

Introdução

Ureases são metaloenzimas que hidrolisam uréia para produzir amônia e CO₂. Essas enzimas são amplamente encontradas em fungos, bactérias e plantas, e exibem estruturas muito similares. Nosso grupo tem demonstrado que ureases de plantas e bactérias exibem propriedades biológicas independentes da sua atividade ureolítica que podem contribuir para a patogênese de microrganismos produtores de urease. Muitos fungos de importância médica também produzem urease, entre os quais estão *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*. A levedura *C. neoformans* é um fungo que causa criptococose, uma doença fatal em pacientes imunodeprimidos. *C. gattii* - sorotipo B, linhagem R265, contamina também os indivíduos imunocompetentes e causou um surto de criptococose em Vancouver, Canadá (1999 a 2003). A maioria dos isolados clínicos produzem grandes quantidades de urease, e vários autores sugerem que a urease de *Cryptococcus* desempenha um papel importante na patogênese. Neste trabalho, pretendemos investigar as propriedades biológicas da urease de *Cryptococcus* utilizando o *C. gattii* como patógeno modelo. Depois de protocolo de três etapas, a urease de *C. gattii* (CGU) foi purificada. A caracterização físico-química da CGU mostrou uma subunidade de 120 kDa. Os estudos cinéticos mostraram um K_m de 2,0 mM para uréia e pH ótimo 8,0. A inibição pelo ácido acetohidroxâmico ocorreu em baixas concentrações, enquanto que concentrações mais elevadas de p-hidroximercuriobenzoato foram necessários para a inibição da CGU, em comparação com outras ureases. Análises por espectrometria de massa em ESI-Q-TOF-MS/MS revelou 23 peptídeos CNBG4331T0 (Broad Institute, *C. gattii* urease). A análise pela coloração ácido periódico-Schiff para a verificação de glicosilação também foi feita e o resultado foi negativo.

Metodologia

➤ O fungo *Cryptococcus gattii* linhagem hipervirulenta R265, sorotipo B, isolado clínico da epidemia de Vancouver, foi utilizado como fonte de urease

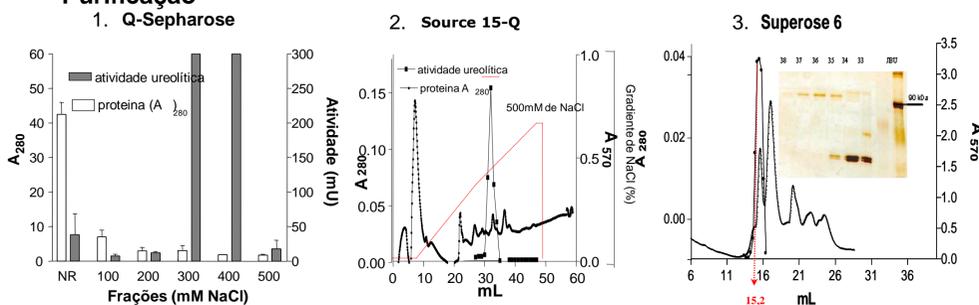
➤ Para a obtenção do Extrato Bruto (EB) as células cresceram em Meio Mínimo por 20h e foram lisadas em vórtex com pérolas de vidro e centrifugadas. O sobrenadante foi filtrado e dialisado gerando o EB

➤ A purificação ocorreu após três cromatografias, duas de troca iônica (Q-Sepharose e Source 15-Q) e uma de gel filtração (Superose 6). Para caracterização enzimática foram feitos ensaios de pH ótimo, inibidores, K_m e V_{max}, estimativa de massa molecular, análise em gel (SDS-PAGE), espectrometria de massa e análise de sequências

➤ Para o ensaio com o Reagente de Schiff foi utilizado o kit Glycoprotein Detection® (Sigma-Aldrich). A amostra da CGU purificada foi previamente concentrada em centricon YM-30® (Millipore) e submetida em análise por eletroforese SDS-PAGE. Uma alíquota das amostras foi corada com nitrato de prata. A proteína peroxidase foi utilizada como controle positivo nesse ensaio.

