

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

BIOLOGIA MOLECULAR

EXPRESSÃO DE URICASE DE *Bacillus subtilis*

Em *Escherichia coli*

Pollyanna Pfrimer

Brasília-DF

2007

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

BIOLOGIA MOLECULAR

EXPRESSÃO DE URICASE DE *Bacillus subtilis*

EM *Escherichia coli*

Pollyanna Pfrimer

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe G. Torres

Brasília–DF

2007

Pollyanna Pfrimer

**EXPRESSÃO DE URICASE DE *Bacillus subtilis*
EM *Escherichia coli***

Esta dissertação foi apresentada à banca como exigência parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Brasília, 15 de fevereiro de 2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Araripe G. Torres
Universidade de Brasília – UnB
Presidente da banca

Profa. Dra. Lucília Helena Marcelino
Embrapa Cenargen
Membro efetivo

Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima
Universidade de Brasília – UnB
Membro efetivo

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres, e à Profa. Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes, por terem me transmitido seus conhecimentos e experiências.

Ao Prof. Carlos Bloch e à Profa. Beatriz Dolabela de Lima, por terem sido sempre prestativos e por terem me cedido o uso de seus laboratórios para a realização deste estudo.

Aos professores da Biologia Molecular, Élide, Márcio, Suelly e Ildinete, que direta ou indiretamente me ajudaram nos momentos de dúvidas com os seus conhecimentos.

Aos meus colegas de laboratório, Alexsandro, Andrelisse, Camila, David, Fátima Gaúcho, Gil, Hugo, Ivonildes, Juliana, Loise, Marciano, Paty Vet, Paty Luíza, Saulo e Vera, pela ajuda e esclarecimentos. E, em especial, à Vivis e Janice, que sempre estiveram presentes nas dificuldades no laboratório.

Aos meus colegas, Luciano Paulino e Ângelo Basile, por me ajudarem na montagem das figuras e na formatação desta dissertação.

À Isabel Quixabeira, que me ensinou a fazer da vida um caminho mais fácil e fascinante quando estamos abertos ao auto-conhecimento.

À Prof. Me. Suzana Oellers, que compartilhou comigo as suas experiências de vida e os seus conhecimentos tão ricos.

À minha amiga, Maria Elisa, que sempre esteve presente em todos os momentos, felizes ou difíceis, e sempre me estendeu a sua mão amiga.

Às minhas amigas, Natália, Dasy e Kílvia, pela presença reconfortante e pelos momentos de descontração e lazer.

Aos meus tios, Armim, Marlene e Magda Pfrimer, pela presença amiga e pelos cuidados para comigo.

Dedico esta dissertação de mestrado

Aos meus pais, Amadeus e Araci, pelo amor incondicional, a presença sempre amiga e dura quando necessária para o fortalecimento dos meus valores e caráter.

Aos meus irmãos, Matheus e André, à minha cunhada, Linda, e ao meu sobrinho, Luca, pelos momentos felizes e pelas experiências de vida que eles me proporcionaram.

RESUMO

A uricase, uma enzima que converte ácido úrico em alantoína, é comumente usada em kits comerciais de dosagem de ácido úrico. Com a finalidade de produzir esta enzima em grande escala por técnicas de Engenharia Genética, o gene da uricase de *Bacillus subtilis subtilis* foi clonado e expresso em *Escherichia coli*. Para tanto, foi feita uma PCR utilizando-se como *template* o DNA cromossomal de *B. subtilis* e *primers* específicos para amplificação do gene *pucLM*. O amplicon foi sub-clonado seguindo-se seqüenciamento para a confirmação da seqüência do gene e clonagem do gene *pucLM* no vetor de expressão pET21a. Esse vetor de expressão permite a fusão do gene da uricase com uma cauda de histidina His_{6x}. O vetor resultante, pETURI, foi usado para transformar as linhagens de *E. coli* BL21 DE3λ pLysS, BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43, BL21 (DE3) PRILL e SURE, e a indução da expressão. Amostras da linhagem de *E. coli* BL21 DE3λ pLysS foram selecionadas para o presente estudo. Essas células foram coletadas em diversos tempos de indução e analisadas por SDS-PAGE, que revelou a presença de uma proteína de indução de ~63 kDa. A espectrometria de massa foi utilizada para determinar a massa molecular da enzima recombinante, tendo detectado um íon com massa molecular de 58,67 kDa. Análises de Western Blot confirmaram a presença da cauda de histidina na proteína de indução e detectaram degradação da enzima recombinante na porção N-terminal. A purificação foi realizada em uma coluna de afinidade Ni-NTA. Ensaio enzimáticos detectaram uma proteína estável com pH ótimo 8,0, temperatura ótima entre 25°C e 37°C e atividade uricásica na fração eluída com atividade específica de 39 U/mg.

Palavras-chave: uricase; ácido úrico; hiperuricemia; *Bacillus subtilis*.

ABSTRACT

Bacillus subtilis* URICASE EXPRESSION IN *Escherichia coli

Uricase, an enzyme that converts uric acid into allantoin, is commonly used in commercial kits for uric acid detection. Aiming to produce this enzyme in industrial scale using Genetic Engineering techniques, the uricase gene of *Bacillus subtilis subtilis* was cloned and expressed in *Escherichia coli*. In order to achieve this, a PCR was performed using *B. subtilis* chromosomal DNA as template and specific primers to amplify the gene *pucl*. The amplicon was sub-cloned following sequencing to confirm the gene sequence and cloning of the gene *pucl* in vector of expression pET21a. This vector of expression permits the fusion of the uricase gene with a histidine tag His_{6x}. The resulting vector, pETURI, was used to transform the strains of *E. coli* BL21 DE3λ pLysS, BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43, BL21 (DE3) PRILL, and SURE, and the expression was induced by adding IPTG to the culture media. Samples of *E. coli* BL21 DE3λ pLysS strain were selected to be used in the present study. These cells were collected in several induction times and analyzed by SDS-PAGE, which revealed the presence of a ~63-kDa induction protein. Mass spectrometry was used to determine the molecular mass of the recombinant enzyme, having detected an ion with molecular mass of 58,67 kDa. Western Blot analyses confirmed the presence of the histidine tag in the induction protein and detected degradation of the recombinant enzyme in the N-terminal portion. Purification was carried out in Ni-NTA affinity column. Enzymatic essays detected a stable protein with optimum pH 8.0, optimum temperature ranging from 25°C and 37°C, and uricase activity in the eluding fraction with specific activity of 39 U/mg.

Key words: uricase; uric acid; hyperuricemia; *Bacillus subtilis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa metabólico da via <i>de novo</i> e de salvação da síntese de purina, nucleotídeos, nucleosídeos e bases nitrogenadas.	18
Figura 2.	Via <i>de novo</i> do metabolismo das purinas.	19
Figura 3.	Estrutura terciária da enzima UOX de <i>A. flavus</i>	21
Figura 4.	Reação de degradação do ácido úrico em alantoína pela enzima uricase.	23
Figura 5.	Via da purina. A Rasburicase® catalisa a oxidação do ácido úrico a alantoína.	25
Figura 6.	Ensaio colorimétrico baseado na formação da quinoneimina. ...	27
Figura 7.	Esquema das reações ocorridas na formação da quinoneimina.	27
Figura 8.	<i>Primers</i> PUCL5 e PUCL3.	38
Figura 9.	Seqüência primária e tradução predita do gene <i>pucLM</i> de <i>B. subtilis</i> . Os nucleotídeos sublinhados correspondem à região de anelamento dos <i>primers</i> PUCL5e PUCL3.	39
Figura 10.	Mapa físico do vetor pGEM-T (Promega).	40
Figura 11.	Mapa físico do vetor pET21a e região de múltipla clonagem. ...	41
Figura 12.	Análise em gel de agarose 0,8% do gene <i>pucL</i> amplificado por PCR utilizando <i>Taq</i> Platinum.	52
Figura 13.	Análise de restrição em gel de agarose 0,8% do vetor pGEMURI.	53
Figura 14.	Resultado da análise Blast-n da seqüência do produto de PCR.	54
Figura 15.	Análise em gel de agarose 0,8% de plasmídios isolados após transformação com sistema de ligação pET21a + gene <i>pucL</i> . ..	55
Figura 16.	Análise de restrição em gel de agarose 0,8% do vetor pETURI.	56
Figura 17.	Análise em gel SDS-PAGE 12% da indução de expressão da uricase em <i>E. coli</i> BL21 DE3λ pLysS.	57
Figura 18.	Seqüência teórica da enzima recombinante produzida em <i>E. coli</i>	57
Figura 19.	Comparação da indução de expressão da uricase em <i>E. coli</i> BL21 DE3λ pLysS sem e com a adição de rifampicina.	58

Figura 20.	Análise em gel SDS-PAGE 10% do perfil protéico de células BL21 DE3λ pLysS transformadas com os vetores pET21a e pETURI e submetidas a indução com IPTG.	59
Figura 21.	Western Blot de culturas de <i>E. coli</i> BL21 DE3λ pLysS expressando uricase de <i>B. subtilis</i>	60
Figura 22.	Análise em gel SDS-PAGE 12% das etapas de purificação da enzima recombinante em coluna de afinidade Ni-NTA.	61
Figura 23.	Análise em gel SDS-PAGE 12% das proteínas eluídas por <i>step gradiente</i> com o tampão de eluição contendo diferentes concentrações de imidazol (50, 100, 150 e 200 mM)..	62
Figura 24.	Análise das etapas de purificação da enzima recombinante em gel SDS-PAGE 12%.....	63
Figura 25.	Espectrometria de massa. Detecção de um íon com massa molecular de 58,67 kDa.	64
Figura 26.	Determinação do pH ótimo da enzima recombinante.	64
Figura 27.	Determinação da temperatura ótima da enzima recombinante.	65
Figura 28.	Determinação da estabilidade da enzima recombinante.	66

