

OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DO PEPTÍDEO RECOMBINANTE SOYURETOX DERIVADO DA URESASE DE SOJA (GLYCINE MAX)



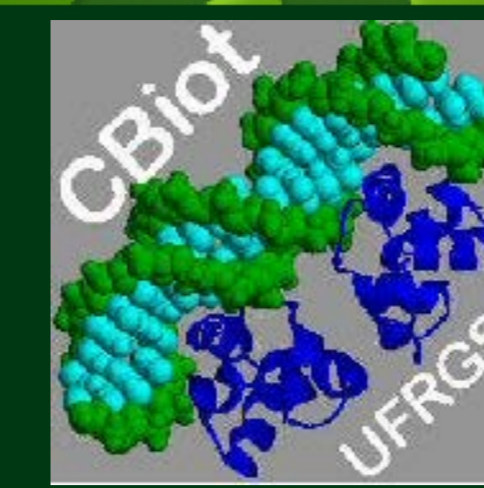
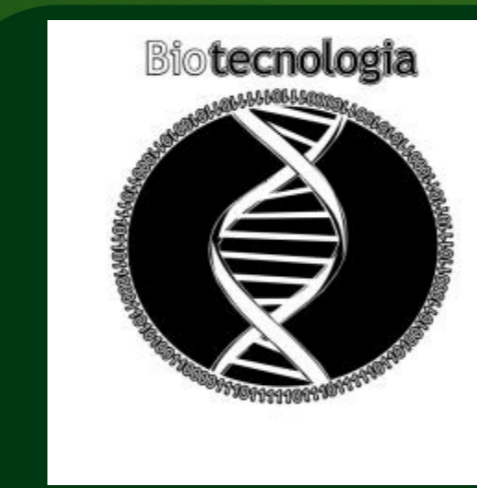
Laprottox
www.ufrgs.br/laprottox

Camila Kehl Dias¹, Célia Regina Carlini^{2,3}

¹ Acadêmica de Biotecnologia-UFRGS e acadêmica de Química-PUCRS

² Pesquisadora do Instituto do Cérebro -PUCRS

³ Departamento de Biofísica e Centro de Biotecnologia - UFRGS



Introdução

Ureasas são metaloenzimas níquel dependentes, que catalisam a hidrólise da ureia a amônia e gás carbônico. São classificadas como proteínas *moonlighting* e estão relacionadas à disponibilidade de nitrogênio e a mecanismos de defesa em plantas. A soja (*Glycine max*), possui duas isoformas de urease, a embrião específica e a ubíqua. Na *Canavalia ensiformis*, a isoforma de urease Canatoxina, apresenta atividade entomotóxica e esta toxicidade é devida à liberação de um peptídeo interno de 10 kDa, mediante hidrólise da Canatoxina por catepsinas de insetos susceptíveis, denominado Pepcanatox. Baseado na sequência N-terminal do Pepcanatox, um peptídeo recombinante denominado Jaburetox foi clonado e expresso em *Escherichia coli*. Jaburetox apresentou ação entomotóxica e atividade contra fungos fitopatogênicos e de importância médica. Um peptídeo recombinante equivalente ao Jaburetox foi clonado em *E. coli*, utilizando-se a sequência da urease ubíqua de soja como molde. Este peptídeo foi denominado Soyuretox, apresentando 72% de identidade com o Jaburetox. O Soyuretox apresenta atividade antifúngica contra as leveduras *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae* e os fungos filamentosos *Penicillium herquei* e *Curvularia lunata*. Além disso, plantas transgênicas de soja, superexpressando o Soyuretox, demonstram atividade contra o nematóide *Meloidogyne javanica*.

Materiais e Métodos

Otimização da expressão por Metodologia de Superfície de Resposta

A fim de otimizar as condições de produção do peptídeo soyuretox, um planejamento fatorial 2² (tabela 1) com 12 condições experimentais, foi realizado considerando como variáveis a concentração do indutor IPTG e temperatura, no processo de indução e expressão do peptídeo. A concentração de IPTG variou de 0,1 mM a 1 mM e a temperatura de 18 °C a 37 °C.

