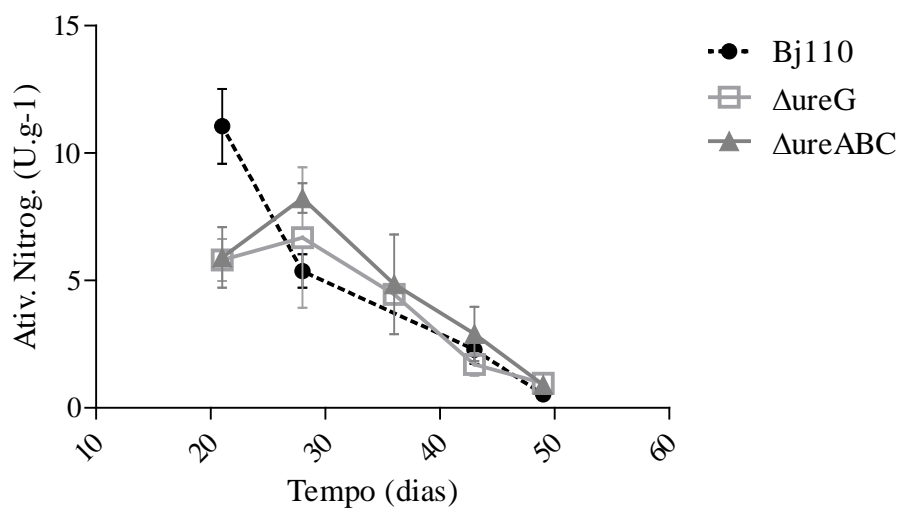


Figura 23: Atividade da Nitrogenase. Foram utilizadas plantas de soja tipo-selvagem (W82), as quais foram inoculadas com *B. japonicum* tipo selvagem (Bj110), com uma estirpe mutante que produz uma apourease ($\Delta ureG$), ou com uma estirpe mutante que não produz urease ($\Delta ureABC$). A atividade da enzima foi avaliada pelo ensaio de redução de acetileno de 21 a 49 dias após a inoculação. Cada ponto representa a média \pm DP de triplicatas.

Nódulos de plantas de soja tipo-selvagem e mutante foram coletados 35 dias após a inoculação com as estirpes de *B. japonicum* e analisados em microscopia eletrônica de transmissão. Não foram observadas alterações na arquitetura e na organização histológica nos nódulos das plantas deficientes em urease (Fig. 24).

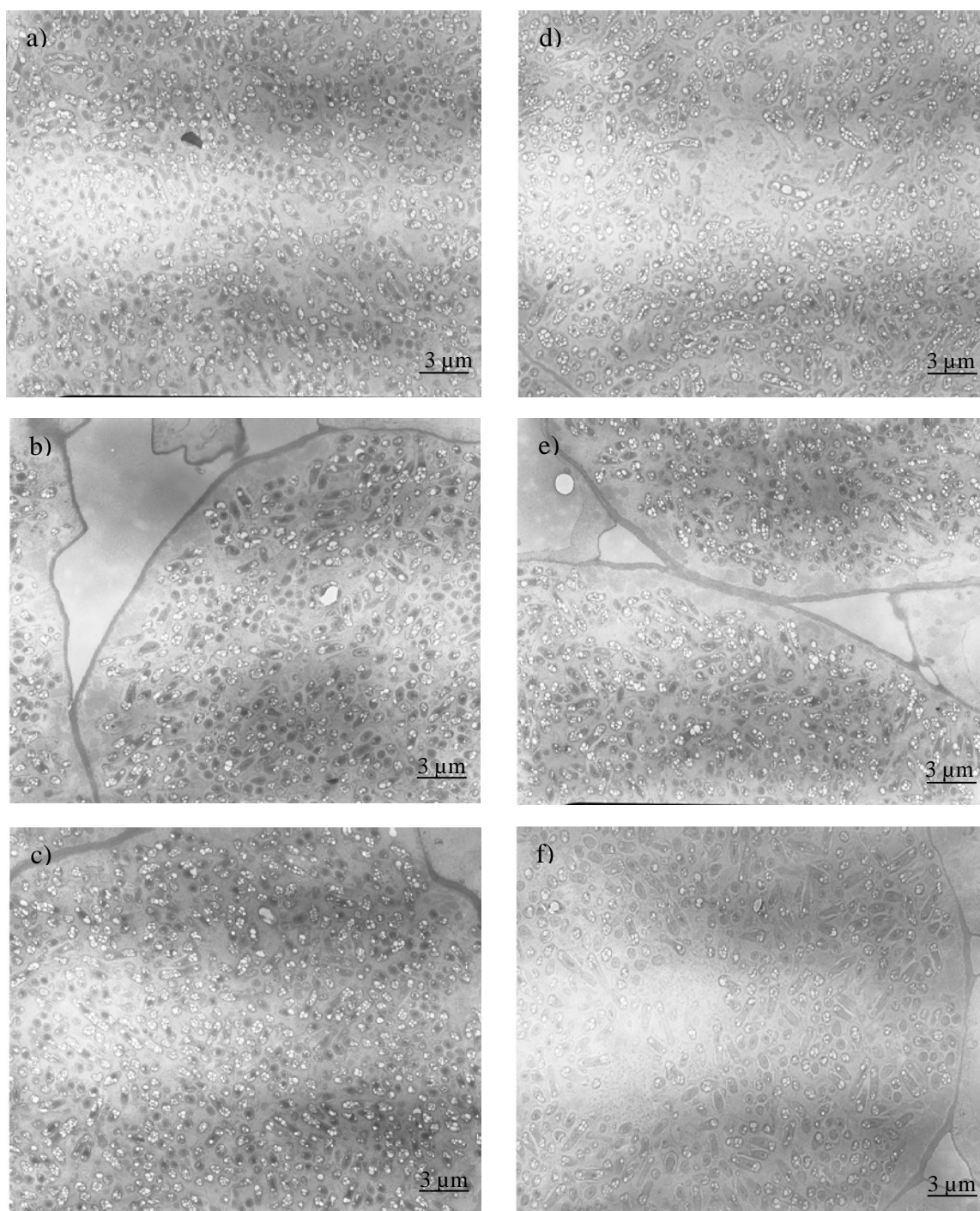


Figura 24: Microscopia eletrônica de transmissão. Nódulos de soja foram avaliados 35 dias após a inoculação com *B. japonicum*. a) Nódulos formados por *B. japonicum* USDA110 em soja tipo-selvagem; b) Nódulos formados por *B. japonicum* Δ UreG on wild-type Williams 82 soybean plants; c) Nódulos formados por *B. japonicum* Δ UreABC em soja tipo-selvagem; d) Nódulos formados por *B. japonicum* USDA110 em plantas de soja deficiente em urease (*eu1-sun/eu4*); e) Nódulos formados por *B. japonicum* Δ UreG em plantas de soja deficiente em urease (*eu1-sun/eu4*); f) Nódulos formados por *B. japonicum* Δ UreABC em plantas de soja deficiente em urease (*eu1-sun/eu4*).

5. DISCUSSÃO FINAL

A atividade da urease permite utilização de ureia como fonte de nitrogênio. Uma grande quantidade de ureia é utilizada na agricultura, a fim de disponibilizar o nitrogênio necessário para as culturas. Entretanto, a alta atividade enzimática de ureases no solo faz com que essa ureia seja rapidamente hidrolisada, sendo que grande parte do nitrogênio é perdido pela volatilização da NH_3 formada. Aumentar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio consiste em uma maneira interessante para reduzir as perdas econômicas e a poluição ambiental causada pela alta atividade ureolítica nos solos.

Inúmeros estudos vêm mostrando a multifuncionalidade de ureases em plantas, fungos e bactérias, evidenciando que seu papel vai muito além da atividade ureolítica (para uma revisão, ver Carlini e Polacco, 2008). Apesar de apresentarem estruturas quaternárias diversas, as ureases mantiveram uma alta conservação evolutiva, tendo em vista a identidade de no mínimo 50 % entre as moléculas de todas as espécies analisadas. Essa característica sugere que estas proteínas exercem um papel fisiológico relevante para os organismos que a produzem, fazendo da urease uma enzima que desperta grande interesse bioquímico e biotecnológico.

A urease embrião-específica da soja está presente em grande quantidade na semente, porém também é encontrada em pequena quantidade em plântulas (Torisky e Polacco, 1990). A função fisiológica da eSBU ainda está sob debate. Em 1991, foi proposto que essa enzima esteja envolvida na defesa contra patógenos (Stebbins et al., 1991). Estudos do nosso grupo tiveram sucesso em confirmar essa hipótese, implicando essa enzima na defesa contra insetos (Follmer et al., 2004a) e fungos (Becker-Ritt et al., 2007).

A urease ubíqua, por sua vez, possui papel no metabolismo da ureia gerada metabolicamente e a aplicada na forma de fertilizante nitrogenado. Apesar da ureia não ser um metabólito abundante em plantas, mutantes de soja deficientes na atividade da urease acumulam essa substância, mesmo mantidos em fontes de nitrogênio diferentes da ureia (Stebbins et al., 1991; Stebbins e Polacco, 1995). Essa ureia é derivada metabolicamente da atividade da arginase, durante a mobilização das reservas protéicas das sementes (Goldraij e Polacco, 1999).

Em relação à urease de *B. japonicum*, pouco se sabe além de sua estrutura trimérica (cadeias α , β e γ), com base no seu genoma disponibilizado em 2002 (Kaneko et al., 2002). No presente estudo, mostramos que assim como as outras ureases estudadas por nosso grupo, a BJU possui a propriedade de ativar plaquetas. Entretanto, com os nossos resultados nos ensaios quimiotaxia e de nodulação, não foi possível inferirmos um papel para a urease bacteriana nesses processos. Concluímos assim que, muito provavelmente, a BJU não está envolvida na nodulação e na fixação de nitrogênio na soja por *B. japonicum*.

Por outro lado, ureases das plantas podem estar envolvidas na simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, afetando a nodulação e/ou o processo de fixação biológica de nitrogênio. Os resultados dessa tese demonstram que as ureases vegetais, tanto uSBU, como eSBU e JBU, têm efeito quimiotático sobre *B. japonicum*. Mostramos que plantas mutantes desprovidas da proteína urease mostram alterações no número, massa fresca e conteúdo de leghemoglobina nos nódulos formados na simbiose com *B. japonicum*. Mostramos ainda que essas alterações não estão ligadas a atividade enzimática da proteína, pois sua inibição com PPD não provocou alteração no número e massa fresca de nódulos formados na soja.

Os dados apresentados aqui representam uma nova abordagem nos estudos sobre ureases. A multifuncionalidade dessa proteína e o fato de não haver ainda um consenso sobre suas funções fisiológicas, torna importante o desenvolvimento de estudos que extrapolem os limites de sua atividade como enzima, ampliando informações que permitam entender a conservação dessas moléculas durante a evolução e sua presença nos organismos mais diversos.

6. CONCLUSÕES

Com este trabalho, concluímos que:

A urease de *B. japonicum* é induzida por ureia;

A urease de *B. japonicum* induz secreção em plaquetas;

A deficiência da urease em soja, mas não de sua atividade enzimática, leva a formação de nódulos maiores, porém em menor número, quando comparadas com plantas tipo-selvagem;

O conteúdo de leghemoglobina é mais alto em plantas de soja tipo-selvagem do que em plantas deficientes na urease, o que pode indicar maior atividade da nitrogenase nas primeiras;

Ureases de soja possuem um papel relevante na simbiose da planta com a *B. japonicum*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Appleby, C. A. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. **Annual Review of Plant Physiology**, 35: 443-478.

Appleby, C. A.; Bergersen, F. J. (1980). Preparation and experimental use of leghemoglobin. **In: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation** (Bergersen, F. J. ed.). John Wiley, New York, pp. 315-335.

Bacanamwo, M.; Witte, C-P.; Lubbers, M. W.; Polacco J. C. (2002). Activation of the urease of *Schizosaccharomyces pombe* by the UreF accessory protein from soybean. **Molecular Genetics and Genomics**, 268: 525–534.

Bais, A. P.; Weir, T. L.; Perry, L. G.; Gilroy, S.; Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, 57: 233–266.

Balasubramanian, A.; Ponnuraj, K. (2010). Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. **Journal of Molecular Biology**. 400: 274-283.

Barbour, W. M.; Hattermann, D. R.; Stacey, G. (1991). Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. **Applied and Environmental Microbiology**, 57: 2635-2639.

Barcellos, F. G.; Menna, P.; Batista, J. S. S.; Hungria, M. (2007). Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, 73: 2635–2643.

Barja-Fidalgo, C.; Carlini, C. R.; Guimarães, J. A.; Cunha, F. Q.; Flores, C. A.; Ferreira, S. H. (1992) Role of resident macrophages in canatoxin-induced *in vivo* neutrophil migration. **Inflammation**, 16: 1-12.

Barja-Fidalgo, C.; Guimarães, J. A.; Carlini C. R., (1991a). Canatoxin, a plant protein, induces insulin release from isolated pancreatic islets. **Endocrinology**, 128: 675-679.

Barja-Fidalgo, T. C.; Guimarães, J. A.; Carlini, C. R. (1991b). Lipoxygenase-mediated secretory effect of Canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. **Toxicon**, 29:, 453-459.