LISTA DE TABELAS

		página
Tabela 1.	Condições da PCR utilizadas para a amplificação do gene da uricase com a <i>Taq</i> polimerase (Cenbiot).	43
Tabela 2.	Condições da PCR utilizadas para a amplificação do gene da uricase com a <i>Taq</i> Platinum (Invitrogen).	44

LISTA DE QUADROS

		página
Quadro 1.	Linhagens e genótipos de <i>E. coli</i> utilizados no presente estudo.	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ADA – adenosina deaminase
- AMP – adenina 5' monofosfato
- APB – tampão para fosfatase alcalina
- ATP – adenosina trifosfato
- 4-AAP – 4-aminoantipirina
- BCIP – fosfato de bromo cloroindolil
- BSA – albumina sérica bovina
- cDNA – DNA complementar
- CMOS – metal óxido semicondutor complementar
- CRF – 5-formamidoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo
- Cys – cisteína
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
- EtBr – brometo de etídeo
- g – força da gravidade
- GMP – guanina 5' monofosfato
- GPRT – guanina fosforibosiltransferase
- GTP – guanina 5' trifosfato
- h – Hora
- HGPRT – hipoxantina guanina fosforibosiltransferase
- HGPT – hipoxantina guanina fosforiltransferase
- His-tag – cauda de histidina
- HPRT – hipoxantina fosforibosiltransferase
- Hz – Hertz
- IMP – inosina 5' monofosfato

IPTG – isopropil- β -tio-galactosídeo

kb – quilobase

kDa – quilodalton

LB – Luria-Bertoni

mA – miliAmpère

min – minuto

mL – mililitro

μ L – microlitro

M – molar

mM – milimolar

NBT – azul de nitro tetrazólio

nm – nanômetro

Ni-NTA – resina de agarose ligada a níquel

N¹⁰-formil THF – N¹⁰-formil-tetra-hidrofolato

Pb – pares de bases

PBS – salina tamponada com fosfato

PBS-T – salina tamponada com fosfato-Tween

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

pI – ponto isoelétrico

pmol – picomoles

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil

PNP – purina nucleosídeo fosforilase

PRPP – 5-fosforribosil-1-pirofosfato

PRPS – fosforribosilpirofosfato sintetase

RNAse – ribonuclease

rpm – rotações por minuto

s – segundo

SDS – sulfato de sódio dodecil

SDS-PAGE – gel de poliacrilamida desnaturante

t – tempo

TLS – síndrome da lise tumoral

T_m – temperatura média

uox – gene *pucl*

UOX – Uricase de *Bacillus subtilis*

UV – ultravioleta

V – volts

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-d-galactosídeo

XMP – xantosina 5' monofosfato

XO – xantina oxidase

W – watts

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ABREVIATURAS

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	16
	2.1 Objetivo geral	16
	2.2 Fluxograma	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
	3.1 Metabolismo das purinas	17
	3.2 Hipouricemia	22
	3.2.1 Hipouricemia primária	23
	3.2.2 Hipouricemia adquirida	23
	3.3 Hiperuricemia	24
	3.4 Urato oxidase	24
	3.4.1 Urato oxidase de <i>Bacillus</i>	26
4	METODOLOGIA	29
	4.1 Meio de cultura, tampões de reação e soluções utilizados	29
	4.1.1 Meio de cultura LB (pH 7,2)	29
	4.1.2 Tampões de reação	29
	4.1.3 Soluções	32
	4.2 Linhagens de <i>B. subtilis</i> e <i>E. coli</i>	37
	4.3 <i>Primers</i>	38
	4.4 Marcadores de massa molecular	38
	4.5 Plasmídios	40
	4.6 Ferramentas de bioinformática	40
	4.7 Extração do DNA cromossomal de <i>B. subtilis</i>	41
	4.8 Análise do DNA em gel de agarose	42
	4.9 PCR	43

4.10 Purificação do produto de PCR	44
4.11 Purificação do DNA plasmidial	44
4.12 Purificação do DNA plasmidial com fenol-clorofórmio	45
4.13 Digestão do DNA com enzimas de restrição	46
4.14 Sistema de ligação	47
4.15 Transformação de células de <i>E. coli</i>	47
4.16 Indução da expressão da enzima recombinante	48
4.17 Análise de proteína em gel de poli-acrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	48
4.18 Western Blot	49
4.19 Purificação da enzima recombinante	49
4.20 Determinação da atividade uricásica	50
4.21 Seqüenciamento	51
4.22 Espectrometria de massa	52
5 RESULTADOS	53
5.1 Clonagem do gene da uricase de <i>B. subtilis</i>	53
5.2 Expressão de uricase em <i>E. coli</i>	56
5.3 Purificação da enzima recombinante	61
5.4 Caracterização da enzima recombinante	64
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	75
REFERÊNCIAS	76
BIBLIOGRAFIA	82

INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil depende de matéria-prima importada para a produção de kits de diagnósticos, o que torna o mercado interno totalmente dependente do mercado externo, além de resultar em custo elevado do produto final. O país gasta cerca de US\$ 4 milhões por ano no mercado externo apenas com a compra de enzimas para diagnóstico. Uma alternativa para aliviar essa dependência é a produção nacional das enzimas utilizadas nos kits utilizando técnicas de engenharia genética. Para que isso seja possível, os genes correspondentes a essas enzimas devem ser clonados e expressos em células hospedeiras. Dentre essas células, destacam-se as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* e a bactéria *Escherichia coli* como as principais células hospedeiras eucarióticas e procarióticas, respectivamente.

Para esta dissertação foi proposto o desenvolvimento de tecnologia nacional para produção de uricase recombinante em *E. coli* visando compor o kit de dosagem de ácido úrico, essencial para o acompanhamento médico de pacientes com quadro clínico de gota ou hiperuricemia. Com isso, o Brasil ganhará autonomia na produção biotecnológica dessa enzima, diminuindo as importações e o custo de produção dos kits para o mercado nacional. Esta pesquisa previu, ainda, a transferência de tecnologia para a empresa goiana Bioshop Produção e Comércio de Reagentes Biológicos para Laboratório Ltda., que deverá produzir e comercializar o kit nacional.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Obter uma linhagem de *Escherichia coli* que expresse o gene *pucL* de *B. subtilis* correspondente à uricase.
- Utilização da enzima em kits de dosagem de ácido úrico.

2.2 Fluxograma

- 1) Isolar DNA cromossomal de *B. subtilis* subespécie *subtilis* LMD 69.3;
- 2) Amplificar o gene *pucL* (~1,5 kb) por PCR utilizando *primers* específicos;
- 3) Clonar o gene *pucL* no vetor pGEM-T;
- 4) Isolar o gene *pucL* clonado após digestão do vetor com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I;
- 5) Sub-clonar o gene *pucL* no vetor de expressão pET21a digerido com *Bam*HI e *Xho*I;
- 6) Transformar diferentes linhagens de *E. coli* e selecionar uma delas para expressão induzida;
- 7) Realizar ensaios de expressão e detecção da enzima recombinante;
- 8) Purificar e caracterizar a uricase recombinante obtida.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Metabolismo das purinas

O metabolismo das purinas, principalmente nos seres humanos, converte na formação do ácido úrico, o qual é um composto que em altas concentrações provoca doenças como a gota e a hiperuricemia. O conhecimento das vias do metabolismo das purinas se mostra importante para o controle da produção do ácido úrico.

Os nucleotídeos são constituídos por uma pentose, grupos fosfato e bases nitrogenadas, podendo estas ser pirimidinas (timina e citosina) ou purinas (adenina e guanina). Os nucleotídeos purínicos, formados na via *de novo*, são importantes para os organismos vivos por estarem envolvidos em muitos processos fundamentais, dentre os quais se encontram a síntese de ácidos nucléicos e a biossíntese de vários aminoácidos e vitaminas, como a riboflavina, além de servirem como suplemento de energia. O anel purínico é sintetizado a partir de aminoácidos, como: a glicina, que fornece os carbonos 4 e 5 e o nitrogênio 7; o aspartato, que fornece o nitrogênio 1; e a glutamina, que fornece outros dois átomos de nitrogênio (N-3 e N-9), os quais estão presentes no grupamento amida da cadeia lateral da glutamina. Os derivados ativos do tetra-hidrofolato fornecem dois átomos de carbono (C-2 e C-8), enquanto o CO₂ fornece o carbono 6 para o anel purínico (ZHANG; DIXON, 1992).

A via *de novo* inicia-se com a ribose 5-fosfato, formada principalmente na via da pentose-fosfato, em presença da enzima ribose fosfato pirofosfoquinase e de adenosina trifosfato (ATP), dando origem a 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP). O grupo pirofosfato é transferido do ATP para o carbono 1 da ribose 5-fosfato. Na via *de salvação*, o PRPP é utilizado para reciclar as bases purínicas em uma reação com menos gasto de energia do que as reações da via *de novo*. Os ácidos nucléicos e os nucleotídeos sofrem degradação hidrolítica, liberando as bases purínicas que se ligam à porção da ribose fosfato do PRPP para formar o nucleotídeo correspondente. A enzima adenina fosforribosil transferase, em presença de adenina e PRPP, catalisa a formação de adenina 5' monofosfato (AMP), e a enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferase (HGPRT), em presença de PRPP e

hipoxantina ou guanina, catalisa a formação de inosina 5' monofosfato (IMP) e guanina 5' monofosfato (GMP), respectivamente (BECERRA; LAZCANO, 1998; KEOUGH et al., 2005). A enzima hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT), da via *de salvação*, catalisa a transferência da fosforibose de PRPP para a posição 9 da hipoxantina ou da guanina. Essa enzima possui 217 resíduos de aminoácidos e é expressa em baixos níveis em todos os tecidos, apresentando-se em altos níveis apenas no cérebro (OGASAWARA, 1996), como pode ser observado na Figura 1.