Resultados e Discussão

Purificação



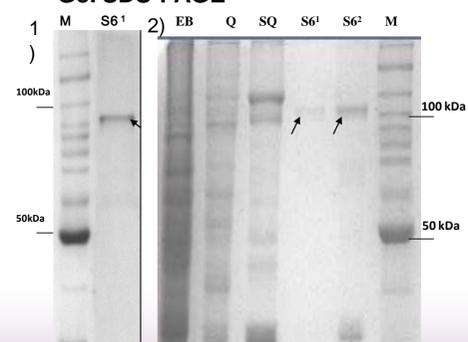
Purificação da CGU: (1) cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose, com gradiente descontínuo de NaCl. (2) cromatografia de troca iônica Source 15-Q com gradiente contínuo de NaCl. (3) cromatografia de gel-filtração, a seta vermelha mostra o pico de atividade ureolítica e o gel (SDS-PAGE) mostra as frações coletadas no pré-pico, no pico e no pós-pico.

Tabela de Purificação

Frações	Vol (mL)	pI (mg/mL) ^a	Enzimas Totais (mU) ^b	AE ^c (mU/mg)	Rendimento Enzimático (%)	Índice de Purificação (x)
Extrato Bruto	100	2.1	6930	33	100	1
Q-Sepharose	50	0.15	5105	667	73	20
Source 15-Q ^d	0.6	0.5	1752	5482	23	117
Superose 6 ^d	1.2	0.065	1157	17807	20	539

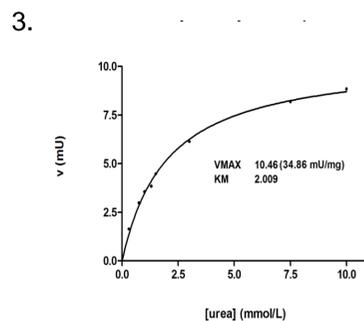
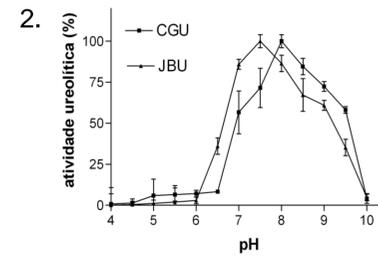
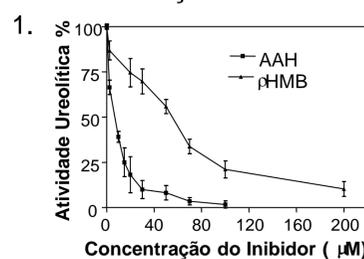
Tabela de Purificação: ^a Conteúdo protéico medido pela absorbância em comprimento de onda de 280nm. ^b A atividade ureolítica foi medida por método colorimétrico de (Weatherburn, 1967). ^c Atividade Específica.

Gel SDS-PAGE



Análise em gel SDS-PAGE: Gel 10% de acrilamida, corado com Comassie. EB: Extrato Bruto; Q: cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose; SQ: Cromatografia de troca iônica Source 15-Q; S61: "pool" de atividade da cromatografia de gel-filtração, frações 36 e 37; S62: a mesma etapa, frações 35 e 39; MM: Marcador que mostra as massas moleculares. As setas mostram a CGU purificada (acima de 100 kDa).

Caracterização Enzimática



Caracterização enzimática : (1) Inibição da CGU por Ácido acetohidroxâmico (AAH) e por p-hidroximercuriobenzoato (p-HMB). (2) pH Ótimo da atividade ureolítica da JBU e da CGU. (3) Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten da CGU são mostrados.

Espectrometria de massa

1 MHLLEPRETDK LILTLTGLTA QRRLRGLLIL NRAETIALIS SQLQEFTRDG
51 RHSVLAELMDM GKMLGRHRHV RKGVPESIHLS IQVEGTFPDG VFLVTVDPI
101 SDDGDLNNA FYGSFLPIPS ADVFPAAPEP KDTLLGALIC REEPIKINVS
151 RRRFRLEVKN AGDRPIQVGS HYHFLFNPA LVFDRLLSYG YHLDIPAGTA
201 VRFPPEKKT VTMVEFGGK IFHGGSGLGS GPFNENLRET TIKAMVEKGG
251 FSHKQEKEVE EGPVTEMNRE VYASMFPGTT GDKIKLADMD LWIEIEKDYT
301 VYGECKFFGG GKVLRDGGGQ ASGRYDHEVL DLVITNALIV DWNGIYKADI
351 GVKNGIIVGI GKAGNPMDM GVTDMIVGS NSEVIAGEKL IVTAGALDVH
401 VHYICPQMT EALASGITTV VGGGTGPADG SNATTCTSP FYMQNMKAT
451 DTPLNFGFT GKGNDSGTNS LRDIIEAGAC GLKVHEDWGA TPEVIDRALT
501 IADEYDVQVN LHSDTLNESS VVESTLAIAIK GRTIHSYHTE GAGGGHAPDI
551 IVVCEHENVL PSSTNTPRYP AVNTLDEHLD MLMVCHHLK SIPEDIAFAD
601 SRIRSETVAA EDVLQDTGAI SMISDSQAM GRIGEVITRT WRTAAKMKQY
651 RGPLEGDEPT RDNNRVKRYV AKYTIINPAIT HGMSHLIGHV AVGLADLVF
701 WTAESFGARP EMVLKGGVIA WAAIGEANAA IPTVQPVIGR PMWGAQFAA
751 ALNSIVVWSQ ASLKDVLVLR FDIKKRAEAV KNCRAIGKDK MKWNTMPKMK
801 TVDPEYDVR ADGLVCDVPP ADKLPKTKRY FVY