Becker-Ritt, A. B.; Martinelli, A. H. S.; Mitidieri, S.; Feder, V.; Wassermann, G. E.; Santi, L.; Vainstein, M. H.; Oliveira, J. T. A.; Fiuza, L. M.; Pasquali, G.; Carlini, C. R. (2007). Antifungal activity of plant and bacterial ureases. **Toxicon**, 50: 971-983.

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**, 7: 205-216.

Benjamin C. F.; Carlini C. R.; Barja-Fidalgo C. (1992). Pharmacological characterization of rat paw edema induced by canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. **Toxicon**, 30: 879-885.

Bichler, K. H.; Eipper, E.; Naber, K.; Braun, V.; Zimmermann, R.; Lahme, S. (2002). Urinary infection stones. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 19: 488- 498.

Born, G. V. R.; Cross, M. J. (1963). The aggregation of blood platelets. **Journal of Physiology**, 168: 178- 195.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254.

Bremner, J. M.; Krogmeier, M. J. (1988). Elimination of the adverse effects of urea fertilizer on seed germination, seedling growth, and early plant growth in soil. **PNAS**, 85: 4601-4604.

Brencic, A.; Winans, S. C. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 69: 155-194.

Brewin, N. J. (1991) Development of the legume root nodule. **Annual Review of Cell Biology**, 7: 191–226.

Broughton, W. G.; Dilworth, M. J. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. **Biochemical Journal**, 125: 1075-1080.

Burns, R. G.; El-Sayed, M. H.; McLaren, A. D. (1972). Extraction of a urease-active organo-complex from soil. **Soil Biology & Biochemistry**, 4: 107-108.

Cao, F. Q.; Werner, A. K.; Dahncke, K.; Romeis, T.; Liu, L. H.; Witte, C. P. (2010). Identification and characterization of proteins involved in rice urea and arginine catabolism. **Plant Physiology**, 154: 98–108.

Carlini, C. R.; Grossi-De-Sá, M.F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, 40: 1515-1539.

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 lipoxygenase pathway. **Brazilian Journal of Pharmacology**, 84: 551-560.

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. **Journal of Economic Entomology**, 90: 340-348.

Carlini, C. R.; Polacco, J. C. (2008). Toxic properties of ureases. **Crop Science**, 48: 1665-1672.

Carter, E. L.; Hausinger, R. P. (2010). Characterization of the *Klebsiella aerogenes* urease accessory protein UreD in fusion with the maltose binding protein. **Journal of Bacteriology**, 192: 2294-2304.

Carter, E. L.; Flugga, N.; Boer, J. L.; Mulrooney, S. M.; Hausinger, R. P. (2009) Interplay of metal ions and urease. **Metallomics**. 1:207-221.

Ciurli, S.; Benini, S.; Rypniewski, W. R.; Wilson, K. S.; Miletti, S.; Mangani, S. (1999). Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms. **Coordination Chemistry Reviews**, 190–192: 331–355.

Ciurli, S.; Marzadori, C.; Benini, S.; Deiana, S.; Gessa, C. (1996). Urease from the soil bacterium *Bacillus pasteurii*: immobilization on Ca-polygalacturonate. **Soil Biology and Biochemistry**, 28: 811-817.

Coelho, A. L.; De Freitas, M. S.; Mariano-Oliveira, A.; Rapozo, D. C.; Pinto, L. F.; Niewiarowski, S.; Zingali, R. B.; Marcinkiewicz, C.; Barja-Fidalgo, C. (2004). RGD- and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. **Experimental Cell Research**, 292: 371-384.

Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC (2004). Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 10th edition. SBCS-NRS/EMBRAPA-CNPT, Porto Alegre, 400 pp.

Cox, G. M.; Mukherjee, J.; Cole, G. T.; Casadevall, A.; Perfect, J.R. (2000). Urease as a virulence factor in experimental criptococcosis. **Infection and Immunity**, 68: 443–448.

Dakora, F. D. (1995). A functional relationship between leghaemoglobin and nitrogenase based on novel measurements of the two proteins in legume root nodules. **Annals of Botany**, 75: 49-54.

Defferrari, M. S.; Demartini, D. R.; Marcelino, T. B.; Pinto, P. M.; Carlini, C. R. (2011). Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* major urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 41: 388-399.

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? **Journal of the American Chemical Society**, 97: 4131–4133.

Downie, J. A. (2005). Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. **Current Biology**, 15: R196-R198.

Eskew, D. L.; Welch, R. W.; Cary, E. E. (1983). Nickel: an essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. **Science**, 222: 621-623.

Fahmy, A. S.; Mohamed, M. A.; Kamel, M. Y. (1994). Ureases in the cucurbitaceae, distribution and properties. **Phytochemistry**, 35: 151–154.

Feder, V. (2012). O papel da urease e suas proteínas acessórias na virulência de *Cryptococcus gattii*. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Fellay, R.; Frey, J.; Krisch, H. (1987). Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. **Gene**, 52: 147–154.

Ferguson, B. J.; Indrasumunar, A.; Hayashi, S.; Lin, M-H.; Lin, Y-H; Reid, D. E.; Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. **Journal of Integrative Plant Biology**, 52: 61-76.

Figueiredo, C.; Machado, J. C.; Yamaoka, Y. (2005). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, 10: 14- 20.

Ferreira-Da-Silva, C. T.; Gombarovits, M. E. C.; Masuda, H.; Oliveira, C. M.; Carlini, C. R. (2000). Proteolytic activation of Canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 44: 162-171.

Follmer, C. (2008). Insights into the role and structure of plant ureases. **Phytochemistry**, 69: 18-28.

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. (2001). Canatoxin, a toxic protein of 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**, 360: 217-224.

Follmer, C.; Real-Guerra, R.; Wassermann, G. E.; Olivera-Severo, D.; Carlini, C. R. (2004a). Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. **European Journal of Biochemistry**, 271: 1357-1363.

Follmer, C.; Wassermann, G. E.; Carlini, C. R. (2004b). Separation of Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. **Plant Science**, 167, 241-246.

Frankenberger, W.T.; Tabatabai, M.A. (1982). Amidase and urease activities in plants. **Plant and Soil**, 64: 153–166.

Freyermuth, S. K.; Bacanamwo, M.; Polacco, J. C. (2000). The soybean *Eu3* gene encodes an Ni-binding protein necessary for urease activity. **The Plant Journal** 21: 53-60.

Gage, D. J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 68: 280–300.

Gerendas, J.; Sattelmacher, B. (1999). Influence of Ni supply on growth and nitrogen metabolism of *Brassica napus* L. grown with NH_4NO_3 or urea as N source. **Annals of Botany**, 83: 65–71.

Geurts, R.; Bisseling, T. (2002) Rhizobium nod factor perception and signalling. **Plant Cell**, 14, S239–S249.

Ghazaleh, F. A.; Araujo, C. F.; Barja-Fidalgo, C.; Carlini, C. R. (1992). Canatoxin induces activation on mice peritoneal macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 25: 1033-1035.

Ghazaleh, F. A.; Francischetti, I. M.; Gombarovits, M. E. C.; Carlini, C. R. (1997). Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin: verapamil inhibition and downregulation by cGMP. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 339: 362-367.

Goldraj, A.; Beamer, L. J.; Polacco, J. C. (2003). Interallelic complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean. **Plant Physiology**, 132: 1801-1810.

Goldraj, A.; Polacco, J. C. (1999). Arginase is inoperative in developing soybean embryos. **Plant Physiology**, 119: 297-303.

Grassi-Kassisse, D. M.; Ribeiro-daSilva, G. (1992). Canatoxin triggers histamine secretion from rat peritoneal mast cells. **Agents Actions**, 37: 204-209.

Grohs, M.; Marchesan, E.; Santos, D. S.; Massoni, P. F. S.; Sartori, G. M. S.; Ferreira, R. B. (2011). Resposta do arroz irrigado ao uso de inibidor de urease em plantio direto e convencional. **Ciência e Agrotecnologia**, 35: 336-345.

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 and Molecular Biology**, 8: 505–509.

Han, K-H.; Choi, W-J.; Han, G-H.; Yun, S-I; Yoo, S-H.; Ro, H-M. (2004). Urea-nitrogen transformation and compost-nitrogen mineralization in three different soils as affected by the interaction between both nitrogen inputs. **Biology and Fertility of Soils**, 39: 193–199.

Hirel, B.; Le Gouis, J.; Ney, B.; Gallais, A. (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany**, 58: 2369–2387.

Hogan, M.E.; Swift, I.E.; Done, J. (1983). Urease assay and ammonia release from leaf tissues. **Phytochemistry**, 22: 663–667.

Huergo, L. F.; Pedrosa, F. O.; Muller-Santos, M.; Chubatsu, L. S.; Monteiro, R. A.; Merrick, M.; Souza, E. M. (2012). P_{II} signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. **Microbiology**, 158: 176-190.

Jabri, E.; Carr, M. B.; Hausinger, R. P.; Karplus, P. A. (1995). The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. **Science**, 268: 998-1004.

Jones, K. M.; Kabayashi, H.; Davies, B. W.; Taga, M. E.; Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. **Nature Reviews Microbiology**, 5: 619–633.

Jordan, D. C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanon 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 32: 136-139.

Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Sato, S.; Minamisawa, K.; Uchiumi, T.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Idesawa, K.; Iriguchi, M.; Kawashima, K.; Kohara, M.; Matsumoto, M.; Shimpo, S.; Tsuruoka, H.; Wada, T.; Yamada, M.; Tabata, S. (2002). Complete genomic sequencing of nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. **DNA Research**, 9: 189–197.

Kape, R.; Parniske, M.; Werner, D. (1991). Chemotaxis and nod gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. **Applied and Environmental Microbiology**, 57: 316-319.

Kim, J. K.; Mulrooney, S. B.; Housinger, R. P. (2005). Biosynthesis of active *Bacillus subtilis* urease in the absence of known urease accessory proteins. **Journal of Bacteriology**, 187: 7150-7154.

Krajewska, B. (2009). Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 59: 9-21.

Krogfelt, K. A.; Lehours, P.; Megraud, F. (2005). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, 10: 5- 13.

Kumar, V.; Wagenet, R.J. (1984). Urease activity and kinetics of urea transformation in soils. **Soil Science**, 137: 263–269.

Laemmli, U. K.; Molbert, E.; Showe, M.; Kellenbe, E. (1970). Form-determining function of genes required for assembly of head of bacteriophage-T4. **Journal of Molecular Biology**, 49: 99-104.

Lee, M. H.; Mulrooney, S. B.; Renner, M. J.; Markowicz, Y.; Hausinger, R. P. (1992). *Klebsiella aerogenes* urease gene cluster: sequence of ureD and demonstration that four accessory genes (ureD, ureE, ureF, and ureG) are involved in nickel metallocenter biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, 174: 4324-4330.

Legaz, M-E.; Fontaniella, B.; Millanes, A-M.; Vicente, C. (2004). Secreted arginases from phylogenetically far-related lichen species act as cross-recognition factors for two different algal cells. **European Journal of Cell Biology**, 83: 435 - 446.

Leonard, L. T. (1943). A simple assembly for use in the testing of cultures of rhizobia. **Journal of Bacteriology**, 45: 523-525.

Leong, S. A.; Ditta, G. S.; Helinski, D. R. (1982). Heme biosynthesis in *Rhizobium*. Identification of a cloned gene coding for delta-aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. **Journal of Biological Chemistry**, 257: 8724–8730.

Lodeiro, R. L.; Favelukes, G. (1999). Early interactions of *Bradyrhizobium japonicum* and soybean roots: specificity in the process of adsorption. **Soil Biology and Biochemistry**, 31: 1405-1411.

Lodeiro, R. L.; López-García, S. L.; Vázquez, T. E. E.; Favelukes, G. (2000). Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin. **FEMS Microbiology Letters**, 188: 177-184.

Madsen, E. B.; Madsen, L. H.; Radutoiu, S.; Olbryt, M.; Rakwalska, M.; Szczyglowski, K.; Sato, S.; Kaneko, T.; Tabata, S.; Sandal, N.; Stougaard, J. (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception in rhizobial signals. **Nature**, 425: 637–640.

Mamiya, C.; Takishima, K.; Masakuni, M.; Kayumi, T.; Ogawa, K.; Sekita, T. (1985). Complete amino acid sequence of Jack bean urease. **Proceedings of the Japan Academy**, 61B: 395–398.

Martinelli, A.H.S. (2007). Expressão da urease ubíqua de soja em *Escherichia coli*. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Menegassi, A.; Wassermann, G. E.; Olivera-Severo, D.; Becker-Ritt, A. B.; Martinelli, A. H. S.; Feder, V.; Carlini, C. R. (2008). Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds: isolation, physico-chemical characterization and antifungal properties of the protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56:4399-4405.

Meyer-Bothling, L. E.; Polacco, J. C. (1987). Mutacional analysis of the embryo-specific urease locus of soybean. **Molecular and General Genetics** 209:439-444.

Meyer-Bothling, L. E.; Polacco, J. C.; Cianzio, S. R. (1987). Pleiotropic soybean mutants defective in both urease isozymes. **Molecular and General Genetics** 209: 432-438.