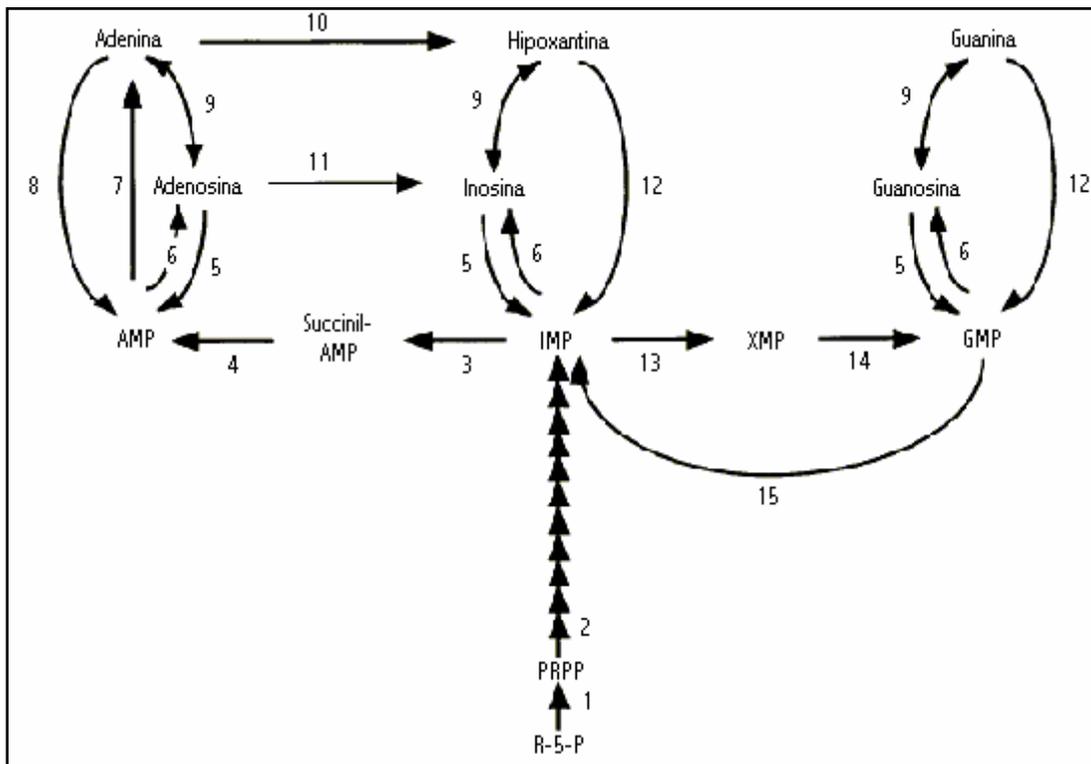


Figura 1. Mapa metabólico da via *de novo* e de salvação da síntese de purina, nucleotídeos, nucleosídeos e bases nitrogenadas. 1. PRPP sintetase; 2. PRPP amidotransferase; 3. succinil-AMP sintetase; 4. succinil-AMP liase; 5. guanosina-inosina quinase; 6. 5' nucleotidase; 7. AMP glicosilase; 8. adenina fosforibosiltransferase; 9. purina nucleosídeo fosforilase; 10. adenina deaminase; 11. adenosina deaminase (ADA); 12. HPRT e guanina fosforibosiltransferase (GPRT); 13. IMP desidrogenase; 14. GMP sintetase; 15. GMP redutase; XMP, xantosina 5' monofosfato.

Fonte: Modificada de Matsui et al. (2001).

A via *de novo* é regulada pela formação de 5-fosforribosilamina a partir de PRPP e de glutamina e esta reação, demonstrada na Figura 2, é catalisada pela enzima glutamina PRPP amidotransferase. Após a formação de 5-fosforribosilamina, o anel purínico é montado sobre a ribose fosfato. O último átomo do anel purínico é

fornevido pelo N¹⁰-formil-tetra-hidrofolato (N¹⁰-formil THF) formando o 5-formamidoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo (CRF). Em seguida, esse composto sofre desidratação e ocorre o fechamento do anel purínico formando IMP, que contém o anel purínico completo (MURRAY et al., 2000). Em seres humanos, os genes ou ácidos desoxirribonucleícos complementares (cDNAs) de todas as enzimas envolvidas na via *de novo* foram isolados (PATTERSON et al., 1999).

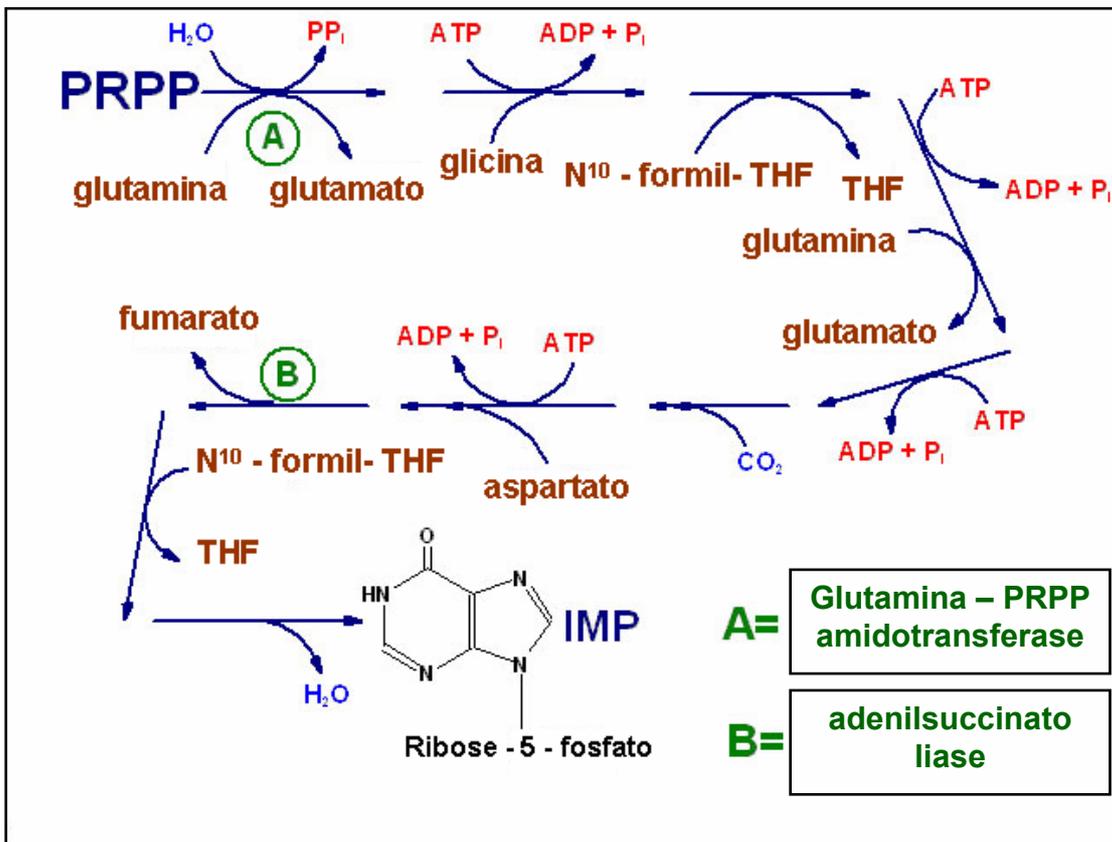


Figura 2. Via *de novo* do metabolismo das purinas.

Fonte: King (2003).

O IMP é o precursor do AMP e do GMP, e os três são retroinibidores da biossíntese de nucleotídeos purínicos, pois inibem a enzima 5-fosforribosil-1-fosfato sintase, regulando, assim, os níveis de PRPP.

A próxima etapa também é regulada por AMP, GMP e pela formação de ribonucleotídeos purínicos pela inibição da enzima glutamina PRPP amido transferase (MURRAY et al., 2000; BONSDORFF et al., 2004). O precursor imediato para a biossíntese da riboflavina é a guanina 5' trifosfato (GTP), formada na via das

purinas e responsável por vários mecanismos regulatórios em diferentes etapas da via (JIMENEZ et al., 2005). Quando em altos níveis, o IMP se liga à enzima HGPRT, promovendo sua inibição por *feedback* (CHEN et al., 2005).

A via de degradação das purinas continua quando o IMP perde a ribose fosfato e forma hipoxantina, a qual se transforma em xantina. A xantina sofre a ação irreversível da enzima denominada xantina oxidase (XO) e se transforma em ácido úrico, e este, em urato de sódio. O ácido úrico é um poderoso antioxidante e a sua forma ionizada, o urato monossódico, é a encontrada no plasma humano, no líquido extracelular e na sinóvia (AMES et al., 1981). A maior parte dos uratos é produzida no fígado e proveniente do desdobramento das proteínas endógenas e exógenas. A XO, quando ativa, promove a liberação de peróxido de hidrogênio, um radical livre, que contribui para a ocorrência de disfunção vascular em pacientes com hipertensão (WARING, MAXWELL, WEBB, 2002). A velocidade e a quantidade de ácido úrico formado a partir das purinas dependem da XO e, quanto maior a quantidade desta enzima, maior será a formação de ácido úrico.

A urato oxidase, também conhecida como uricase, é uma enzima de origem não humana que geralmente possui ligações de cobre capazes de catalisar a oxidação do urato (ácido úrico) em alantoína, um produto altamente solúvel no túbulo renal (LEHNINGER, NELSON, COX, 2000; CHU et al., 1996). Na evolução das espécies, o gene da uricase (*uox*) de seres humanos se tornou não funcional em decorrência das mutações que ocorreram, inicialmente no promotor e, depois, na região codificadora, embora o gene continue a ser transcrito no fígado (WU et al., 1992; ODA et al., 2002). A proteína uricase (UOX) é constituída por dois domínios contínuos de conformação em túnel (*T-fold*), que é uma estrutura pequena composta de uma β -sheet antiparalela e quatro fitas seqüenciais com um par de α -hélices antiparalelas entre a segunda e a terceira fita (COLLOC'H, MORNON, CAMADRO, 2002). A Figura 3 mostra a estrutura terciária da UOX de *A. flavus*.