Tabela 1: fatorial para avaliação de expressão de Soyuretox

Fatorial 1			Fatorial 2		
Experimento	Temperatura (°C)	IPTG (mgmL ⁻¹)	Experimento	Temperatura (°C)	IPTG (mgmL ⁻¹)
1	(-1) 21	(-1) 0.23	1	(-1) 16	(-1) 0.08
2	(-1) 21	(+1) 0.87	2	(-1) 16	(+1) 0.43
3	(+1) 34	(-1) 0.23	3	(+1) 21	(-1) 0.08
4	(+1) 34	(+1) 0.87	4	(+1) 21	(+1) 0.43
5	(0) 27	(0) 0.55	5	(0) 18.5	(0) 0.25
6	(0) 27	(0) 0.55	6	(0) 18.5	(0) 0.25
7	(0) 27	(0) 0.55	7	(0) 18.5	(0) 0.25
8	(0) 27	(0) 0.55	8	(0) 18.5	(0) 0.25
9	(0) 27	(-1.41) 0.1	9	(0) 18.5	(-1.41) 0.01
10	(0) 27	(+1.41) 1	10	(0) 18.5	(+1.41) 0.5
11	(-1.41) 18	(0) 0.55	11	(-1.41) 15	(0) 0.25
12	(+1.41) 37	(0) 0.55	12	(+1.41) 22	(0) 0.25

Para avaliar a condição em que houve maior expressão de Soyuretox, no experimento de fatorial 1, um protocolo de extração, purificação e análise por SDS-PAGE foi efetuado.

Nesta análise por SDS-PAGE a absorvância das bandas de expressão do peptídeo em cada experimento foi analisada utilizando o programa GelQuantNET.