Miksch, G.; Eberhardt, U. (1994). Regulation of urease activity in *Rhizobium meliloti*. **FEMS Microbiology Letters**, 120: 149-154.

Mobley, H. L.; Hausinger, R. P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological Reviews**, 53: 85-108.

Mobley, H. L., Island, M. D., Hausinger, R. P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological Reviews**, 59: 451-480.

Montecucco, C.; Papini, E.; de Bernard, M.; Zoratti, M. (1999). Molecular and cellular activities of *Helicobacter pylori* pathogenic factors. **FEBS Letters**, 452: 16- 21.

Mulinari, F.; Becker-Ritt, A. B.; Demartini, D. R.; Ligabue-Braun, R.; Stanisçuaski, F.; Verli, H.; Fragoso, R. R.; Shoroeder, E. K.; Carlini, C. R.; Grossi-de-Sá, M. F. (2011). Characterization of JBURE-IIb isoform of *Canavalia ensiformis* (L.) DC urease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics**, 1814: 1758-1768.

Mulinari, F.; Stanisçuaski, F.; Bertholdo-Vargas, L. R.; Postal, M.; Oliveira-Neto, O. B.; Ridgen, D. J.; Grossi-de-Sá, M. F.; Carlini, C. R. (2007). Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, 28: 2042-2050.

Mylona, P.; Pawlowski, K.; Bisseling, T. (1995) Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell**, 7: 869–885.

Nannipieri, P.; Ceccanti, B.; Cerveli, S.; Sequi, P. (1978). Stability and kinetics properties of humus-urease complexes. **Soil Biology & Biochemistry**, 10: 143-147.

Oldroyd, G. E. D.; Downie, J. A. (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. **Annual Review of Plant Biology**, 59: 519–546.

Olivera-Severo, D.; Wassermann, G. E.; Carlini, C. R. (2006). *Bacillus pasteurii* urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 452: 149-155.

Olszewski, M. A.; Noverr, M. C.; Chen, G-H.; Toews, G. B.; Cox, G. M.; Perfect, J. R.; Huffnagle, G. B. (2004). Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes

microvascular sequestration, thereby enhancing Central Nervous System invasion. **American Journal of Pathology**, 164: 1761-1771.

Osterholzer, J. J.; Surana, R.; Milam, J. M.; Montano, G. T.; Chen, G-H.; Sonstein, J.; Curtis, J. L.; Huffnagle, G. B.; Toews, G. B.; Olszewski, M. A. (2009). Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature Dendritic Cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **American Journal of Pathology**, 174: 932-943.

Peres, J.R.R.; Vidor, C. (1980). Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em estirpes de soja. **Agronomia Sulriograndense**, 16: 205-219.

Piovesan, A. R.; Stanisçuaski, F.; Marco-Salvadori, J.; Real-Guerra, R.; Defferrari, M. S.; Carlini, C. R. (2008). Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: Role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 38: 1023-1032.

Polacco J.C. (1977). Is nickel a universal component of plant ureases? **Plant Science Letters**, 10: 249-255.

Polacco, J. C.; Holland, M.A. (1993). Roles of urease in plant cells. **International Review of Cytology** 145:65-103.

Polacco, J. C.; Hyten, D. L.; Medeiros-Silva, M.; Sleper, D. A.; Bilyeu, K. D. (2011). Mutational analysis of the major soybean UreF paralogue involved in urease activation. **Journal of Experimental Botany**, 62: 3599-3608.

Polacco, J. C.; Judd, A. K.; Dybing, J. K.; Cianzio, S. R. (1989) A new mutant class of soybean lacks urease in leaves but not in leaf-derived callus or in roots. **Molecular General Genetics** 217:257-262.

Polacco, J. C.; Freyermuth, S. K.; Gerandás, J.; Cianzio, S. R. (1999). Soybean genes involved in nickel insertion into urease. **Journal of Experimental Botany**, 50: 1149-1156.

Polacco, J. C.; Winkler, R. G. (1984). Soybean leaf urease - a seed enzyme. **Plant Physiology**, 74: 800–803.

Postal, M.; Martinelli, A. H. S.; Becker-Ritt, A. B.; Ligabue-Braun, R.; Demartini D. R.; Ribeiro, S. F. F.; Pasquali, G.; Gomes, V. M.; Carlini, C. R. (2012). Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. **Peptides**, 38: 22-32.

Radutoiu, S.; Madsen, L. H.; Madsen, E. B.; Felle, H. H.; Umehara, Y.; Grønlund, M.; Sato, S.; Nakamura, Y.; Tabata, S.; Sandal N.; Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. **Nature**, 425: 585–592.

Real-Guerra, R.; Stanisçuaski, F.; Zambelli, B.; Musiani, F.; Ciurli, S.; Carlini, C. R. (2012). Biochemical and structural studies on native and recombinant *Glycine max* UreG: a detailed characterization of a plant urease accessory protein. **Plant Molecular Biology**. 78:461-475.

Rees, D. C.; Howard, J. B. (2000). Nitrogenase: standing at the crossroads. **Current Opinion in Chemical Biology**, 4: 559–566.

Riddles, P. W.; Whan, V.; Blakeley, R. L., Zerner, B. (1991). Cloning and sequencing of a jackbean urease-encoding cDNA. **Gene**, 108: 265–267.

Sacristán, M.; Millanes, A-M.; Legaz, M-E.; Vicente, C. (2006). A lichen lectin specifically binds to the α -1,4-polygalactoside moiety of urease located in the cell wall of homologous algae. **Plant Signaling & Behavior**, 1:1, 23-27.

Salomone-Stagni, M.; Zambelli, B.; Musiani, F.; Ciurli, S. (2007). A model-based proposal for the role of UreF as a GTPase-activating protein in the urease active site biosynthesis. **Proteins**, 68: 749-61.

San Francisco, S.; Urrutia, O.; Martin, V.; Peristeropoulou, A.; Garcia-Mina, J. M. (2011). Efficiency of urease and nitrification inhibitors in reducing ammonia volatilization from diverse nitrogen fertilizers applied to different soil types and wheat straw mulching. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 91: 1569-1575.

Sato, T.; Onoma, N.; Fujikake, H.; Ohtake, N.; Sueyoshi, K.; Ohya, T. (2001). Changes in four leghemoglobin components of hypernodulating soybean (*Glycine max* [L] Merr.) mutant and its parent in the early nodule developmental stage. **Plant and Soil**, 237: 129-135.

Schmutz, J.; Cannon, S. B.; Schlueter, J.; Ma, J.; Mitros, T.; Nelson, W.; Hyten, D. L.; Song, Q.; Thelen, J. J.; Cheng, J.; Xu, D.; Hellsten, U.; May, G. D.; Yu, Y.; Sakurai, T.; Umezawa, T.; Bhattacharyya, M. K.; Sandhu, D.; Valliyodan, B.; Lindquist, E.; Peto, M.; Grant, D.; Shu, S.; Goodstein, D.; Barry, K.; Futrell-Griggs, M.; Abernathy, B.; Du, J.; Tian, Z.; Zhu, L.; Gill, N.; Joshi, T.; Libault, M.; Sethuraman, A.; Zhang, X-C.; Shinozaki, K.; Nguyen, H. T.; Wing, R. A.; Cregan, P.; Specht, J.; Grimwood, J.; Rokhsar, D.; Stacey, G.; Shoemaker, R. C.; Jackson, S. A. (2009). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, 463: 178–183.

Seefeldt, L. C.; Hoffman, B. M.; Dean, D. R. (2009). Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. **Annual Review of Biochemistry**, 78: 701–722.

Sen, D.; Appunu, C.; Singh, R. K. (2008). Regulation of urease in *Bradyrhizobium* colonizing green gram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Indian Journal of Experimental Biology**, 46 : 846-851.

Shah, R.; Emerich, D. W. (2006). Isocitrate dehydrogenase of *Bradyrhizobium japonicum* is not required for symbiotic nitrogen fixation with soybean. **Journal of Bacteriology**, 188: 7600-7608.

Sirko, A., Brodzik, R., (2000). Plant ureases: Roles and regulation. **Acta Biochimica Polonica**, 47: 1189-1195.

Smit, G.; Puvanesarajah, V.; Carlson, R. W.; Barbour, W. M.; Stacey, G. (1992). *Bradyrhizobium japonicum* nodD1 can be specifically induced by soybean flavonoids that do not induce the nodYABCSUIJ operon. **Journal of Biological Chemistry**, 267: 310–318.

Soares, J. R.; Cantarella, H.; Menegale, M. L. C. (2012). Ammonia volatilization losses from surface-applied urea with urease and nitrification inhibitors. **Soil Biology & Biochemistry**, 52: 82-89.

Soriano, A.; Colpas, G.J.; Hausinger, R.P.; (2000). UreE stimulation of GTP-dependent urease activation in the UreD-UreF-UreG-urease apoprotein complex. **Biochemistry-US**, 39: 12435–12440.

Soriano, A.; Hausinger, R. P. (1999). GTP-dependent activation of urease apoprotein in complex with the UreD, UreF, and UreG accessory proteins. **PNAS**, 96: 11140-11144.

SoyStats (2012). A reference guide to important soybean facts & figures. American Soybean Association, USA. <http://www.soystats.com/2012/Default-frames.htm>. Acessado em 02/11/2012.

Stanisçuaski, F.; Ferreira-Dasilva, C. T.; Mulinari, F.; Pires-Alves, M.; Carlini, C. R. (2005). Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon**, 45: 753-760.

Stebbins, N.; Holland, M. A.; Cianzio, S. R.; Polacco, J. C. (1991). Genetic tests of the roles of the embryonic ureases of soybean. **Plant Physiology**, 97: 1004-1010.

Stebbins, N.; Polacco, J. C. (1995). Urease is not essential for ureide degradation in soybean. **Plant Physiology**, 109: 169-175.

Stingl, K.; Altendorf, K.; Bakker E. P. (2002). Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? **Trends in Microbiology**, 10: 70-75.

Stokkermans T. J. W.; Peters N. K. (1994). *Bradyrhizobium elkanii* lipooligosaccharide signals induce complete nodule structures on *Glycine soja* Siebold et Zucc. **Planta**, 193: 413–420.

Sumner, J. B. (1926). The isolation and crystallization of the enzyme urease. **Journal of Biological Chemistry**. 69: 435-441.

Schwinghamer, E. A.; Evans, H. J.; Dawson, M. D. (1970). Evaluation of effectiveness in mutant strains of *Rhizobium* by acetylene reduction relative to other criteria of N₂ fixation. **Plant and Soil**, 33: 192-212.

Todd C. D.; Polacco J. C. (2004). Soybean cultivars ‘Williams 82’ and ‘Maple Arrow’ produce both urea and ammonia during ureide degradation. **Journal of Experimental Botany**, 55: 867 – 877.

Toffanin, A.; Cadahia, E.; Imperial, J.; Ruiz-Argueso, T.; Palacios, J. M. (2002). Characterization of urease gene cluster from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, **Archives of Microbiology**, 177: 290-298.

Tomazetto, G.; Mulinari, F.; Stanisçuaski, F.; Settembrini, B. P.; Carlini, C. R.; Ayub, M. A. Z. (2007). Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli*

encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. **Enzyme and Microbial Technology**, 41: 821-827.

Torisky, R. S.; Griffin, J. D.; Yenofsky, R. L.; Polacco, J. C. (1994). A single gene (*Eu4*) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. **Molecular and General Genetics**, 242: 404-414.

Torisky, R. S.; Polacco, J. C. (1990). Soybean roots retain the seed urease isozyme synthesized during embryo development. **Plant Physiology**, 94: 681-689.

Torisky, R. S.; Griffin, J. D.; Yenofsky, R. L.; Polacco, J. C. (1994) A single gene (*Eu4*) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. **Molecular and General Genetics**, 242: 404-414.

Truchet, G.; Roche, P.; Lerouge, P.; Vasse, J.; Camut, S.; de Billy, F.; Promé, J.-C.; Dénarié, J. (1991) Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. **Nature**, 351: 670–673.

Turgeon, B. G.; Bauer, W. D. (1985). Ultrastructure of infection-thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. **Planta**, 163: 328–349.

Uberti, A. F. (2010). Urease de *Helicobacter pylori*: ativação de plaquetas e neutrófilos. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Van Etten, C. H.; Kwolek, W. F.; Peters, J. E.; Barclat, A. S. (1967). Plant seeds as protein sources for food or feed. Evaluation based on amino acid composition of 379 species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 15: 1077–1089.

Vivas, M.; Sacristán, M.; Legaz, M. E.; Vicente, C. (2010). The cell recognition model in chlorolichens involving a fungal lectin binding to an algal ligand can be extended to cyanolichens. **Plant Biology**, 12: 615–621.

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.

Watson, C. J.; Miller, H.; Poland, P.; Kilpatrick, D.J.; Allen, M.D.B.; Garrett, M.K.; Christianson C.B. (1994). Soil properties and the ability of the urease inhibitor N-(N-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) to reduce ammonia volatilization from surface-applied urea. **Soil Biology and Biochemistry**, 26: 1165–1171.

Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, 39: 971-974.