ESI-Q-TOF-MS/MS: A proteína purificada em solução foi submetida à análise de espectrometria de massa Q-TOF resultando em 32% de cobertura de sequência. Os peptídeos correspondentes são mostrados em vermelho de acordo com CNBG 4331T0 em Broad Institute (*C. gattii* urease).

Análise comparativa das sequências

```

                250      260      270      280      290      300
CANENS_1      AMHAVRSKG FGHKEEKDASEGFTKEDPNCPPNFTFIHRKEYANKYGPTTGDKIRLGDNTL
CANENS_JBUREIIB AMEIVCRRE FGHKEEKDASEGVTGDPDPCPFKAIPREEYANKYGPTTGDKIRLGDNTL
CRYGAT        TIKAMVEKGG FSHKQEKEVEEGPVTEMN-----REVYASMFPGTTGDKIKLADMDL
                :::::  :::::  :::::  :::::  :::::  :::::
Prim.cons.    AM3AV33KGGFGHKEEKDASEG3TTEPD2C2PF222I2REEYANKYGPTTGDKIRLGDNTL
    
```

Análise comparativa das Sequências: A região acima corresponde à região peptídeo entomotóxico (resíduos 231-323), originalmente descrita por Jack bean urease (pepcanatox) Mulinari, F. et al. al, 2007. A caixa verde indica a característica mais notável destes alinhamentos, uma lacuna de 9 resíduos na urease do fungo. Além disso, uma caixa laranja mostra um resíduo indel. A sequência completa mostrou um elevado nível de similaridade, revelaram cerca de 52% de identidade e 30% de similaridade, quando comparando sequências de aminoácidos de Jack Bean (CANENS_1; CANENS_JBUREIIB) e de *C. gattii* (CRYGAT) ureases.

Análise da coloração ácido periódico-Schiff

O gel com alíquotas das frações submetidas a esta análise foram coradas com nitrato de prata, mostrando que a CGU estava parcialmente purificada, apesar da elevada atividade específica.

A análise de glicosilação com ácido periódico resultou em reação positiva na concentração de 5 µg da proteína utilizada como controle, a peroxidase, que contém 16% de teor de carboidratos. O resultado preliminar demonstra, portanto, que até a concentração de 90µg de CGU, o resultado foi negativo para a glicosilação.

Conclusões

- O cultivo in vitro do *Cryptococcus gattii* resultou em um extrato bruto com atividade ureolítica
- A CGU foi purificada na ordem de 539x apresentando uma atividade específica de 17807mU/mg, muito alta quando comparada à a outras ureases fúngicas
- A CGU possui um pH ótimo 8,0 semelhante a outras ureases fúngicas, porém é mais alcalino que as ureases encontradas nas plantas
- O K_m de 2mM obtido na CGU está na mesma faixa determinada para ureases de fungos e para plantas
- O efeito inibitório do AAH foi similar aos encontrados em outras ureases. Porém as concentrações do inibidor p-HMB foram maiores, talvez pelo fato de que a CGU possui 11 resíduos de cisteína, comparada à JBU que tem apenas 6.
- A estimativa molecular foi de 100-120kDa em SDS-PAGE, confirmando a mesma massa da proteína nativa pela cromatografia de gel filtração. Estes resultados sugerem que esta urease é um monômero.
- Esse foi o primeiro trabalho de purificação de uma urease de *Cryptococcus* considerada por vários autores como um importante fator de virulência.

Perspectivas

- Ensaios biológicos com a CGU nativa e modificada: agregação plaquetária, inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos, atividade inseticida e toxicidade em ratos
- Potencial de virulência de URE genes e ensaios de atividade em mutantes URE e proteínas acessórias UreG, Ure D e UreF.
- Novos ensaios para a determinação da glicosilação com a CGU purificada em uma concentração maior do que a testada anteriormente.
- Sequenciamento da CGU por método de Edmann