Alguns animais, como aves, répteis e peixes, conservaram a uricase e conseguem oxidar o ácido úrico em alantoína, uma substância 80 a 100 vezes mais solúvel do que o ácido úrico e facilmente excretada pelo rim. Isso permite que esses animais tenham níveis muito baixos de ácido úrico e seus produtos de excreção sejam menos tóxicos do que a uréia, como nos peixes teleósteos, os quais excretam alantoína, e nos répteis terrestres e aves, que excretam urato (STRYER, 1992).

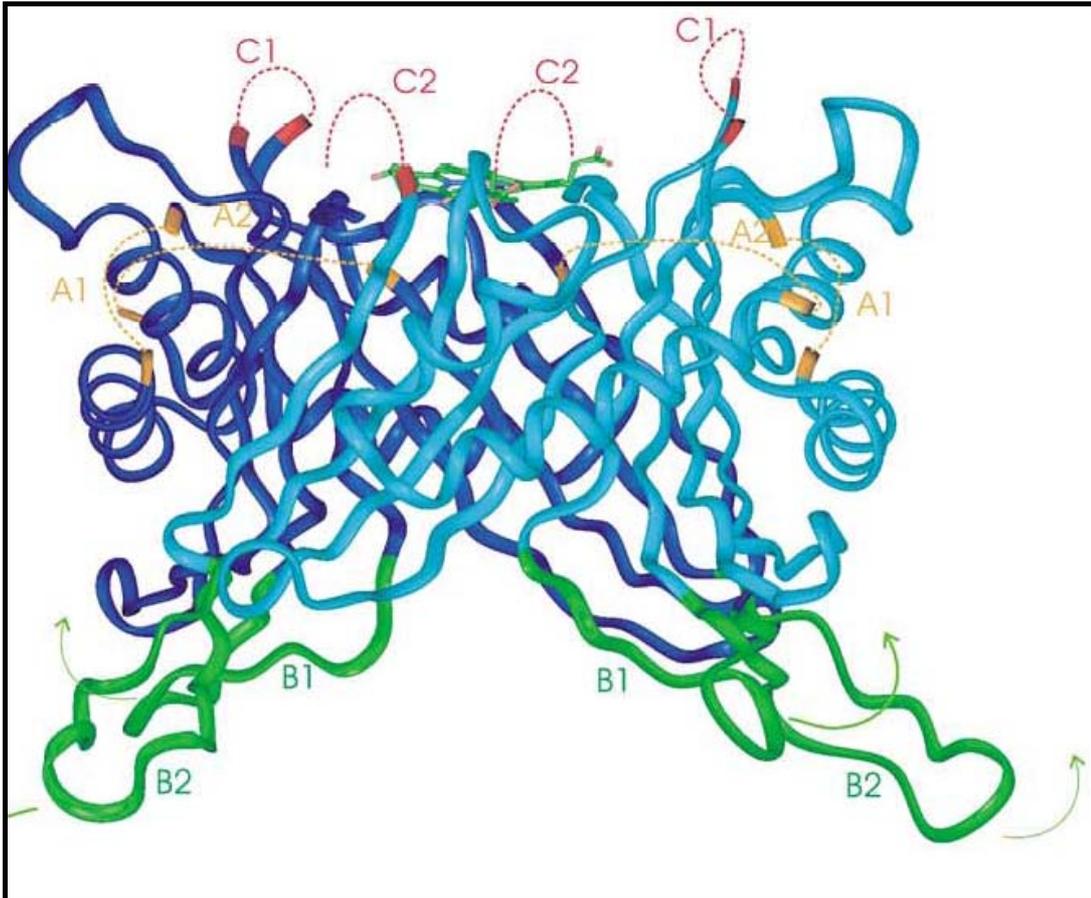


Figura 3. Estrutura terciária da enzima UOX de *A. flavus*.

Fonte: Colloc'h, Mornon, Camadro (2002).

A via de degradação das purinas em humanos termina quando há formação do ácido úrico, que é eliminado na urina. Nos seres humanos, à temperatura normal do corpo, o limite de solubilidade dos uratos é de 6,8 mg/dL, e estes se depositam com facilidade nas articulações periféricas, tais como joelhos, calcanhares e artelhos, cuja temperatura é mais baixa, provocando inflamações e a doença denominada gota (DINCER, DINCER, LEVINSON, 2002).

A gota é uma doença que afeta adultos entre 30 e 50 anos de idade e ocorre quando há altas concentrações de ácido úrico no sangue e nos tecidos, provocando inflamações nas articulações e nos rins em decorrência do depósito de cristais de urato de sódio. Essa condição patológica decorre de dieta com excesso de purina (dieta rica em carnes), degradação acelerada de ATP e/ou um problema enzimático por deficiência de hipoxantina guanina fosforiltransferase (HGPT) ou por hiperatividade da fosforribosilpirofosfato sintetase (PRPS) (LEHNINGER, NELSON,

COX, 2000). A doença pode se originar de baixa excreção renal do ácido úrico, causada por disfunção renal que iniba sua secreção pelos túbulos renais, devido à presença de ânions competitivos ou à reabsorção tubular aumentada de ácido úrico (BROGARD et al., 1972).

Atualmente, existem vários estudos sobre o uso de urato oxidase para a detecção da concentração de ácido úrico e para o tratamento de gota ou de hiperuricemia (LE TISSIER, PETERS, SKIDMORE, 1994; CALICETI, SCHIAVON, VERONESE, 1999; MULHBACHER, MCGEENEY, ISPAS-SZABO, 2002), doença que ocorre quando as taxas de ácido úrico encontram-se aumentadas.

As dosagens de ácido úrico no sangue e na urina de 24 horas são de grande valor para o diagnóstico das alterações do metabolismo desta substância. A coleta sangüínea adequada para detecção de ácido úrico requer jejum de pelo menos 4 horas antes do exame (GOCHMAN, SCHMITZ, 1971). Algumas substâncias ou medicamentos que podem alterar para mais o resultado do exame também devem ser suspensos, tais como: álcool, vitamina C, cafeína, diuréticos, teofilina e fenotiazidas. Índices de ácido úrico no sangue menores do que o real podem ocorrer quando são usados alopurinol, clofibratos, corticóides, estrógenos e anticoagulantes.

O ácido úrico é excretado pelo rim, bile e sucos intestinais. Por ser muito hidrossolúvel, o urato é facilmente eliminado pelo rim em quantidades entre 600 e 700 mg/dia quando há ingestão de dietas normais. Em um indivíduo normal, um terço do ácido úrico é degradado e excretado pelo intestino e dois terços pelo rim. Na falência de um rim, a degradação e a eliminação do ácido úrico pelo intestino são extremamente aumentadas.

3.2 Hipouricemia

A hipouricemia é uma síndrome clínica assintomática em que as concentrações de ácido úrico encontram-se inferiores a 2,5 mg/dL, e em cuja ocorrência há uma grande excreção de urato pela urina proveniente da deficiência de enzimas, como a XO e a purina nucleosídeo fosforilase (PNP), e do composto PRPP (IWAHANA, ITAKURA, 1996). A hipouricemia pode ser primária (permanente) ou adquirida (intermitente).

3.2.1 Hipouricemia primária

A hipouricemia primária ocorre em casos hereditários ou quando há grandes perdas de xantina pela urina (hiperxantinúria), o que diminui muito o substrato necessário para a transformação desta substância em ácido úrico, ocorrendo a diminuição deste último no sangue.

3.2.2 Hipouricemia adquirida

A urato oxidase catalisa a oxidação do ácido úrico em presença de oxigênio formando a alantoína (produto mais solúvel) e o peróxido de hidrogênio. A Figura 4 mostra a degradação do ácido úrico em alantoína, um produto mais solúvel e que é facilmente excretado na urina.

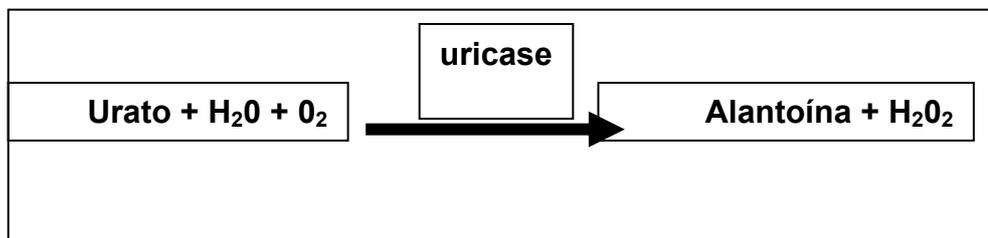


Figura 4. Reação de degradação do ácido úrico em alantoína pela enzima uricase.

A liberação de ácido úrico em grandes quantidades pela urina pode decorrer do uso de substâncias uricosúricas, como aspirina em altas doses, benziodarona, citrato, probenecida, ácido ascórbico, estrógenos, entre outras. O uso indiscriminado e não controlado de alopurinol (inibidor da ação da XO) provoca o tipo de hipouricemia denominado adquirida. O alopurinol é um análogo da xantina que inibe a enzima XO e possui propriedades antioxidantes, impedindo a transformação de hipoxantina e xantina em ácido úrico e promovendo a diminuição da concentração deste último composto (RICARDO, BERTRAM, RYAN, 1995).

3.3 Hiperuricemia

A hiperuricemia acontece quando a concentração de ácido úrico no plasma está acima de 6 mg/dL nas mulheres e acima de 7 mg/dL nos homens. A elevação de urato ocorre devido a: hiperatividade da PRPP sintetase, deficiência de HPRT e uso de diuréticos que promovem a deficiência da xantina dehidrogenase e da PNP (AKAOKA, KAMATANI, 1996). A hiperuricemia está relacionada a outras doenças, como: diabetes do tipo 2, em que os níveis elevados de ácido úrico aumentam a resistência dos tecidos à ação da insulina; aumento na progressão de nefropatias; e síndrome da lise tumoral (TLS) (MODAN et al., 1987; BO et al., 2001; KANG et al., 2002).