Wiebke-Strohm, B.; Pasquali, G.; Margis-Pinheiro, M.; Bencke, M.; Bucker-Neto, L.; Becker-Ritt, A. B.; Martinelli, A. H. S.; Rechenmacher, C.; Polacco, J.; Stolf, R.; Marcelino, F. C.; Abdelnoor, R.V.; Homrich, M. S.; Del Ponte, E. M.; Carlini, C. E.; De Carvalho, M. C. C. G.; Bodanese-Zanettini, M. H. (2012). Ubiquitous urease affects soybean susceptibility to fungi. **Plant Molecular Biology**, 79:75-87.

Windgassen, M.; Urban, A.; Jaeger, K. E. (2000). Rapid gene inactivation in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, 193:201–205.

Witte, C. P.; Isidore, E.; Tiller, S. A.; Davies, H. V.; Taylor, M. A. (2001). Functional characterization of urease accessory protein G (ureG) from potato. **Plant Molecular Biology**, 45: 169–179.

Witte, C. P.; Medina-Escobar N. (2001). In-gel detection of urease with nitroblue tetra-zolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. **Analytical Biochemistry**, 290: 102–107.

Witte, C. P. (2011). Urea metabolism in plants. **Plant Science**, 180: 431-438.

Wray, W.; Boulikas, T.; Wray, V. P.; Hancock, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, 118: 197- 203.

Zambelli, B.; Musiani, F.; Benini, S.; Ciurli, S. (2011). Chemistry of Ni²⁺ in urease: sensing, trafficking, and catalysis. **Accounts of Chemical Research**, 44: 520-530.

Zonia, L. E.; Stebbins, N. E.; Polacco, J. C. (1995) Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds. **Plant Physiology**, 107: 1097–1103.

8. ANEXOS

Mônica de Medeiros Silva
Curriculum Vitae

Novembro/2012

Mônica de Medeiros Silva

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Mônica de Medeiros Silva
Filiação Jadyr Araújo da Silva e Maria Isabel de Medeiros da Silva
Nascimento 01/03/1982 - Porto Alegre/RS - Brasil
Carteira de Identidade 5042942895 SSP - RS - 11/01/2005
CPF 816.985.340-00

Formação acadêmica/titulação

- 2008 - 2012** Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Papel de ureases na nodulação de *Glycine max* (L.) Merr. por *Bradyrhizobium japonicum*, Ano de obtenção: 2012
Orientador: Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini
Co-orientador: Joseph Carmine Polacco
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2006 - 2008** Mestrado em Fitotecnia.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Caracterização da interação de *Pythium* spp. com plântulas de *Solanum lycopersicum*, Ano de obtenção: 2008
Orientador: Marcelo Gravina de Moraes
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2001 - 2005** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Desenvolvimento de vetores para uso no silenciamento de genes em arroz
Orientador: Marcelo Gravina de Moraes
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

Formação complementar

- 2005 - 2005** Extensão universitária em E POR FALAR EM GENÉTICA... (segunda edição).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

- 2008 - 2012** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Doutorado, Regime: Dedicção exclusiva
- 2006 - 2008** Vínculo: Estudante de Mestrado, Enquadramento funcional: Mestrando, Regime: Dedicção exclusiva
- 2004 - 2006** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação científica, Carga

2003 - 2004 horária: 20, Regime: Parcial
Vínculo: Estagiária, Enquadramento funcional: Estágio voluntário, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Projetos

Projetos de pesquisa

2008 - Atual Papel de ureases na nodulação de *Glycine max* Merr. (soja) por *Bradyrhizobium japonicum*

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (1);

Integrantes: Mônica de Medeiros Silva; Célia R. Carlini (Responsável); Marcela Proença Borba

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPEs, Financiadora de Estudos e Projetos-FINEP

2006 - 2008 Rizogen - Genômica da interação entre plantas e patógenos causadores de doenças radiculares

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (2);

Integrantes: Mônica de Medeiros Silva; Marcelo Gravina de Moraes (Responsável); Ana Paula Trivilin; Jeferson Mateus Dariva; Johannes Humbertus Falcade

2004 - 2006 Caracterização da mutagênese por inserção do retrotransposon Tos17 em genótipos de arroz

Situação: Desativado Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Mônica de Medeiros Silva; Flavia Vanina Ferreira; Marcelo Gravina de Moraes (Responsável)

2004 - 2006 Avaliação do silenciamento gênico em plantas utilizando estratégias baseadas em dsRNAs

Situação: Desativado Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Mônica de Medeiros Silva; Marcelo Gravina de Moraes (Responsável); Sandra Maria de Souza

2001 - 2004 Análise de causas na demora da germinação de sementes de erva-mate.

Situação: Desativado Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Mônica de Medeiros Silva; Josele Paz Almeida; Barbara Zanatta; Helga Winge (Responsável)

Idiomas

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

Espanhol Compreende Bem, Lê Bem

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. SILVA, M.M., Polacco, J. C., Hyten, D. L., Sleper, D. A., Bilyeu, K. D. Mutational analysis of the major soybean UreF paralogue involved in urease activation. *Journal of Experimental Botany.* , v.62, p.3599 - 3608, 2011.
2. SILVEIRA, J. R. P., RUPRECHT, V. C., SILVA, M.M., LISBOA, B.B., VARGAS, L.K., OLIVEIRA, A.M.R. Predominância da biovar 1 de *Ralstonia solanacearum* em olerícolas cultivadas no Estado do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha.* , v.12, p.31 - 36, 2006.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **Medeiros-Silva, M.**, Borba, M.P., Polacco, J. C., Carlini, C.R. Purification and Characterization of *Bradyrhizobium japonicum* urease In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Águas de Lindóia.
XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. , 2010.
2. SILVA, M.M., TRIVILIN, A.P., DARIVA, J.M., Moraes, M.G. Plant defense gene expression in the interaction of *Pythium* spp. with *Solanum lycopersicum* seedlings In: II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2009, Búzios.
II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas. , 2009.
3. SILVA, M.M., NICHELE, F.S., TRIVILIN, A.P., DARIVA, J.M., SOUZA, E.A., Moraes, M.G. Resposta diferencial de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) na interação com distintas espécies de *Pythium*. In: 57º Congresso Brasileiro de Botânica, 2006, Gramado.
57º Congresso Brasileiro de Botânica. , 2006.
4. NICHELE, F.S., SILVA, M.M., DARIVA, J.M., SOUZA, E.A., TRIVILIN, A.P., Moraes, M.G. Sintomatologia diferencial de plântulas de tomate quando inoculadas com distintas espécies de *Pythium* spp. In: XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre.
XVIII Salão de Iniciação Científica. , 2006.
5. SILVA, M.M., Ferreira, F.V., Moraes, M.G. Análise de genótipos de arroz mutagenizados pelo retrotransposon Tos17 In: 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia.
51º Congresso Brasileiro de Genética. , 2005. p.632 - 632
6. Souza, S.M., SILVA, M.M., Souza, R.G., Moraes, M.G. Construção de vetores de silenciamento para análise funcional de genes em arroz In: 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia.
51º Congresso Brasileiro de Genética. , 2005. p.637 - 637
7. SILVA, M.M., Souza, S.M., Moraes, M.G. Desenvolvimento de vetores para uso no silenciamento de genes em arroz In: XVII Salão de iniciação Científica, XIV Feira de iniciação Científica, 2005, Porto Alegre.
XVII Salão de iniciação Científica, XIV Feira de iniciação Científica. , 2005. p.394 -
8. SILVA, M.M., Almeida, J.P., Zanatta, B., Winge, H. Análise de causas da demora na germinação das sementes da erva-mate, *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae In: XVI Salão de Iniciação Científica, XIII Feira de Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre.
XVI Salão de Iniciação Científica, XIII Feira de Iniciação. , 2004. p.386 - 386

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. Ferreira, F.V., SILVA, M.M., Moraes, M.G.

Mutagênese por Retrotransposição em Arroz In: IV Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 2005, Santa Maria.

IV Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado XXVI Reunião da Cultura de Arroz Irrigado. Orium, 2005. v.l. p.561 - 563

RESEARCH PAPER

Mutational analysis of the major soybean UreF paralogue involved in urease activation

Joe C. Polacco^{1,4,6,*}, David L. Hyten², Mônica Medeiros-Silva^{1,7}, David A. Sleper^{3,4} and Kristin D. Bilyeu^{4,5}

¹ Biochemistry Department, 117 Schweitzer Hall, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA and Department of Biophysics and Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

² Genomics and Improvement Laboratory, US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville, MD 20705, USA

³ Division of Plant Sciences, 110 Waters Hall, and Center for Soybean Biotechnology, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA

⁴ Interdisciplinary Plant Group, 371 Bond Life Sciences Center, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA

⁵ USDA-ARS, Plant Genetics Research Unit, 110 Waters Hall, Columbia, MO 65211, USA

⁶ Current address: Biochemistry Department and Interdisciplinary Plant Group, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA

⁷ Permanent address: Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Brasil

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: polaccoj@missouri.edu

Received 15 December 2010; Revised 29 January 2011; Accepted 31 January 2011

Abstract

The soybean genome duplicated ~14 and 45 million years ago and has many paralogous genes, including those in urease activation (emplacement of Ni and CO₂ in the active site). Activation requires the UreD and UreF proteins, each encoded by two paralogues. UreG, a third essential activation protein, is encoded by the single-copy *Eu3*, and *eu3* mutants lack activity of both urease isozymes. *eu2* has the same urease-negative phenotype, consistent with *Eu2* being a single-copy gene, possibly encoding a Ni carrier. Unexpectedly, two *eu2* alleles co-segregated with missense mutations in the chromosome 2 *UreF* paralogue (Ch02*UreF*), suggesting lack of expression/function of Ch14*UreF*. However, Ch02*UreF* and Ch14*UreF* transcripts accumulate at the same level. Further, it had been shown that expression of the Ch14*UreF* ORF complemented a fungal *ureF* mutant. A third, nonsense (Q2*) allelic mutant, *eu2-c*, exhibited 5- to 10-fold more residual urease activity than missense *eu2-a* or *eu2-b*, though *eu2-c* should lack all Ch02*UreF* protein. It is hypothesized that low-level activation by Ch14*UreF* is 'spoiled' by the altered missense Ch02*UreF* proteins ('epistatic dominant-negative'). In agreement with active 'spoiling' by *eu2-b*-encoded Ch02*UreF* (G31D), *eu2-b/eu2-c* heterozygotes had less than half the urease activity of *eu2-c/eu2-c* siblings. Ch02*UreF* (G31D) could spoil activation by Ch14*UreF* because of higher affinity for the activation complex, or because Ch02*UreF* (G31D) is more abundant than Ch14*UreF*. Here, the latter is favoured, consistent with a reported in-frame AUG in the 5' leader of Ch14*UreF* transcript. Translational inhibition could represent a form of 'functional divergence' of duplicated genes.

Key words: Eu2, Nickel, SNP, soybean, urease, UreF, Universal Soy Linkage Panel.

Introduction

Soybean expresses an active seed urease, synthesized in the developing embryo (Torisky and Polacco, 1990; Torisky *et al.*, 1994) and termed the embryo-specific urease (ESU). High seed urease activity is a trait shared with other members of the leguminosae (Bailey and Boulter, 1971) and

the cucurbitaceae (Fahmy *et al.*, 1994). Loss of ESU has no apparent physiological effect (Stebbins *et al.*, 1991). A possible non-metabolic role of urease(s) is in seed and embryo defence (Polacco and Holland, 1993). Consistent with a role in defence ESU and jackbean seed urease were

Abbreviations: ESU, embryo-specific urease; SNP, single nucleotide polymorphism; UU, tissue-ubiquitous urease.

© 2011 The Author(s).

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

reported to be insecticidal, due to the action of a sub-peptide released by cathepsin-type proteases in the gut of susceptible insects (Carlini and Polacco, 2008). ESU is encoded by the *Eu1* gene (Glyma05g27840) (Meyer-Bothling and Polacco, 1987; Torisky *et al.*, 1994).

Soybean expresses a second urease, the tissue-ubiquitous urease (UU), essential for assimilation of urea, either endogenously generated or environmentally available. UU is encoded by *Eu4* (Glyma11g37250), which is expressed in all tissues examined, including callus and the developing embryo (Torisky *et al.*, 1994; Goldraj *et al.*, 2003). Loss of UU activity leads to accumulation of urea in seeds and in leaves to the extent that leaf tips become necrotic (Stebbins *et al.*, 1991), a trait also observed in soybean plants deprived of nickel (Eskew *et al.*, 1983), a component of the urease active site (Carter *et al.*, 2009). Endogenous urea is produced by arginase action, as during mobilization of seed protein reserves (Goldraj and Polacco, 1999). Whether purine degradation in plants liberates urea has been long debated (Muñoz *et al.*, 2001, 2006; Todd and Polacco, 2004, 2006). In tropical legumes, ureides (purine degradation products) are the major forms of fixed nitrogen transported out of the nodule, so that conversion of some or all of the ureide pool to urea would make urease essential for full assimilation of fixed N. However, in the non-legume, *Arabidopsis thaliana*, enzymatically catalysed purine turnover has been demonstrated not to liberate urea (Werner *et al.*, 2009), an observation that agrees with our earlier results in soybean plants (Winkler *et al.* 1985, 1987). In addition, it was shown that isogenic urease-negative mutant and urease-positive soybean plants, when supported by fixed N, exhibited no differences in growth or in total accumulated seed protein. Further, urease-negative callus did not have impaired utilization of the ureide, allantoin (Stebbins and Polacco, 1995). However, unstable degradation intermediates can liberate urea non-enzymatically (Werner *et al.*, 2009), and this instability may explain our observation of increased urea accumulation in fixing soybean plants (Stebbins and Polacco, 1995; Todd and Polacco, 2004).