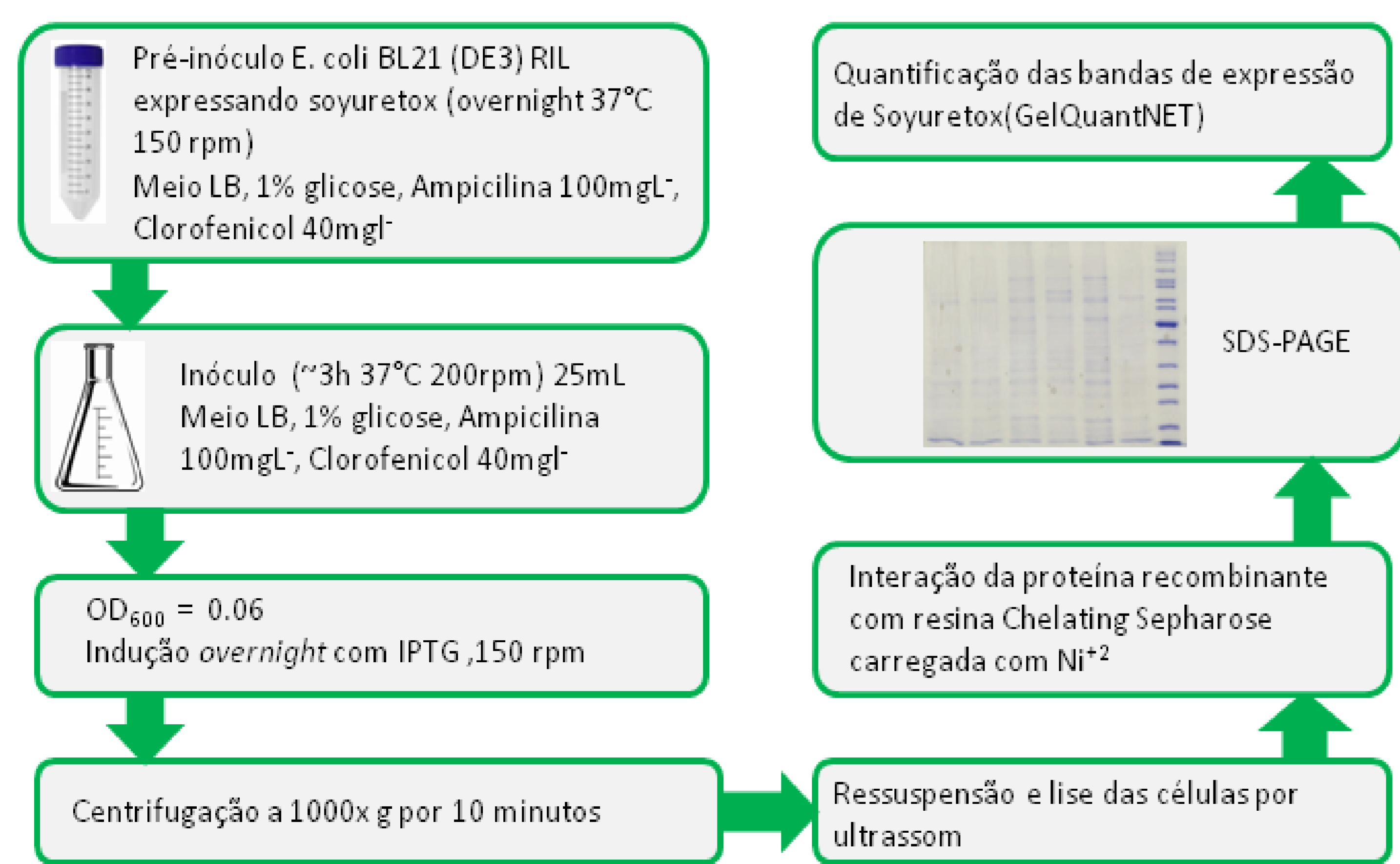


Figura 2: fluxograma da extração, purificação e análise de Soyuretox

Resultados e Discussões

A Metodologia de Superfície de Resposta foi utilizada para análise dos resultados obtidos no planejamento fatorial e consequente entendimento da relação das variáveis, temperatura e concentração do indutor de expressão, com a expressão de Soyuretox. Os resultados do fatorial foram analisados pelo software Statistica 6.0 quanto à sua significância estatística, utilizando análise de Variância (ANOVA). Foi, então, gerada uma Superfície de Resposta que determinou duas regiões de ótimo, que representa as condições de maior produção de Soyuretox. Nestas regiões de ótimo foram obtidas concentrações do peptídeo recombinante que variam entre 0.9 mgL⁻¹ e 1.1 mgL⁻¹.