3.4 Urato oxidase

A urato oxidase foi originalmente isolada de mamíferos e, atualmente, o interesse sobre ela está voltado para as preparações oriundas de microrganismos, tais como fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Existem vários relatos sobre microrganismos produtores de urato oxidase, como *Micrococcus* (KIDA, KUNIHISA, 1996), *Brevibacterium* (KIDA, KUNIHISA, 1996), *Streptomyces* (WATANABE, FUKUMOTO, 1970), *Candida* (TANAKA et al., 1977), *Bacillus* (BONGAERTS, VOGELS, 1976) e *Aspergillus* (LEGOUX et al., 1992; CHEVALET et al., 1993).

A urato oxidase extraída e purificada da cepa industrial de *Aspergillus flavus* AF1734 é utilizada no tratamento de gota (CHEVALET et al., 1993). Em situações em que a gota está associada a complicações renais, a aplicação intravenosa da urato oxidase proporciona tratamento mais eficaz e rápido. A aplicação intravenosa também é utilizada para prevenir e resolver as desordens provocadas pela hiperuricemia que pode se manifestar durante os tratamentos quimioterápicos (PUI et al., 2001).

A urato oxidase não-recombinante obtida de *A. flavus* (PUI et al., 1997) é comercialmente conhecida como Uricozyme[®] (Sanofi-Synthelabo, Paris, França). Essa enzima é um tetrâmero com subunidades idênticas, que não são unidas por

pontes dissulfeto, e massa molecular de 34 kDa. O aminoácido N-terminal do monômero é um resíduo de serina N- α -acetilado (CONLEY, PRIEST, 1980; LEGOUX et al., 1992). Apesar de estar associada com o desenvolvimento de reações de hipersensibilidade aguda, mesmo em pacientes sem histórico de alergia, a Uricozyme[®] é um agente uricolítico mais efetivo do que o alopurinol (MASERA et al., 1982; MASSON et al., 1996).

Rasburicase[®] (Fasturtec[®]/Elitek[™]) é o nome comercial dado para a urato oxidase de *A. flavus* recombinante expressa em *Saccharomyces cerevisiae*. Bayol et al. (2002) realizaram um estudo comparativo com a Rasburicase[®] e a Uricozyme[®] e observaram que a primeira possui atividade específica maior e, por conseqüência, maior pureza do que a segunda. Isso é explicado por uma modificação que ocorre durante a purificação da Uricozyme[®], a qual forma Cys³⁵, uma ponte dissulfeto com resíduos de cisteína (Cys) livre.

Outro aspecto importante da Rasburicase[®] é que este medicamento, além de ser mais efetivo no tratamento de gota e hiperuricemia, resultou em incidência mais baixa de reações de hipersensibilidade (PUI et al., 2001; VOGT, 2005).

A Figura 5 mostra a ação da Rasburicase[®] e do alopurinol na via da purina.

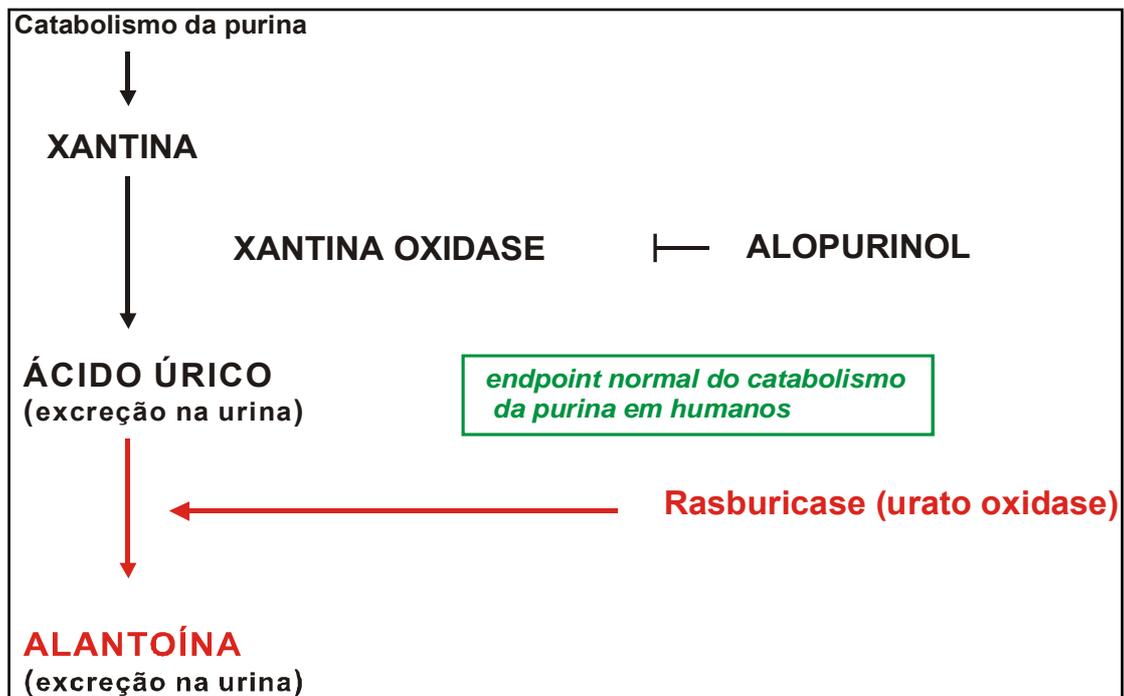


Figura 5. Via da purina. A Rasburicase[®] catalisa a oxidação do ácido úrico a alantoína.

Fonte: Vogt (2005).

3.4.1 Urato oxidase de *Bacillus*

Um aspecto interessante do *B. subtilis* é a presença do operon *pucJKLM*, responsável pela codificação de proteínas fundamentais para a entrada intracelular e a oxidação do ácido úrico. O alto grau de identidade entre a seqüência de aminoácidos das xantinas permease codificadas pelos genes *pucJ*, *pucK* e *pbuX* de *B. subtilis* é um forte indicativo de que estas proteínas estejam envolvidas no transporte do ácido úrico para o interior da bactéria (CHRISTIANSEN et al., 1997), uma vez que a proteína de membrana *PbuX*, um tipo de transportador, promove a difusão facilitada das bases de purina e pirimidina. Os genes *pucL* e *pucM* codificam funções requeridas para a atividade da uricase em *B. subtilis*. A proteína codificada pelo gene *pucL* tem 494 resíduos de aminoácidos e é homóloga a várias uricases. Há especulações de que a porção N-terminal dessa proteína possa representar uma peróxido redutase responsável pela remoção do peróxido de hidrogênio formado na oxidação do ácido úrico. Não se sabe ao certo a função da proteína codificada pelo gene *pucM* na oxidação do ácido úrico. Conforme Schultz, Nygaard, Saxild (2001), o gene *pucM* está envolvido na formação de alguns tipos de superestruturas, compreendendo os transportadores, a uricase e as subunidades da peróxido redutase, e a correta união dessas estruturas é necessária para a atividade da uricase do tipo selvagem.

A uricase de *B. subtilis* é também produzida comercialmente e utilizada como reagente em kits para a detecção da concentração de ácido úrico (ASANO et al., 1971). Esses kits se baseiam em ensaios bioquímicos utilizando a uricase pura e um sistema acoplado contendo peroxidase e indicadores [4-aminoantipirina (4-AAP) e o ácido (DCHBS)] (FRAISSE et al., 2002). O ácido úrico, obtido do plasma sangüíneo ou da urina do paciente, é adicionado a esse sistema, dando início a uma série de reações até a formação da quinoneimina (composto de cor avermelhada). Assim, quanto mais intensa for a coloração, maior é a concentração de ácido úrico no organismo do paciente. As Figuras 6 e 7 mostram a formação da quinoneimina.

Recentemente foi desenvolvido um sistema baseado em um *biochip* polimérico óptico no qual foram imobilizadas a uricase de *B. subtilis* e a peroxidase a fim de detectar a concentração de ácido úrico por intermédio de um fotossensor

contendo um metal óxido semiconductor complementar (CMOS) (HUANG et al., 2004).

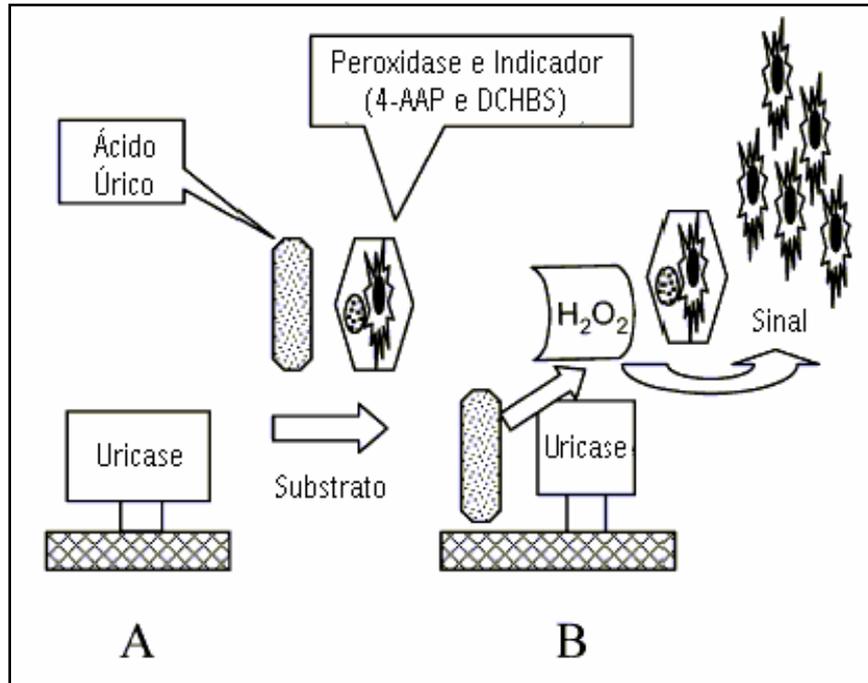


Figura 6. Ensaio colorimétrico baseado na formação da quinoneimina.

Fonte: Modificada de Huang e Wu (2004).