Normal function of *Eu2* and *Eu3* is necessary for full enzyme activity of both ESU and UU (Meyer-Bothling *et al.*, 1987). The ‘pleiotropic’ *Eu3* gene (Glyma08g08970) is the plant orthologue of bacterial *ureG* (Freyermuth *et al.*, 2000). In most bacteria, UreG, and associated UreD and UreF proteins, are essential for construction of the urease active site: the addition of Ni and CO₂ to form a di-Ni carbamate on an active site lysine (Carter *et al.*, 2009). In *Arabidopsis* UreD, UreF, and UreG are essential, and possibly sufficient, for activation of urease (Witte *et al.*, 2005). Bacterial UreG has GTPase activity (Carter *et al.*, 2009) and UreF has been proposed to be a GTPase activase (Salomone-Stagni *et al.*, 2007). Plant UreG has a nucleotide-binding site and, in addition, can bind Ni, due most likely to a His-rich N-terminal extension not found on bacterial orthologues (Freyermuth *et al.*, 2000). In soybean, the dual ‘substrates’ for *Eu3*/UreG and *Eu2*, namely the ESU and UU apo-isozymes, are distinguishable by tissue

distribution, level of expression, and the propensity to form trimers or hexamers (Polacco and Havir, 1979; Polacco *et al.*, 1985). Activated ESU and UU differ in *K_m*, pH optimum, and inhibitor sensitivity (Kerr *et al.*, 1983; Polacco and Winkler, 1984).

The *Eu2* product has not heretofore been identified. The elucidated complete genome sequence of soybean (Schmutz *et al.*, 2009) contains two closely related paralogues each for *UreD* (Glyma02g20690 and Glyma20g17990) and for *UreF* (Glyma02g44440 and Glyma14g04380). Duplicate genes are not surprising since the soybean genome underwent two duplications within the past 45 million years (Schlueter *et al.*, 2004). Thus, we postulated that *Eu2* is a single-copy gene encoding a different function—possibly a Ni-carrier protein related to UreE (reviewed in Carter *et al.*, 2009). Alternatively, *Eu2* could represent the only functional paralogue of duplicated *UreD* or of *UreF*. The two annotated *UreF* paralogues are on chromosomes 2 and 14, and we previously reported that cDNA for the chromosome 14-encoded UreF was functional in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (Bacanawo *et al.*, 2002). Here, it is shown that the chromosome 2 *UreF* paralogue encodes the major functional UreF in soybean: two different mutant *eu2* alleles co-segregate with mutations leading to radical alterations in highly conserved residues in Ch02*UreF*, alterations resulting in <1% urease activity. However, a null mutant of *eu2* contains significant basal urease activity, 5–10 times that of the missense mutants. The argument is considered that the *eu2* missense alleles encode UreF variants that compete against Chr14*UreF* participation in the activation complex, while the *eu2-c* null mutant ‘frees up’ apo-urease for partial activation by the ‘silent’ paralogue (Ch14*UreF*).

Materials and methods

Nomenclature and plant material

Bacterial and fungal genes are designated in lower case italics (*ureG*) whereas soybean genes are capitalized (*Eu3* or *UreG*). Mutant alleles are always lower case (as in the soybean *eu2-a*, *eu2-b*, and *eu2-c* alleles). Protein products are capitalized and non-italicized (*Eu2* or *UreF*).

The *eu2* mutant, first reported in Meyer-Bothling *et al.* (1987) and most recently in Bacanawo *et al.* (2002), is here termed *eu2-a*. The allelic mutation in isolate EN24 (Polacco *et al.*, 1989), was termed *eu2^{en24}* in Bacanawo *et al.* (2002) and is here designated *eu2-b*. *eu2-a* and *eu2-b* were recovered, respectively, from populations treated with ethyl methane sulphonate and *N*-methyl-*N*-nitrosourea. A third allele, *eu2-c*, described here for the first time, was recovered in the same ethyl methane sulphonate-treated population of ‘Williams’ that yielded *eu2-a* (Meyer-Bothling *et al.*, 1987). *eu2-a* was out-crossed twice to ‘Williams 82’ and propagated for at least six generations of single-seed descent. *eu2-b* was induced in ‘Strayer 2233’ and was not out-crossed.

Soybean crosses

Crosses were made in early 2005 at Costa Rica Seeds located near Upala, Costa Rica. F₁ plants were grown at the Bradford Research and Extension Center of the University of Missouri, and single plant threshed. Crosses of *eu2-a* (‘Williams 82’ background) and

eu2-b ('Strayer 2233') were made reciprocally with 'Maverick' as the *Eu2* (urease-positive) parent. Hybrid F_1 individuals were detected by urease phenotype, flower colour, and pubescence. Upon confirmation of segregation of urease-positive and urease-negative seeds, several F_2 populations were pooled for each cross. In this study, F_2 progeny of the crosses *eu2-a* × *Maverick* and *eu2-b* × *Maverick* were analysed (maternal parent given first) by bulked segregant analysis. Reciprocal crosses gave the same F_2 progeny ratios.

Urease phenotyping

Seed urease activity in parentals and F_2 populations was determined by the non-destructive, semi-quantitative 'seed chip' assay (Meyer-Bothling *et al.*, 1987): a sliver taken from opposite the hilum, and free of the seed coat, was placed in a glass test tube to which was added 1 or 2 ml of indicator solution [0.1 M urea, 10 mM KPO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.0, 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cresol red and 0.02% (w/v) NaN_3 to inhibit microbial growth]. At room temperature, wild-type, urease-positive, slivers turned the solution from yellow (pH 7.0) to pink (pH ~7.5) to 'red' (pH >8.0) usually within 15 min, due to consumption of H^+ in urea conversion to 2 NH_4^+ and HCO_3^- .

To confirm the phenotypes of all individuals included in bulked phenotypic classes, urease activity was again determined by 'chip' analysis of approximately one-third of a cotyledon from 5-day seedlings germinated from 'chipped' seeds.

Urease assays

Urease activity in mature seeds was determined by analysis of urea-derived ammonia. Two seeds of the same genotype (Table 2) were crushed with a hammer and, after removal of seed coat, combined and ground in a mortar with 20 vol of KTE (0.1 M TES, 1 mM EDTA, combined acidic forms taken to pH 7.4 with KOH). After chilling and spinning at ~14,000 × *g* for 5 min, the supernatant under the lipid cap was re-centrifuged. It was diluted 1:10 to 1:50 for 'wild type' (Williams 82), and used undiluted for *eu2-a*, *eu2-b*, and *eu2-c*. Extracts (0.1 ml) were added to 1.9 ml KTE+10 mM urea, incubated at 37 °C and 0.1-ml aliquots were removed at intervals up to 5 h and added to 3.1 ml of 133 mM NaOH. Following addition of 0.1 ml of Nessler's reagent, A_{436} was determined after 10 min and converted to ammonium by comparison with identically treated standards of $(NH_4)_2SO_4$ in KTE. Single F_2 (Fig. 2) or F_3 (Fig. 3) seeds were crushed with a hammer, ground to a powder, half of which was used for sequence characterization of *Ch02UreF* after DNA extraction. The remainder was assayed as above, and appropriate dilutions of their extracts were made.

Urease activity in seedling trifoliates was determined by analysis of $^{14}CO_2$ production from $[^{14}C]urea$. First trifoliolate leaves of two 10-day-old plants, grown in nutrient solution in 'inoculation pouches' in a growth chamber, were harvested, quick frozen in liquid N_2 and stored at -80 °C. They were ground in liquid N_2 and then in 3 ml of KTE and centrifuged at ~14,000 × *g* for 5 min. Aliquots (0.1 ml) of the supernatant were added to 1 ml of KTE+10 mM $[^{14}C]urea$ (10^{-2} mCi/mmol), which was incubated at 37 °C for up to 4 h. Reactions were stopped by addition of 0.2–0.5 ml of 1 M H_2SO_4 . Acid-released $^{14}CO_2$ was trapped and quantified as described by Meyer-Bothling and Polacco (1987).

Seed urease activity was expressed as $\mu\text{mol urea hydrolysed h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ and trifoliolate leaf activity as $\text{nmol urea hydrolysed h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$. Protein was determined by Coomassie binding, following the instructions of the manufacturer (Bio-Rad) of the Bradford Reagent, using bovine serum albumin as a standard.

The Golden Gate assay

The Golden Gate 'Highly Parallel SNP Genotyping' assay for single nucleotide polymorphism (SNP) alleles as described in Fan

et al. (2003) was performed essentially according to protocols provided by the manufacturer (Illumina, San Diego, CA, USA). Details for soybean are given in Hyten *et al.* (2008); they employed an array of 1536 possible segregating SNPs on the Universal Soy Linkage Panel (USLP1.0). Briefly, single-stranded genomic DNA is a template for multiplex allele-specific primer extension and joining at >1500 loci. These products, in turn, are templates for PCR-produced allele-specific oligonucleotide probes (with one of two fluorescent tags for each allele) which hybridize to beads containing 'address' sequences for each SNP locus. Each well of an array contains complementary address sequences on beads at the ends of ~50,000 optical fibres, ~30 fibres per locus. The addresses on each bead type are previously 'deciphered'. In the case of homozygosity for an SNP (in the DNA sample) individual fibres will be labelled with one probe or, in the case of heterozygosity for an SNP, with two differentially tagged probes.

Bulked segregant analysis

DNA was prepared (DNeasy Plant Maxi kit; Qiagen) from pooled leaves of 24 or 9 urease-negative F_2 individuals from crosses of *Maverick* by *eu2-a* or *eu2-b*, respectively. Each pool was analysed separately for SNP analysis. Similarly, DNA was prepared and analysed from 36 or 20 pooled urease-positive F_2 individuals, respectively, from the *Maverick* × *eu2-a* and *Maverick* × *eu2-b* crosses, as well as from 10 individuals of each of the three parentals.

Identification of genomic region with disproportionate *eu2* donor loci

Polymorphic SNP loci were defined as those for which the parental lines contained alternative SNP alleles. SNP information for bulk parental DNAs and for the bulk urease-positive and negative F_2 classes was queried for a subset of urease-negative bulk SNPs identical to the *eu2* parental SNPs. Since the urease-negative phenotype is recessive, urease-positive F_2 bulked samples, a mixture of heterozygous and homozygous individuals, were predicted to contain *Eu2*-linked SNP alleles in a 2:1 ratio favouring the urease-positive parent. This 'skew' of the SNP data was the criterion for the urease-positive bulk to corroborate the co-segregation of the urease-negative trait with tightly linked SNPs. Unlinked polymorphic loci were those for which both bulked F_2 phenotypes scored as heterozygous.

qRT-PCR of *UreF* transcripts

Steady-state RNA levels for the chromosome 2 and 14 *UreF* genes were determined by quantitative RT-PCR from field-grown Williams 82 young trifoliolate leaves and developing seeds (embryo plus seed coat) that averaged either 7–8 mm or ~10 mm in length. RNA was prepared using the TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Each RNA sample was adjusted to 50 ng μl^{-1} water and subjected to DNase I (Ambion, Austin, TX, USA) treatment for 30 min at 37 °C in 1 × DNase I buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 2.5 mM $MgCl_2$, and 0.5 mM $CaCl_2$). DNase I was inactivated by incubation at 75 °C for 15 min. RNA templates (100 ng) were used in 20 μl of a one-step reverse transcriptase PCR using the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) supplemented with 0.2 × titanium *Taq* polymerase (Clontech, Mountain View, CA, USA). A common reverse primer was used for both chromosome 2 and chromosome 14 *UreF* genes: *UreFxr2*: atgccttctgaccacttc. The chromosome 2 *UreF*-specific primer was *UreF2f3*: ctggaagcagcagttcagtg, and the chromosome 14 *UreF*-specific primer was *UreF14f3*: ctggaagcaacagttcagtc. Control primers were *PEPC16* fwd: TTCCTTTATCAGAAATA-ACGAGTTTGTAGCT (phosphoenolphosphate carboxylase) and *PEPC16* rev: TGTCTCATTTTGC GG CAGC (Tuteja *et al.*, 2004). Primer efficiency was calculated from PCR amplification of serial dilutions of genomic Williams 82 DNA templates without a reverse transcriptase step. qRT-PCR was performed with a 30-min 50 °C

step followed by a single 95 °C/15-min step. PCR proceeded with 35 cycles of 95 °C for 20 s, 63 °C for 20 s, and 72 °C for 20 s with a fluorescence read at the end of each cycle. A melting curve was produced as the temperature increased from 70 °C to 90 °C by a fluorescence read every 0.2 °C with a 1-s hold during the melt. For each primer pair, RNA samples were assayed in triplicate, quantified using the appropriate standard curve, and normalized relative to the PEPC16 control. Control reactions were run with RNA samples but no reverse transcriptase, and negligible levels of contaminating DNA template were observed.