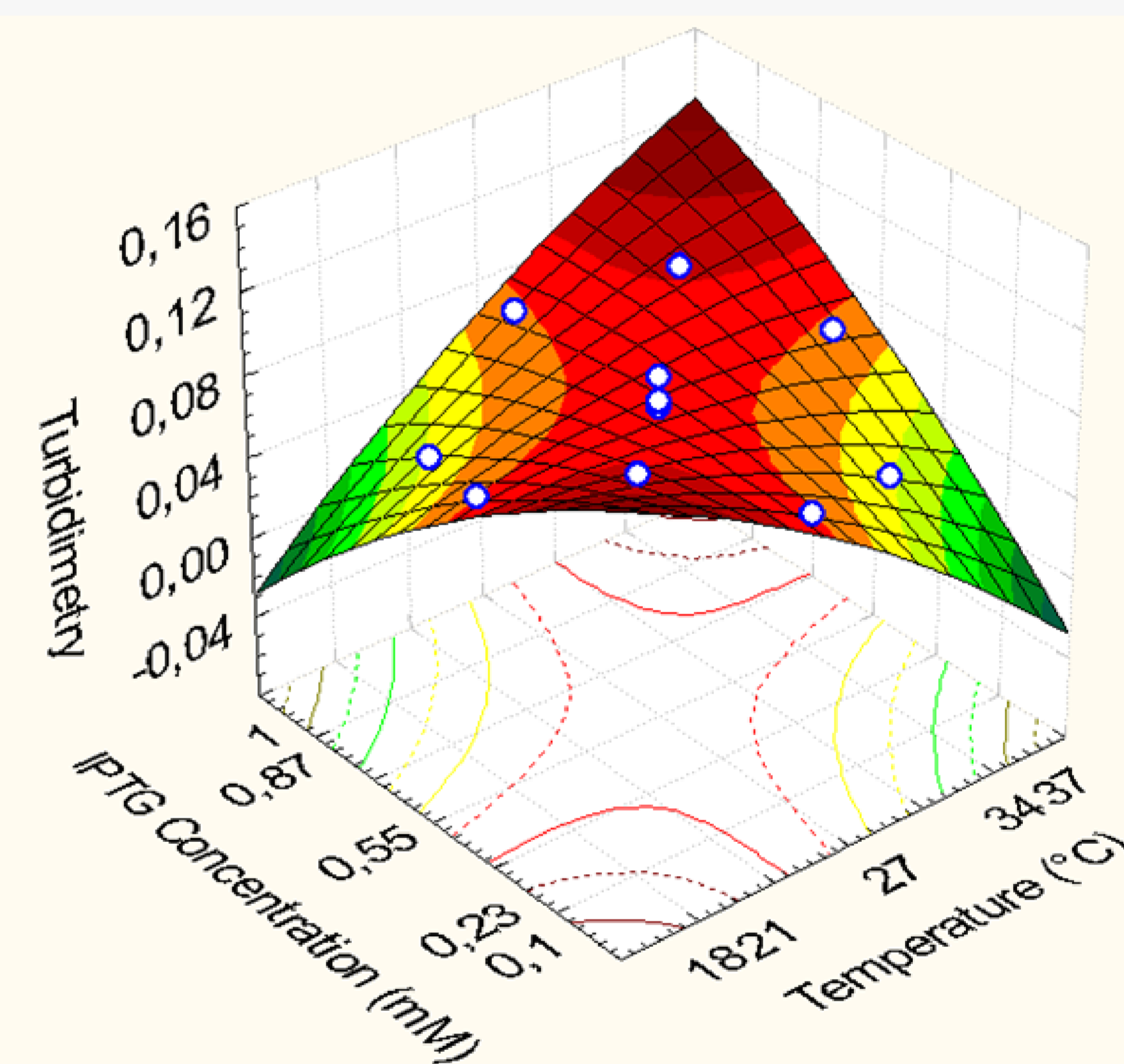


Figura 2: Superfície de resposta gerada para avaliar o efeito da temperatura e concentração de indutor de expressão (IPTG) sobre a expressão do peptídeo Soyuretox produzido em *E. coli*. As regiões em verde equivalem às expressões mais baixas e as regiões em vermelho equivalem às expressões mais significativas do peptídeo.

Já que foi observada uma região de máxima de expressão de Soyuretox convergindo para temperaturas mais extremas utilizadas no fatorial 1, será realizado o fatorial 2 (descrito na tabela 1). Tendo, assim, mais precisão no desenvolvimento da curva de expressão de Soyuretox.

Perspectivas

- Será realizado outro fatorial 2² (tabela: fatorial 2), desta vez utilizando temperaturas mais baixas (15 °C a 22 °C), igualmente será realizada a validação dos fatoriais de modo a confirmar os resultados obtidos.
- Posteriormente, serão realizados ensaios entomotóxicos, por meio de ingestão e injeção, com os insetos *Dysdercus peruvianus* e *Spodoptera frugiperda*. Os resultados dos bioensaios serão avaliados de modo a caracterizar a entomotoxicidade do peptídeo recombinante Soyuretox.