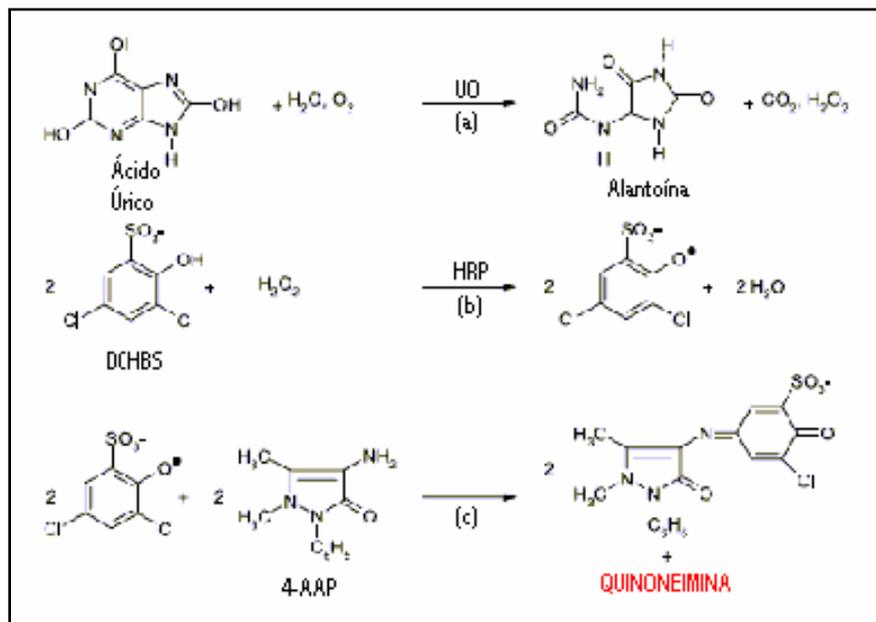


Figura 7. Esquema das reações ocorridas na formação da quinoneimina.

Fonte: Modificada de Fraisse et al. (2002).

Outra uricase utilizada comercialmente é a codificada por um gene mutado de um *Bacillus* sp. termofílico (TB-90) e que apresentou alta atividade e termoestabilidade em vários valores de pH situados entre 6 e 9 (HUANG, WU, 2004). Esse gene foi clonado e seqüenciado (YAMAMOTO et al., 1996) e a seqüência completa do DNA do gene uao foi analisada, tendo sido observado que a *open read frame* é responsável pela codificação de 502 resíduos de aminoácidos (NISHIYA, HIBI, ODA, 2000).

4 METODOLOGIA

4.1 Meio de cultura, tampões de reação e soluções utilizados

4.1.1 Meio de cultura LB (pH 7,2)

Composição: extrato de levedura – 0,5% (p/v); peptona de caseína – 1,0% (p/v); NaCl – 1,0% (p/v). Ao meio sólido foram adicionados 1,5% (p/v) de ágar bacteriológico.

4.1.2 Tampões de reação

4.1.2.1 NEB 2 10X (New England Biolabs)

Tampão Tris-HCl (pH 7,9) 10 mM

MgCl₂ 10 mM

DTT 1 mM

4.1.2.2 Tampão da *Taq* DNA polimerase 10X (CENBIOT)

Tris-HCl (pH 8,3) 0,1 M

KCl 0,5 M

BSA 0,1% (p/v) (albumina sérica bovina)

4.1.2.3 Tampão da T4 DNA ligase 10X (Biolabs)

Tris-HCl (pH 7,5) 0,5 M

MgCl₂ 0,1 M

DTT 0,1 M

ATP 10 mM

BSA 25 µg/mL

4.1.2.4 Tampão "High Fidelity" PCR (Invitrogen™)

Tris-HCl (pH 8,3) 0,1 M

KCl 0,5 M

BSA 0,1% (p/v)

4.1.2.5 Tampão de lise

NaH₂PO₄ 0,05 M

NaCl 0,3 M

Imidazol 10 mM

Ajustar o pH para 8,0 usando NaOH.

4.1.2.6 Tampão de lavagem

NaH₂PO₄ 0,05 M

NaCl 0,3 M

Imidazol 20 mM

Ajustar o pH para 8,0 usando NaOH.

4.1.2.7 Tampão de eluição

NaH₂PO₄ 0,05 M

NaCl 0,3 M

Imidazol 0,25 mM

Ajustar o pH para 8,0 usando NaOH.

4.1.2.8 Tampão TEN

Tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5)

EDTA 10 mM

NaCl 0,1 M

4.1.2.9 Tampão de eletroforese TEB 10X (pH 8,2)

Trizma base 108 g/L

Ácido bórico 55 g/L

EDTA 30 g/L

4.1.2.10 Tampão de eletroforese TAE 10X (pH 8)

Trizma base 108 g/L

Ácido bórico 55 g/L

EDTA 30 g/L

4.1.2.11 Tampão de eletroforese SDS-PAGE 10X (gel de poliacrilamida desnaturante)

Trizma base 125 mM

SDS 0,5% (sulfato de sódio dodecil)

Glicina 0,96 M

4.1.2.12 Tampão de amostra 6X

Azul de bromofenol 0,25%

Sacarose em água 40% (p/v)

4.1.2.13 Tampão de amostra SDS-PAGE 2X (pH 6,8)

Tris-HCl 0,2 M

SDS 4%

β -mercaptoetanol 4%

Azul de bromofenol 0,1%

Glicerol 20% (v/v)

A solução foi estocada a -20°C em alíquotas de 1 mL.

4.1.2.14 Tampão TE

Tampão Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM

EDTA 20 mM

4.1.2.15 Tampão PBS 10X (salina tamponada com fosfato pH 7,4)

NaCl 137 mM

Na₂HPO₄ 7 mM

NaN₃ 0,02%

4.1.2.16 Tampão PBS-T (salina tamponada com fosfato-Tween pH 7,4)

Tampão PBS 1X

Tween 20 0,1% (v/v)

4.1.3 Soluções

4.1.3.1 dNTP

Mistura de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, na concentração de 8 a 10 mM cada.

4.1.3.2 RNase A (ribonuclease)

RNase A 0,01%

A RNase A foi dissolvida em água destilada e a solução foi incubada em água fervente por 20 min.

4.1.3.3 Ampicilina

Ampicilina 50 mg/mL (500X)

A solução foi dissolvida em água e esterilizada por filtração.

4.1.3.4 Cloranfenicol

Cloranfenicol 50 mg/mL (500X)

A solução foi dissolvida em etanol 100%.

4.1.3.5 Rifampicina

Rifampicina 50 mg/mL (500X)

A solução foi dissolvida em metanol 100%.

4.1.3.6 Brometo de etídeo (EtBr)

EtBr 10 mg/mL

A solução foi dissolvida em água.

4.1.3.7 X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo)

X-gal 20 mg/mL

A solução foi diluída em N,N dimetilformamida.

4.1.3.8 Solução de lise (pH 6,0)

EDTA 10 mM

NaCl 10 mM

SDS 1% (p/v)

4.1.3.9 Fenol saturado (pH 6,0)

Fenol

EDTA 10 mM

NaCl 10 mM

A solução foi incubada a 65°C por 10 min.

4.1.3.10 Clorofane (pH 6,0)

Fenol 1v

Clorofórmio 1v

β -hidroxiquinolina 0,05%

A solução foi equilibrada com tampão TEN.

4.1.3.11 Solução II

NaOH 0,2 M

SDS 1%

4.1.3.12 Solução III (pH 4,8-5,0)

Acetato de sódio 3 M

Ácido acético 2 M

4.1.3.13 SDS-PAGE 10%

Acrilamida/Bisacrilamida (29:1) 10%

Tris-HCl (pH 8,8) 375 mM

SDS 0,1%

APS 0,05%

Temed 0,05%

4.1.3.14 SDS-PAGE 12%

Acrilamida/Bisacrilamida (29:1) 12%

Tris-HCl (pH 8,8) 375 mM

SDS 0,1%

APS 0,05%

Temed 0,05%

4.1.3.15 SDS-PAGE 4%

Acrilamida/Bisacrilamida (29:1) 4%

Tris-HCl (pH 6,8) 125 mM

SDS 0,1%

APS 0,05%

TEMED 0,1%

4.1.3.16 Solução Corante SDS-PAGE

Metanol 40%

Ácido acético glacial 10%

Comassie blue 0,25%

4.1.3.17 Ponceau S 2X (Sigma)

Ponceau S 2%

Ácido tricloroacético 30%

Ácido sulfossalicílico 30%

4.1.3.18 Solução descorante SDS-PAGE

Metanol 40%

Ácido acético glacial 10%

4.1.3.19 Solução secadora SDS-PAGE

Metanol 30%

Glicerol 10%

4.1.3.20 Solução de transferência (pH 8,3)

Tris-HCl 48 mM

Glicina 39 mM

SDS 0,037%

Metanol 20%

4.1.3.21 Solução de Bradford

Coomassie Brilliant Blue G-250

Etanol 95%

Ácido fosfórico 85%

4.1.3.22 APB (tampão para fosfatase alcalina - pH 9,5)

Tris-HCl 0,1 M

NaCl 0,1 M

MgCl₂ 5 mM

4.1.3.23 Solução reveladora

APB 10 mL

BCIP 66 µL (fosfato de bromo cloroindolil)

NBT 33 µL (azul de nitro tetrazólio)

A diluição deve ser feita nesta ordem para evitar a formação de precipitado insolúvel.

4.1.3.24 Solução reagente (pH 8,0)

4-aminoantipirina 4mM

3,5 Dicloro 2mM

Peroxidase de Raiz Forte 2mM

Tampão Tris HCl 10mM

4.2 Linhagens de *B. subtilis* e *E. coli*

Todas as linhagens celulares empregadas nesta pesquisa, relacionadas no Quadro 1, foram estocadas a -80°C em meio LB (item 4.1.1) contendo 25% de glicerol.

Quadro 1. Linhagens e genótipos de *E. coli* utilizados no presente estudo.