Sequence analysis

The DNA region encompassing the soybean chromosome 2 *UreF* gene was aligned with the chromosome 14 *UreF* gene to enable selection of primers capable of discriminately amplifying only the chromosome 2 *UreF* sequence. Primers were UreF1: GTTGA-TAAAAGTTCCTGGCT and UreFr1: ACATGCATCGAAA-TATGATGTGCA. Since neither *UreF* gene in soybean contains an intron in the translated region, amplification of the chromosome 2 *UreF* gene was performed using the bulked pooled and parental sample DNA templates described above but diluted in water 10-fold. PCR was carried out using Ex *Taq* according to the manufacturer's recommendations (Takara, Otsu, Shiga, Japan) using the following conditions: 95 °C for 3 min followed by 35 cycles of 95 °C for 20 s, 60 °C for 20 s, and 72 °C for 1.5 min. PCR products were verified for size by electrophoresis on a 1.2% FlashGel (Lonza, Basel, Switzerland). PCR products were isolated with the Qiaprep Spin Miniprep kit (Qiagen) and sequenced at the University of Missouri DNA Core facility. Templates for *eu2-c* samples were mutant parental urease-negative seed (originally designated EL-6) and a single urease-negative F₂ mature seed, without the seed coat, selected from a segregating population (originally from a population with parental line designated EL-8). EL-6 and EL-8 had identical seed chip urease phenotypes; the former complemented *eu3-e1* and neither complemented *eu2-b*. They were recovered in sequential mechanical threshings so that seeds from one plant likely contaminated the thresh of next plant. Since EL-6 and EL-8 seed (urease-negative parental and F₂) had the same chromosome 2 *UreF* sequence they are considered to represent the same mutational event and are herein designated as EL-6/8, the third mutant *eu2* allele (*eu2-c*) presented here.

Results

Mapping strategy to identify *Eu2*

UreD, *UreF*, and *UreG* form a urease activation complex in bacteria (Carter *et al.*, 2009) and each protein is essential for *in vivo* urease activation in *Arabidopsis* (Witte *et al.*, 2005). The sequenced soybean genome (Schmutz *et al.*, 2009) indicates two predicted soybean paralogues encoding *UreD*, two encoding *UreF*, and only one for *UreG*, the latter identified to be the soybean *Eu3* gene (Freyermuth *et al.*, 2000). Since mutation in *Eu2* results in the same phenotype as mutation in *Eu3*, namely the elimination of the activity of both ureases, mutation in an accessory gene was suspected. However, the strategy of sequencing two *UreD* and two *UreF*-coding cDNAs in the *eu2* backgrounds was not pursued because (i) genetic redundancy and the severe urease phenotype seemed to eliminate *UreD* and *UreF*, and (ii) mapping *Eu2* could reveal other candidate urease accessory genes, such as a plant *UreE*. In *Klebsiella aerogenes*, and other bacteria, *UreE* is a Ni chaperone essential for full activation of urease (Mulrooney *et al.*,

2005). Hence, *Eu2* was mapped to enable identification of linked candidate genes.

Bulked segregant analysis of polymorphic SNPs maps *Eu2* to chromosome 2

eu2 mutants were each crossed to a urease-positive parent, 'Maverick': A. *eu2-a* ('Williams 82')×Maverick, and B. *eu2-b* ('Strayer 2233')×Maverick. F₂ progeny were threshed from urease-positive F₁ plants and urease-positive and urease-negative F₂ segregants were pooled. Table 1 shows a typical segregation pattern of urease-positive and urease-negative F₂ seeds, assayed by the non-destructive 'seed chip' assay (Meyer-Bothling *et al.*, 1987). The seed chip assay, as performed, did not distinguish *eu2/Eu2* from *Eu2/Eu2* segregants. For crosses A and B (Table 1), pools of 24 or 9 urease-negative and 36 or 20 urease-positive individuals were germinated and analysed by bulked segregant analysis. DNA from trifoliolate leaves was pooled and prepared for multiplex SNP analysis on the USLP1.0.

For this analysis, 'skewed' loci were searched for: those loci that demonstrated the following characteristics: (i) an identical genotype for the urease-negative bulk and the mutant parent; (ii) a contrasting polymorphic genotype for the Maverick parent; (iii) a heterozygous genotype call for the urease-positive bulk. For the skewed loci, the urease-positive bulk presumably consisted of a 2:1 mixture of heterozygous and wild-type genotypes, but the technical limitations of the analysis made it difficult to categorize this result for any locus. The USLP1.0 provided 660 combined polymorphic loci including 214 common to the two crosses. Of these, 19 skewed loci were identified for population A and 25 for population B, but the majority of these were dispersed throughout the genome with regions of non-skewed polymorphic loci separating them. However, for both populations the distal end of chromosome 2 contained a number of skewed loci uninterrupted by other non-skewed polymorphic loci. For population A, this region encompassed 6.8 million base pairs and for population B, 3.7 million base pairs in the same chromosome 2 region. There were polymorphic loci proximal to the skewed region in

Table 1. F₂ transmission of mature seed chip urease traits. Reciprocal crosses, not shown here, gave essentially the same ratios.

Cross (seed chip class)	F ₂ mature seed chip class ^a			n	χ ²	P ^b
	I (WT)	III	IV			
A. <i>eu2-a/eu2-a</i> ×Maverick (3) (1)	72	28	0	100	0.48	0.49
B. <i>eu2-b/eu2-b</i> ×Maverick (4) (1)	70	0	28	98	0.67	0.41

^a A non-destructively removed seed chip drives urea hydrolysis accompanied by a pH increase which is detected by the conversion of cresol red from yellow (pH 7.0) to pink (pH ~7.5) to red/vermillion (pH >8.0). This conversion takes the time courses: I (WT), red at 0.5 h; III, pink at ~10 h, red at 24–48 h; IV, yellow at 24 h, pink at 48 h, red at >48 h.

both cases, but only one marker distal to the last skewed locus, and it was not polymorphic for either population.

Mutant alleles of soybean chromosome 2 *UreF* co-segregate with two allelic *eu2* bulked segregants

The soybean genome contains two *UreF* genes. That on chromosome 14 (Glyma14g04380) has previously been characterized and demonstrated to activate the host urease in the fission yeast (Bacanamwo *et al.*, 2002). The second *UreF* is on chromosome 2 (Glyma02g44440) and is located within the mapped region for *eu2* (ORF beginning at nucleotide 49017308), but has not been characterized previously. Since the mapped markers associated with lesions in *eu2-a* and *eu2-b* flanked *UreF* on chromosome 2, and since no other candidate urease accessory genes were located in this region of chromosome 2, we examined the *UreF* gene sequence from the chromosome 2 paralogue in the bulked samples and the parental lines. As shown in Fig. 1, the chromosome 2 *UreF* paralogue unambiguously yielded a radical change in a glycine for each *eu2* allele: G148R for *eu2-a* and G31D for *eu2-b*. In each case a single G to A transition in positions 442 and 92 of the Ch02*UreF* coding sequence (Glyma02g44440 available at <http://www.phytozome.net>) was responsible for the amino acid change.

Though there is only 20–30% sequence identity between plant and bacterial *UreF* homologs, Cao *et al.* (2010) have presented evidence for conservation of the arrangement of helical domains between *UreF* from rice and the bacterial *UreF* of *Helicobacter pylori* and of *K. aerogenes*. Based on the experimentally determined structure of *H. pylori* *UreF*

(Lam *et al.*, 2010) the changes in Ch02*UreF* involved conserved G residues. G148R (*eu2-a*) corresponds to *H. pylori* position 164 (three of six bacterial residues=G), in the middle of helix g, and G31D (*eu2-b*) to *H. pylori* position 46 (five of five residues=G) between helices a and b. Replacement of G residues with the much more bulky, and charged, R and D residues is consistent with loss of >99% urease activity in both *eu2-a* and *eu2-b* (Table 2 and Polacco *et al.*, 1999). However, the degree of reduction of urease activation depends not solely on the nature of the amino acid change, but also on the new interactions of the altered *UreF* with other components of the activation complex.

While the nucleotide sequence of bulked urease-negative F₂ segregants (24 or 9 individuals from crosses of Maverick by *eu2-a* or *eu2-b*, respectively) showed complete inheritance of the mutant base, bulked urease-positive F₂ segregants presented a mixture of the wild-type base and the mutant base in an approximation of the expected ratio of 2:1 (data not shown).

A novel 'null' *eu2* mutant with higher residual urease activity

The *eu2-c* mutant was identified by its pleiotropic reduction of embryo-specific and ubiquitous urease activity, albeit with higher levels than found in *eu2-a* and *eu2-b*. In crosses *eu2-c* complemented the *eu3-a* mutant (not shown). However, in crosses to *eu2-b*, the F₁ was urease negative and the F₂ segregated no urease-positive individuals, only those resembling the parents with respect to the seed chip urease assay (Fig. 2). Compared with *eu2-a*, which gives a fully

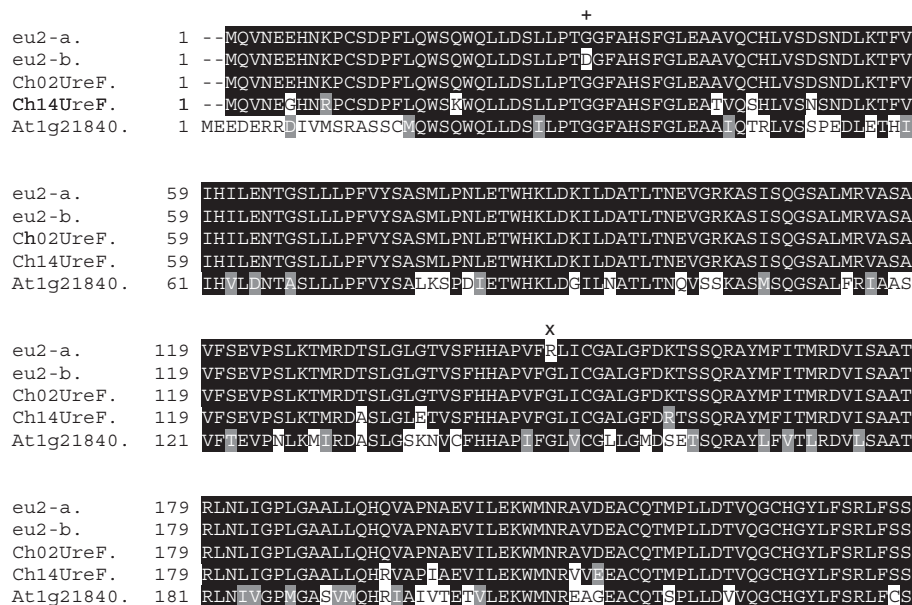


Fig. 1. Alignment of soybean *UreF* paralogues encoded by Ch02*UreF*, Ch14*UreF*, and two *eu2* alleles of Ch02*UreF*, *eu2-a* and *eu2-b* (Polacco *et al.*, 1989) were mapped by the USLP1.0. Positions of amino acid changes are indicated by a + for *eu2-b* and a 'x' for *eu2-a*. Identical amino acid residues are highlighted in black while similar amino acid residues are highlighted in gray. The *eu2-c* allele has a C to T transition in the second codon, resulting in a stop (not shown). The At1g21840 sequence is the single *UreF* gene of *Arabidopsis* (Bacanamwo *et al.*, 2002).

Table 2. Seed, leaf, and seed chip urease levels in eu2 and eu3 mutants

Genetic allele	Mutation type ^a	Urease specific activity (n) ^b		Time change 'yellow' to (seed chip class ^c):	
		Seed (ESU)	Trifoliolate (UU)	Pink	Red
<i>eu2-a</i>	Missense	0.2	0.3 (2)	~10 h	24–48 h (III)
<i>eu2-b</i>	Missense	0.15 ± 0.12 (4)	0.05 (2)	48 h	>48 h (IV)
<i>eu2-c</i>	'Null'	1.8 ± 0.5 (6)	4.9 (2)	4 h	10–24 h ^d (II)
<i>eu3-a</i>	'Null'	0	0	>3 d	>3 d (>>IV)
Williams 82		100% (2)	100% (2)	10 min	10–30 min (I)

^a The ORF of the *eu2-c* allele has a nonsense mutation in the second codon (this work). The *eu3-a* mutation appears to be a deletion, and the mutant produces no detectable UreG RNA or protein (Polacco et al., 1999; Freyermuth et al., 2000). It was heretofore termed *eu3-e1*.

^b Williams seed and trifoliolate specific activities are 87 $\mu\text{mol urea h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ (87 U mg^{-1}) and 200 $\text{nmol urea h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ (0.2 U mg^{-1}), respectively. All mutants are in the Williams or Williams 82 backgrounds except for *eu2-b*, in Strayer 2233 (Polacco et al., 1999). n is the number of biological replications and, when n>2, the SE is given. When n=2, biological replicates are usually within 40% of the mean

^c Seed chip classes are those of Table 1: they are ranked according to activity in descending order (I>II>III>IV). The *eu2-c* mutant has the second fastest seed chip response of the listed genotypes, hence a rating of 'II.'

^d As for the assay of urease activity in crude leaf or seed extracts *eu2-c* showed variability in individual seed chip urease responses. However, >50% of the individual seeds gave the indicated colour change.

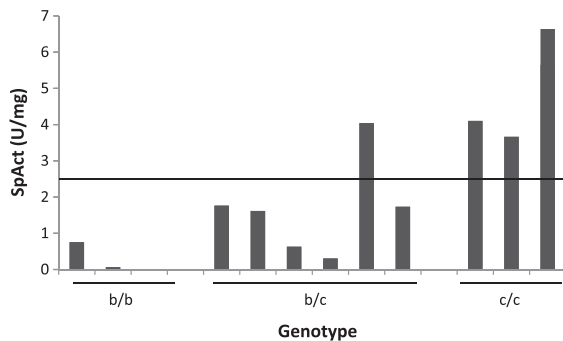


Fig. 2. Analysis of urease levels among F₂ segregants in a cross of *eu2-b* × *eu2-c*. Twelve seeds from a single plant were chosen at random, ground, and on a portion, genomic sequence was determined for the Ch02UreF ORF. Each mutant site characteristic of *eu2-b* or *eu2-c* showed either homozygosity (wild type or mutant) or heterozygosity (mutant/wild type), and both sites were consistent within each individual (e.g. homozygous wild type for one site corresponded to homozygous mutant for the other). The remainder of ground seed, in a 'blind' experiment, was assayed for urease activity (b/b, *eu2-b/eu2-b*; c/c, *eu2-c/eu2-c*; bc, *eu2-b/eu2-c*). The horizontal line is the average of specific activities of the three *eu2-b/eu2-b* and three *eu2-c/eu2-c* individuals.

positive seed chip assay (yellow to red) in 24–48 h (Table 2), the *eu2-c* seed chip phenotype exhibited more urease activity. On the decreasing activity scale of 1 (*Eu2*) to 4 (*eu2-b*), the seed chip phenotype of *eu2-c* is 2, giving a faster reaction than *eu2-b* (Table 2). The *eu2-c* allele was found to contain a C to T mutation in position 4 of its coding sequence resulting in a stop in the second codon (Q2*). The C to T transition (CAA to TAA) is consistent with the mutagenic action of ethyl methane sulphonate.

If Ch02UreF is responsible for all UreF function, then lack of the Ch02UreF gene product in *eu2-c*, presuming efficient translational termination, is expected to result in a urease-null phenotype. However, not only is the seed chip phenotype of *eu2-c* the strongest of the three *eu2* allelic mutants

but, when quantified, *eu2-c* has higher urease specific activity than the *eu2-a* and *eu2-b* missense mutants in both seeds (mainly ESU) and seedling trifoliolates (all UU) (Table 2).

Models to explain why a mutant apparently lacking all Ch02UreF protein has measurable urease activity include: (i) downstream initiation of protein synthesis at methionine in position 78 (Fig. 1), or (ii) unimpeded activation by Ch14UreF—a low-level activation without interference from the 'spoiler' missense forms of Ch02UreF encoded by *eu2-a* and *eu2-b*. Since highly conserved glycine31, the mutated residue in *eu2-b*, falls in the middle of amino acids 1–77, downstream translation initiated at methionine78 in model 1 is not favoured. In model 2 the G148R (*eu2-a*) and G31D (*eu2-b*) forms of Ch02UreF effectively prevent Ch14UreF from participating in the urease activation complex.

Genetic evidence for active suppression by *eu2-b* of urease activation

A prediction of the 'spoiler' roles of missense Ch02UreF (G31D) encoded by *eu2-b* is that *eu2-b/eu2-c* heterozygotes should exhibit less urease activity than the expected average of *eu2-b* and *eu2-c* homozygous individuals. To test this prediction 12 random F₂ individuals from a single selfed F₁ plant derived from a cross of *eu2-b* × *eu2-c* were examined. Genotypes and phenotypes were independently determined in a 'blind' analysis. Genotypes (surprisingly) segregated in the expected 1:2:1 ratio (confirming allelism), and the three *eu2-c/eu2-c* segregants (c/c in Fig. 2) had significantly more urease activity than the three *eu2-b/eu2-b* (b/b) siblings. If the *eu2-b* product were actively spoiling urease activation then the *eu2-b/eu2-c* (b/c) segregants should show less activity than the average of the b/b and c/c activities and, in five of six isolates, this is indeed the case. (The sixth isolate may exhibit unusual epistatic interactions in its recombinant background derived from polymorphic parents differing at 453 of ~1500 SNP loci.) Simply put, gene dosage of *eu2-b* is inversely related to urease activity level:

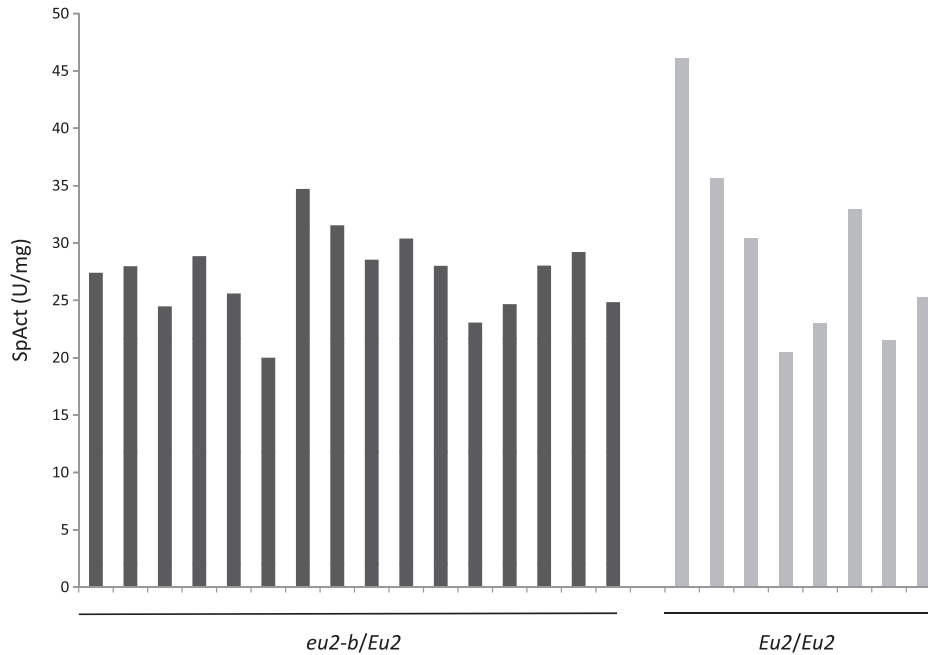


Fig. 3. Analysis of urease levels among $F_2:F_3$ segregants in a cross of *eu2-b* × *Maverick*. Twenty-four urease-positive seeds harvested from a single heterozygous F_2 plant were chosen at random, and their genomic sequence for the *Ch02UreF* ORF as well as their urease activity were determined as for the experiment of Fig. 3 (urease-negative seeds segregated in this cross at a frequency close to 25%). Sixteen urease-positive individuals were *eu2-b/Eu2* and eight *Eu2/Eu2*. Seed urease specific activity for all isolates in these two classes is shown, and they averaged 29.4 (SD ± 8.7) for *Eu2/Eu2*, and 27.3 (SD ± 3.4) for *Eu2/eu2-b*.

two doses of *eu2-b* [Ch02UreF (G31D)] are enough to abolish urease activation almost completely.

Within the *Ch02UreF* locus, however, *eu2-b* does not show any semi-dominance over *Eu2*, with respect to the final level of active urease, as shown among 24 $F_2:F_3$ sibs from the cross, *eu2-b* × *Maverick* (Fig. 3). The eight *Eu2/Eu2* individuals showed no increase in seed urease activity compared with 16 *Eu2/eu2-b* siblings. There is no clear predictor, at this point, of a ‘pecking order’ among the various allelic forms of *Ch02UreF* for access to the urease activation complex.

Transcription patterns of chromosome 2 compared with 14 UreF paralogues

Our model asserts that *Ch14UreF* is partially functional in the *eu2-c/eu2-c* null background that lacks *Ch02UreF*. The model therefore predicts that *Ch14UreF* is expressed at the transcript and protein level. *Ch14UreF* transcript levels were measured by quantitative RT-PCR in wild-type (Williams 82) field-grown soybean employing template RNA from young trifoliolate leaves and from immature seeds at two different stages. Figure 4 shows that transcripts from both *UreF* genes were equally represented, and that each was elevated ~10-fold in developing seeds compared with young trifoliolate leaves—consistent with the reported higher levels of UreG protein in developing embryos compared with leaves (Freyermuth *et al.*, 2000). Digital expression values (individual sequence reads) compiled for soybean ESTs (<http://soybase.org/soyseq/>) indicate that

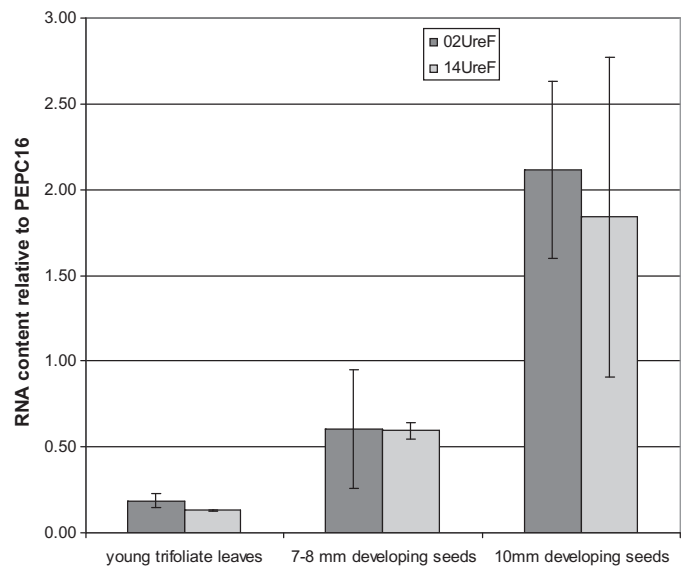


Fig. 4. Relative accumulation of *UreF* transcripts. Total RNA harvested from young trifoliolate leaves and developing seeds of field-grown Williams 82 was analysed by quantitative real-time RT-PCR for expression of the *Ch02UreF* and *Ch14UreF* genes normalized to a control gene (*PEPC16*). Error bars represent ±SD from the mean. Developing seeds, with seed coat, were harvested at the seed lengths shown. Seed samples were taken before the initiation of desiccation.

Ch14UreF (Glyma14g04380) transcripts are ~5-fold more common than *Ch02UreF* (Glyma02g44440) transcripts (across leaves, pods, embryos, roots, and nodules). Thus,

there is no indication that the *Ch14UreF* transcript is a minor one.

Discussion

The Illumina USLP1.0 platform was used to analyse the genetic basis of pleiotropic loss of soybean urease activities in two *eu2* mutants. This strategy was chosen over sequence analysis of predicted *UreD* and *UreF* transcripts in *eu2* mutant backgrounds because such a strategy would ‘miss’ mutation in a distinct gene, such as a Ni chaperone that has not yet been annotated in soybean or in any plant. In addition, sequence analysis of an expressed functional *UreF* (on chromosome 14) in *eu2* backgrounds (Bacanamwo *et al.*, 2002) seemed to preclude the possibility that the urease-negative phenotype of *eu2* could be due to mutations in a potentially redundant paralogous gene. The ‘unbiased’ bulked segregant analysis pointed directly to *Chr2UreF* as the mutated gene on the gene/genomic assembly—a demonstration of the power of SNP mapping and bulked segregant analysis for identifying genes underlying phenotypes.

Table 3 summarizes current understanding of the urease structural and accessory genes of soybean. All are single copy except for *UreD* and *UreF*. These results suggest that *Ch02UreF* is necessary for full activation of each urease, the ESU and the UU isozymes. Only specific elimination of *Ch14UreF* will indicate whether it plays a significant role, although limited urease activity in the absence of *Ch02UreF* (in the *eu2-c* mutant) indicates that it does not. Certainly, there has not been a ‘specialization of function’ whereby each soybean *UreF* protein is involved in activation of one urease isozyme in all tissues, or of both ureases in specific tissues—missense mutation in *Chr2UreF* results in >99% loss of activity of the ESU and UU (Table 2), the latter in all tissues examined (Meyer-Bothling *et al.*, 1987; Polacco *et al.*, 1999). The ‘divergent’ *Ch14UreF* product has 95% deduced amino acid identity with that of *Ch02UreF* (225 of 238 amino acids are identical). None of the changes occur in conserved positions within the protein, and none was

predicted to have a deleterious effect on the protein (Ng and Henikoff, 2001). Hence, we predict no radical changes relative to function in *Ch14UreF*. Indeed, a demonstration of the functionality of the *Ch14UreF*-encoded ORF is its partial correction of a *ureF* lesion in the fission yeast, *S. pombe* (Bacanamwo *et al.*, 2002).