Bactéria	Linhagem	Genótipo
<i>E. coli</i>	DH5 α	<i>EndA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>AlacU169</i> ($\phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$)
<i>E. coli</i>	BL21 DE3 λ pLysS	F <i>ompT hsdSB</i> (rB mB) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam) (WEINER; MODEL, 1994)
<i>E. coli</i>	BL21 – Códon Plus®-RIL	Cepa de clonagem geral, contendo o plasmídeo pRIL (<i>ileW</i> , <i>leuY</i> , <i>proL</i>) Stratagene, La Jolla, US
<i>E. coli</i>	C41 (DE3)	F <i>ompT gal hsdSB</i> (rB mB) <i>dcm lon</i> λ DE3 e uma mutação não caracterizada (STUDIER, 1991; MIROUX; WALKER, 1996)
<i>E. coli</i>	C43 (DE3)	F <i>ompT gal hsdSB</i> (rB mB) <i>dcm lon</i> λ DE3 e duas mutações não caracterizadas (MIROUX; WALKER, 1996)
<i>E. coli</i>	SURE	E 14 (<i>McrA</i>) Δ (<i>mcrCB</i> <i>hsdSMR</i> <i>mrr</i>) 171 <i>end A1</i> <i>supE44</i> <i>thi 1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> <i>recB</i> <i>recJ</i> <i>sbcC</i> <i>umuC</i> :: Tn5 (<i>kan</i> ^r) <i>uvr C</i> [F ⁻ <i>pro</i> AB <i>lacI</i> ^q Z Δ (M15 Tn10 (Tet ^r)] Stratagene, La Jolla, US
<i>B. subtilis subtilis</i>	LMD 69.3, também conhecida como 168 (ATCC 6051)	Linhagem selvagem

4.3 Primers

A seqüência dos *primers* desta pesquisa foi desenhada a partir do gene *pucLM* de *B. subtilis* (LMD 69.3 – ATCC 6051) presente no GeneBank (gi: 32468813). Dois *primers* foram sintetizados, PUCL5 e PUCL3 (Figura 8), que se anelam nas regiões 5' e 3' do gene *pucLM*, respectivamente (Figura 9). O *primer* PUCL5 contém o códon de iniciação e o sítio de restrição para *Bam*HI na extremidade 5'. Já o *primer* PUCL3 contém um sítio para *Xho*I, mas não possui o códon de terminação, uma vez que se desejava que a proteína produzida tivesse uma cauda His_{6x}, cuja seqüência seria fornecida pelo vetor de expressão pET21a.



Figura 8. *Primers* PUCL5 e PUCL3.

4.4 Marcadores de massa molecular

O marcador de massa molecular para DNA utilizado neste estudo foi o *1kb Ladder* (Invitrogen). Os marcadores de massa molecular para proteína empregados foram: *BenchMark™ Prestained Protein Ladder* (Invitrogen) e *SigmaMARKER™* (Sigma).

```

1 M F T M D D L N Q M D T Q T L T D T L G
1 ATGTTCACAATGGATGACCTGAACCAATGGACACACAAACTGACAGACACACTTGGC
  PUCL5
21 S I F E H S S W I A E R S A A L R P F S
61 TCTATTTTTGAACACTCTTCATGGATTGCGGAGAGATCCGCAGCACTACGGCCGTTTTCG

41 S L S D L H R K M T G I V K A A D R E T
121 TCCCTTTCTGATCTTCACCGCAAATGACTGGCATTGTAAAAGCTGCGGATCGCGAGACA

61 Q L D L I K K H P R L G T K K T M S D D
181 CAGCTTGATTTAATCAAAAAGCATCCCCGGCTCGGAACAAAGAAAACAATGAGCGATGAC

81 S V R E Q Q N A G L G K L E Q Q E Y E E
241 TCGGTACGAGAGCAGCAGAACGCAGGGCTCGGCAAATTAGAACAGCAGGAATACGAGGAG

101 F L M L N E H Y Y D R F G F P F I L A V
301 TTTCTCATGCTGAATGAACACTATTATGATCGCTTCGGCTTTCCTTTTATTTAGCGGTG

121 K G K T K Q D I H Q A L L A R L E S E R
361 AAGGAAAGACGAAACAGGACATTACCAAGCCCTGCTGGCAAGGCTTGAGAGCGAACGA

141 E T E F Q Q A L I E I Y R I A R F R L A
421 GAAACGGAGTTCAGCAGGCCCTTATAGAAATTTACCGAATCGCCCGCTTTCGTCTGGCT

161 D I I T E K G E T Q M K R T M S Y G K G
481 GACATCATCACTGAAAAAGGAGAGACGCAAATGAAAAGAACCATGTCTTATGGCAAAGGA

181 N V F A Y R T Y L K P L T G V K Q I P E
541 AATGTATTTGCATACCGAACGTATTTAAAACCGCTCACTGGAGTGAAGCAAATCCCGGAA

201 S S F A G R D N T V V G V D V T C E I G
601 TCATCTTTTGCCGGAAGAGATAATACCGTTGTCCGGCTTGATGTGACATGCGAAATTGGC

221 G E A F L P S F T D G D N T L V V A T D
661 GGAGAAGCCTTCTGCCATCATTTACAGACGGAGACAACACTCTCGTCGTGGCAACGGAT

241 S M K N F I Q R H L A S Y E G T T T E G
721 TCAATGAAAACTTTATCCAGCGCCATCTCGCATCTATGAAGGAACGACAACCGAGGGG

261 F L H Y V A H R F L D T Y S H M D T I T
781 TTCCTACACTATGTAGCTCACCGATTTTTAGATACCTATTCTCATATGGACACGATCACT

281 L T G E D I P F E A M P A Y E E K E L S
841 CTGACTGGCGAAGACATTCCGTTTGAAGCAATGCCTGCATACGAGGAGAAAGAGCTCAGC

301 T S R L V F R R S R N E R S R S V L K A
901 ACAAGCCGCTCGTCTTCAGAAGATCGCGTAATGAACGAAGCCGCTCTGTGCTGAAAGCA

321 E R S G N T I T I T E Q Y S E I M D L Q
961 GAACGAAGCGGAATACCATAACGATTACAGAGCAATACAGCGAAATCATGGATCTTCAG

341 L V K V S G N S F V G F I R D E Y T T L
1021 CTCGTCAAGGTGAGCGGCAACTCCTTCGTCCGGCTTCATCCGGGACGAATATACGACTCTC

361 P E D G N R P L F V Y L N I S W Q Y E N
1081 CCGGAAGACGGCAACCGCCCGCTGTTTGTCTATTTAAACATCAGCTGGCAATATGAAAT

381 T N D S Y A S D P A R Y V A A E Q V R D
1141 ACAAATGACTCATACGCTTCTGATCCAGCAGCTACGTTGCGGCTGAACAAGTCCGCGAC

401 L A S T V F H E L E T P S I Q N L I Y H
1201 TTAGCGAGCACCGTTTTTCACGAGCTCGAAACCCCTTCAATCCAAAACCTAATCTATCAT

421 I G C R I L A R F P Q L T D V S F Q S Q
1261 ATCGGCTGCAGAAATATTAGCGAGGTTCCCGCAGCTCACTGATGTCAGCTTCCAATCTCAA

441 N H T W D T V V E E I P G S K G K V Y T
1321 AATCACACGTGGGATACGGTTGTGCGAAGAAATCCCGGGCTCAAAGGAAAAGTCTACACC

461 E P R P P Y G F Q H F T V T R E D A E K
1381 GAACCGCGCCCGCATACGGTTTCCAACATTTACCGTGACAAGAGAAGACGCCGAGAAA

481 E K Q K A A E K C R S L K A -
1441 GAAAAACAGAAAGCCGCTGAAAAATGTCGGAGCCTGAAAGCCTGA
  PUCL3

```

Figura 9. Seqüência primária e tradução predita do gene *pucLM* de *B. subtilis*. Os nucleotídeos sublinhados correspondem à região de anelamento dos *primers* PUCL5e PUCL3.

4.5 Plasmídios

O vetor para a clonagem de produto da reação em cadeia da polimerase (PCR) (pGEM-T) e o vetor de expressão em *E. coli* (pET21a) estão representados nas Figuras 10 e 11, respectivamente. As células contendo os plasmídios recombinantes foram estocadas a -80°C em meio LB (Luria-Bertoni) com 25% de glicerol.

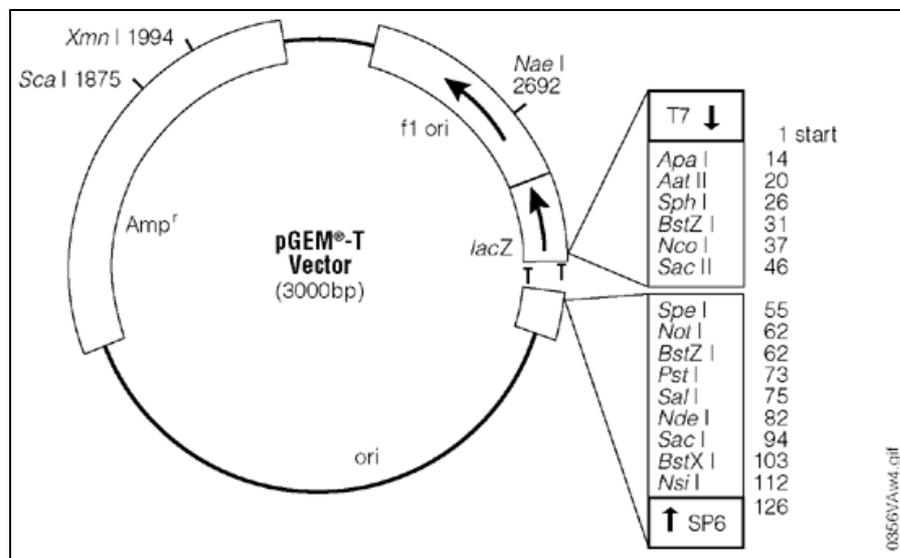


Figura 10. Mapa físico do vetor pGEM-T (Promega).