In the ‘spoiler’ hypothesis, whereby either of two missense forms of *Ch02UreF* proteins interferes with basal activation by *Ch14UreF*, neither lower levels of, nor lowered intrinsic urease activation by, *Ch14UreF* were invoked. Here, it is suggested that the *Ch14UreF* transcript [found at levels equal to that encoding *Ch02UreF* (Fig. 4)] is inefficiently translated, and that the two missense forms of *Ch02UreF* out-compete activation by *Ch14UreF* by preventing the less abundant *Ch14UreF* from binding to the activation complex. Recently, Cao *et al.* (2010) analysed intron predictions for the 5’ leader of *UreF* and *UreF* paralogues from 11 plant species (the ORF is always intron-less). All, with two exceptions, contained a 5’ leader intron whose splicing removes AUG codons upstream of the start codon. One of the exceptions is the *Ch14UreF* of soybean: upon splicing, it retains an out-of-frame AUG codon upstream of the start AUG. The authors speculated that this paralogue is translated less efficiently than the *Ch02UreF* transcript. Quantification of the *UreF* proteins, aided by antibodies, will test this hypothesis of a lowered level of *Ch14UreF* relative to *Ch02UreF* protein.

That the missense *eu2-b* allele actively ‘spoils’ or interferes with activation by *Ch14UreF* is suggested by its ‘dominance’ with respect to the null *eu2-c* allele. *eu2-b* copy number is inversely related to urease activity level. Two ‘bad’ copies of *Ch02UreF* (G31D) are enough to abolish urease activation almost completely (Fig. 2). However, the *eu2-b* allele exhibits no ‘spoiler’ effects on its wild-type allele (Fig. 4). Among 24 F₂:F₃ sibs from the cross, *eu2-b* × *Maverick*, 8 *Eu2/Eu2* and 16 *Eu2/eu2-b* individuals averaged urease specific activities (U mg protein⁻¹) of 29.4 (SD ± 8.7) and 27.3 (SD ± 3.4), respectively. The model makes no prediction of the ‘pecking order’ among the various allelic forms of *Ch02UreF* for access to the urease

Table 3. Urease genes^a of soybean, identified by mutational and phenotypic analyses (columns 1 and 2) and by genome sequence annotation (column 3). Matches of mutant and annotated loci are described in the references (last column).

Genetic locus	Encodes:	Glyma no./annotation	Mutation disrupts urease activity of:	Refs
<i>Eu1</i>	Urease (ESU)	Glyma05g27840/urease	ESU	Meyer-Bothling and Polacco, 1987; Torisky <i>et al.</i> , 1994
<i>Eu4</i>	Urease (UU)	Glyma11g37250/urease	UU	Meyer-Bothling and Polacco, 1987; Torisky <i>et al.</i> , 1994; Goldraj <i>et al.</i> , 2003
<i>Eu3</i>	UreG	Glyma08g08970/UreG	ESU and UU	Freyermuth <i>et al.</i> , 2000
<i>Eu2</i>	UreF	Glyma02g44440/UreF Glyma14g04380/UreF Glyma02g20690/UreD Glyma20g17990/UreD	ESU and UU	This work

^a A ‘third’ urease in the genome (Glyma08g10850) is most likely non-ureolytic because it has deletions in the ORF, as well as a mutated residue essential for activity.

activation complex. However, the missense mutant versions of Ch02UreF are hypothesized to impede access of Ch14UreF to the urease activation complex thereby preventing activation.

Analysis of the soybean genome (Schmutz *et al.*, 2009; <<http://www.phytozome.net/soybean>>) indicates that a segmental duplication event likely led to the Ch02UreF and Ch14UreF paralogues since they are on regions of shared synteny. UreF is postulated to bind to UreD on bacterial apo-urease and subsequently interact with and activate the UreG GTPase (Carter *et al.*, 2009). UreD–urease interaction has been demonstrated in rice (Cao *et al.*, 2010). Apparently, the stoichiometry of the activation complex subunits is critical since overexpression of UreD and UreF interferes with bacterial urease activation (Lee *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1994). Possibly, there was selective pressure for lowered accumulation of UreF protein, manifested by altered splicing of the Ch14UreF 5' leader, thus maximizing urease activity. However, it should be pointed out that (as mentioned above), among F₂:F₃ sibs of the eu2-b×Maverick cross, one or two doses of Ch02UreF (Eu2) result in the same level of active urease.

In vitro activation of UU isozyme was observed, and this assay might provide a test of the functionality of recombinant Ch14UreF. Embryo extracts of eu3-a (Table 2) can 'complement' either eu2-a or eu2-b extract to activate ubiquitous urease *in vitro* (Polacco *et al.*, 1999; Freyermuth *et al.*, 2000)—now explained by each extract providing the functions of UreF and UreG, respectively. Thus, if adding back recombinant Ch02UreF to embryo extracts of eu2-a and eu2-b results in urease activation, the same test can be applied to Ch14UreF. Witte *et al.* (2005) demonstrated *in vitro* activation of *Arabidopsis* urease by mixed extracts of *Escherichia coli* expressing apo-urease and two of three accessory proteins (i.e. UreD+UreF and UreD+UreG). The co-expression of apo-urease and UreD was essential for activation, thus reinforcing the role of UreD as an apo-urease chaperone.

There are two ureD paralogues in soybean (Table 3), and lack of urease-negative UreD lesions among the many urease-negative soybean mutants recovered suggests that both UreD genes are functional in urease activation. A prediction is that both are expressed at low levels, in agreement with multiple alternatively, and apparently defectively, spliced transcripts of UreD in *Arabidopsis* (Witte *et al.*, 2005).

The tools are now available for soybean to be a model plant for better understanding of divergence of function of paralogues arising either from recent polyploidy or segmental duplication. These tools will help to optimize the combination of alleles of paralogous genes for soybean improvement.

Acknowledgements

We thank Paul Little for excellent technical assistance, Perry Cregan for encouragement in SNP mapping, Mike McMullen for providing invaluable advice on analysis of SNP data, and Doug Randall for lab space. MMS was supported by a predoctoral fellowship from CAPES, Brazil.

References

- Bacanawo M, Witte C-P, Lubbers MW, Polacco JC. 2002. Activation of the urease of *Schizosaccharomyces pombe* by the UreF accessory protein from soybean. *Molecular Genetics and Genomics* **268**, 525–534.
- Bailey C, Boulter JD. 1971. Urease, a typical seed protein of the Leguminosae. In Harborne JB, Boulter D, Turner BL, eds. *The chemotaxonomy of the Leguminosae*. New York, : Academic Press, 485–502.
- Cao FQ, Werner AK, Dahncke K, Romeis T, Witte C-P. 2010. Identification and characterization of proteins involved in rice urea and arginine catabolism. *Plant Physiology* **154**, 98–108.
- Carlini CR, Polacco JC. 2008. Toxic properties of urease (perspectives). *Crop Science* **48**, 1665–1672.
- Carter EL, Flugga N, Boer JL, Mulrooney SB, Hausinger RP. 2009. Interplay of metal ions and urease. *Metallomics* **1**, 207–221.
- Eskew DL, Welch RM, Carey EE. 1983. Nickel: an essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. *Science* **222**, 621–623.
- Fahmy AS, Mohamed MA, Kamel MY. 1994. Ureases in the Cucurbitaceae, distribution and properties. *Phytochemistry* **35**, 151–154.
- Fan JB, Oliphant A, Shen R, *et al.* 2003. Highly parallel SNP genotyping. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* **68**, 69–78.
- Freyermuth SK, Bacanawo M, Polacco JC. 2000. The soybean Eu3 gene encodes a Ni-binding protein necessary for urease activity. *The Plant Journal* **21**, 53–60.
- Goldraij A, Beamer LJ, Polacco JC. 2003. Interallelic complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean. *Plant Physiology* **132**, 1801–1810.
- Goldraij A, Polacco JC. 1999. Arginase is inoperative in developing soybean seeds. *Plant Physiology* **119**, 297–304.
- Hyten DL, Song Q, Choi L-Y, Yoon M-S, Specht JE, Matukumalli LK, Nelson RL, Shoemaker RC, Young ND, Cregan PB. 2008. High-throughput genotyping with the Golden Gate assay in the complex genome of soybean. *Theoretical and Applied Genetics* **116**, 945–952.
- Kerr PS, Blevins DG, Rapp B, Randall DD. 1983. Soybean leaf urease, comparison with seed urease. *Physiologia Plantarum* **57**, 339–345.
- Lam R, Romanov V, Johns K, Battaile KP, Wu-Brown J, Guthrie JL, Hausinger RP, Pai EF, Chirgadze NY. 2010. Crystal structure of a truncated urease accessory protein UreF from *Helicobacter pylori*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **78**, 2839–2848.
- Lee M, Mulrooney SB, Renner MJ, Markowicz Y, Hausinger RP. 1992. Klebsiella aerogenes urease gene cluster: sequence of ureD and demonstration that 4 accessory genes (ureD, ureE, ureF, and ureG) are involved in nickel metallocenter biosynthesis. *Journal of Bacteriology* **174**, 4324–4330.

- Meyer-Bothling LE, Polacco JC.** 1987. Mutational analysis of the embryo-specific urease locus of soybean. *Molecular and General Genetics* **209**, 439–444.
- Meyer-Bothling LE, Polacco JC, Cianzio SR.** 1987. Pleiotropic soybean mutants defective in both urease isozymes. *Molecular and General Genetics* **209**, 432–438.
- Mulrooney SB, Ward SK, Hausinger RP.** 2005. Purification and properties of the *Klebsiella aerogenes* UreE metal-binding domain, a functional metallochaperone of urease. *Journal of Bacteriology* **187**, 3581–3585.
- Muñoz A, Piedras P, Aguilar M, Pineda M.** 2001. Urea is a product of ureidoglycolate degradation in chickpea. Purification and characterization of the ureidoglycolate urea-lyase. *Plant Physiology* **125**, 828–834.
- Muñoz A, Raso MJ, Pineda M, Piedras P.** 2006. Degradation of ureidoglycolate in French bean (*Phaseolus vulgaris*) is catalysed by a ubiquitous ureidoglycolate urea-lyase. *Planta* **224**, 175–184.
- Ng PC, Henikoff S.** 2001. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Research* **11**, 863–874.
- Park IS, Carr MB, Hausinger RP.** 1994. In vitro activation of urease apoprotein and role of urea as a chaperone required for nickel metallocenter assembly. Proceedings of the National Academy of Sciences USA **91**, 3233–3237.
- Polacco JC, Freyermuth SK, Gerendás J, Cianzio SR.** 1999. Soybean genes involved in nickel insertion into urease. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1149–1156.
- Polacco JC, Havir EA.** 1979. Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture. *Journal of Biological Chemistry* **254**, 1707–1715.
- Polacco JC, Holland MA.** 1993. Roles of urease in plant cells. *International Review of Cytology* **145**, 65–103.
- Polacco JC, Judd AK, Dybing JK, Cianzio SR.** 1989. A new mutant class of soybean lacks urease in leaves but not in leaf-derived callus or in roots. *Molecular and General Genetics* **217**, 257–262.
- Polacco JC, Krueger RW, Winkler RG.** 1985. Structure and possible ureide degrading function of the ubiquitous urease of soybean. *Plant Physiology* **79**, 794–800.
- Polacco JC, Winkler.** 1984. Soybean leaf urease, a seed enzyme? *Plant Physiology* **74**, 800–803.
- Salomone-Stagni M, Zambelli B, Musiani F, Ciurli S.** 2007. A model-based proposal for the role of UreF as a GTPase-activating protein in the urease active site biosynthesis. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **68**, 749–761.
- Schlueter JA, Dixon P, Granger CG, Grant D, Clark L, Doyle JJ, Shoemaker RC.** 2004. Mining EST databases to resolve evolutionary events in major crop species. *Genome* **47**, 868–876.
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, et al.** 2009. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* **463**, 178–183.
- Stebbins NE, Holland MA, Cianzio SR, Polacco JC.** 1991. Genetic tests of the roles of the embryonic ureases of soybean. *Plant Physiology* **97**, 1004–1010.
- Stebbins NE, Polacco JC.** 1995. Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiology* **109**, 169–175.
- Todd CD, Polacco JC.** 2004. Soybean cultivars ‘Williams 82’ and ‘Maple Arrow’ produce both urea and ammonia during ureide degradation. *Journal of Experimental Botany* **55**, 867–877.
- Todd CD, Polacco JC.** 2006. AtAAH, an allantoate amidohydrolase from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **223**, 1108–1113.
- Torisky RS, Griffin JD, Yenofsky RL, Polacco JC.** 1994. A single gene (Eu4) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. *Molecular and General Genetics* **242**, 404–414.
- Torisky RS, Polacco JC.** 1990. Soybean roots retain the seed urease synthesized during embryo development. *Plant Physiology* **94**, 681–689.
- Tuteja JH, Clough SJ, Chan W-C, Vodkin LO.** 2004. Tissue-specific gene silencing mediated by a naturally occurring chalcone synthase gene cluster in *Glycine max*. *Plant Cell* **16**, 819–835.
- Werner AK, Romeis T, Witte C-P.** 2009. Ureide catabolism in *Arabidopsis thaliana* and *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology* **6**, 19–21.
- Winkler RG, Blevins DG, Polacco JC, Randall DD.** 1987. Ureide catabolism of soybeans. II. Path of catabolism in intact leaf tissue. *Plant Physiology* **83**, 585–591.
- Winkler RG, Polacco JC, Blevins DG, Randall DD.** 1985. Enzymic breakdown of allantoate in developing soybeans. *Plant Physiology* **79**, 787–793.
- Witte C-P, Rosso MG, Romeis T.** 2005. Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**, 1155–1162.