4.6 Ferramentas de bioinformática

A análise da seqüência do gene clonado foi feita usando o programa Blast-n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); para as análises de restrição foi empregado o programa NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>); a tradução predita do gene foi feita com os programas do pacote Molecular Toolkit (<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/index.html>); a massa molecular da proteína foi estimada pelo programa Protein Calculator v3.2 (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>); e a atividade enzimática foi calculada utilizando a fórmula matemática disponível no site da empresa Kikkoman (<http://www.kikkoman.co.jp/bio/e/common/rinsyou.html>).

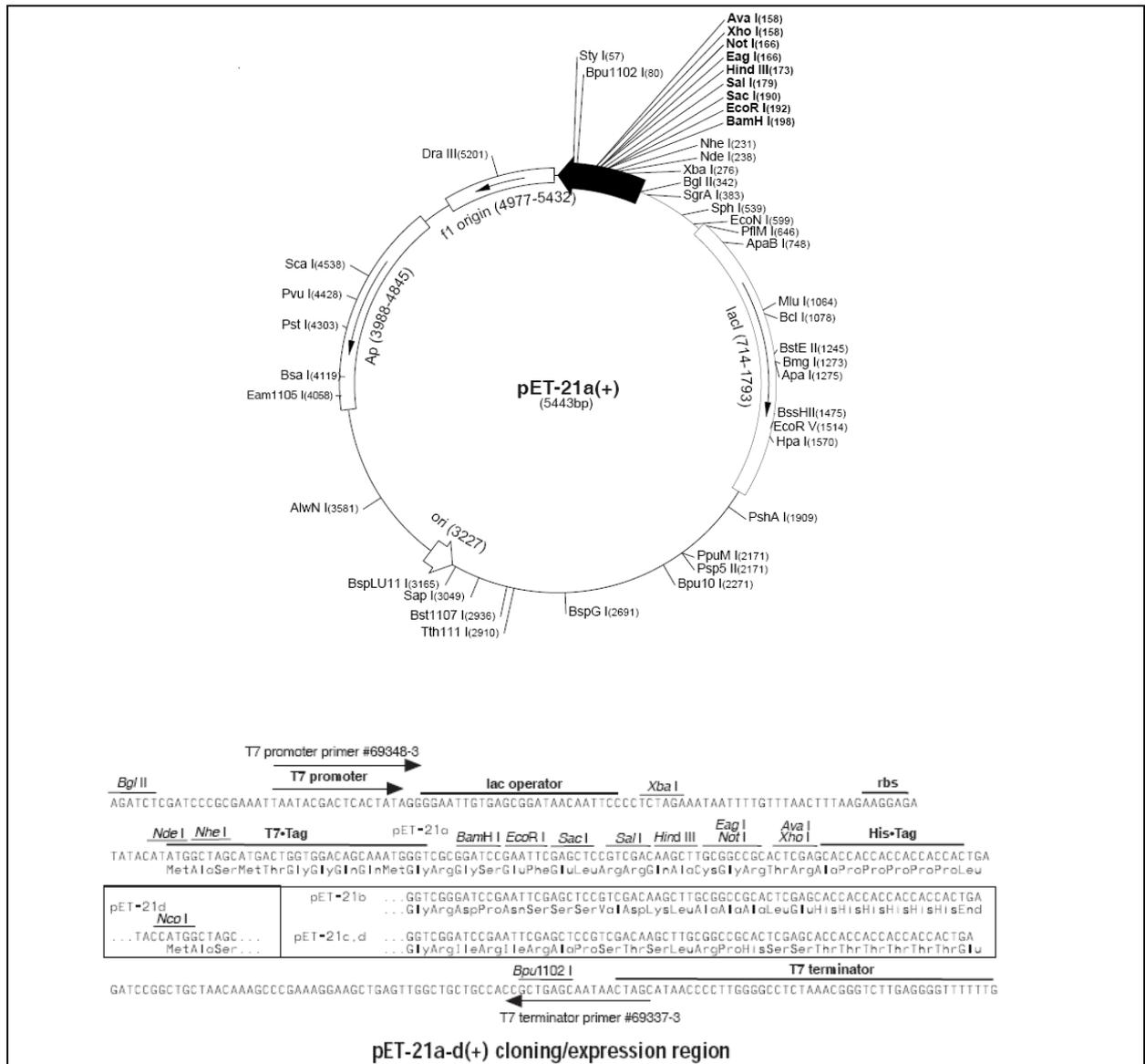


Figura 11. Mapa físico do vetor pET21a e região de múltipla clonagem.

4.7 Extração do DNA cromossomal de *B. subtilis*

No presente estudo, o DNA cromossomal de *B. subtilis* foi extraído de acordo com o protocolo de Marmur e Schildkraut (1961). A bactéria foi semeada em meio LB ágar e, após 24 h, uma colônia isolada foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL contendo 5 mL de meio LB. A seguir, 1 mL desse pré-inóculo foi transferido para um Erlenmeyer de 150 mL contendo 29 mL de meio LB e incubado a 37°C sob agitação (200-250 rpm) por 15 h. Foram coletados 15 mL do inóculo por

centrifugação (3.000 x g/10 min/4°C), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspenso em 5 mL de tampão TEN e novamente centrifugado (3.000 x g/10 min/4°C). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspenso em 2,5 mL de tampão TEN contendo 376 µL de lisozima (20 mg/mL), ao que se seguiu incubação a 37°C por 30 min.

Após a lise celular, foram adicionados 12,5 µL de RNase A (4 mg/mL) (item 4.1.3.2) e incubou-se por mais 15 min. A seguir, foi realizada uma incubação a 65°C por 1 h após a adição de 100 µL de SDS 20% e 25 µL de proteinase K (10 mg/mL). Em seguida, foi realizada extração de proteínas pela adição de 2,5 mL de fenol saturado seguindo-se homogeneização por inversão do tubo por 10 min e centrifugação a 2.000 rpm/10 min. A fase aquosa foi transferida para um outro tubo, seguindo-se uma extração com 2,5 mL de clorofane e outra com o mesmo volume de clorofil nas mesmas condições descritas anteriormente. A precipitação do DNA foi realizada ao se ajustar a concentração final de cloreto de sódio para 300 mM na fase aquosa e pela adição de 2,5 volumes de etanol 100% a -20°C.

O DNA cromossomal precipitado foi enrolado em um bastão de vidro por meio de movimentos circulares no sentido horário e, depois, lavado em etanol 70% gelado. O material foi deixado à temperatura ambiente até secar, após o que foi dissolvido em 1,5 mL de Tampão R. Após isolamento do DNA cromossomal, este foi quantificado em espectrofotômetro por leitura no comprimento de onda de 260 nm.

4.8 Análise do DNA em gel de agarose

O gel de agarose na concentração desejada foi feito em tampão TEB 0,5X ou TAE 1X. A solução de agarose foi aquecida até dissolver-se por completo e, a seguir, foi adicionado 0,5 µg/mL de EtBr. As amostras de DNA foram preparadas adicionando-se tampão de amostra em concentração final de 1X e aplicadas no gel. Em seguida, o gel foi submetido a eletroforese em tampão de corrida TEB 0,5X ou TAE 1X. A visualização dos ácidos nucléicos foi feita sob a luz ultravioleta (UV) de um transiluminador.

4.9 PCR

As condições da PCR utilizadas para a amplificação do gene da uricase com a *Taq* polimerase (Cenbiot) a volume final de 50 μ L são apresentadas na Tabela 1. Condições da PCR: 1) 94°C/1 min; 2) 50°C/45 s; 3) 72°C/1,5 min; 4) 72°C/5 min; 5) 4°C. Os passos 1, 2 e 3 foram repetidos 30 vezes.

Tabela 1. Condições da PCR utilizadas para a amplificação do gene da uricase com a *Taq* polimerase (Cenbiot).

Reagente	Volume (μ L)	Concentração final
Tampão (CENBIOT)	5	1X
dNTP 10 X	5	1X
Cloreto de magnésio 50 mM	2,5	2,5 mM
<i>Primers</i> 5 pmol/ μ L	2	10 pmol
DNA cromossomal (10 ng/ μ L)	1	10 ng
<i>Taq</i> polimerase (CENBIOT)	1	1 U

A PCR utilizando a *Taq* Platinum (Invitrogen) foi realizada com o mesmo material e na mesma concentração descritos acima a volume final de 50 μ L. As condições da PCR são apresentadas na Tabela 2. Condições da PCR: 1) 94°C/30 s; 2) 50°C/30 s; 3) 68°C/1,5 min; 4) 4°C. Os passos 1, 2 e 3 foram repetidos 30 vezes.

Para o cálculo do T_m foi utilizada a fórmula empírica: T_m (°C) = 4(G+C) + 2(A+T).

Tabela 2. Condições da PCR utilizadas para a amplificação do gene da uricase com a *Taq* Platinum (Invitrogen).

Reagente	Volume (μ L)	Concentração final
Tampão	5	1X
dNTP 10 mM	1	0,2 mM cada
Sulfato de magnésio 50 mM	2	2 mM
<i>Primers</i> 10 μ M cada	1	0,2 μ M cada
DNA cromossomal 10 ng/ μ L	0,5	5 ng
<i>Taq</i> Platinum (Invitrogen)	0,2	1 U

4.10 Purificação do produto de PCR

Para a remoção dos *primers* não incorporados, assim como do óleo mineral, os produtos de PCR foram purificados utilizando o *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN), seguindo-se as recomendações do fabricante. Foram adicionados 5 volumes de Tampão PBS (item 4.1.2.15) à reação de PCR, a qual foi colocada em uma coluna *QIAquick*, que é encaixada em um microtubo de 2 mL presente no *kit*, e a amostra foi centrifugada (13.000 rpm/45 s). O líquido eluído foi descartado e a coluna encaixada no mesmo microtubo. A coluna foi lavada com 750 μ L de Tampão TE (item 4.1.2.14) e centrifugada (13.000 rpm/45 s). O líquido eluído foi descartado e a coluna encaixada no mesmo microtubo, tendo sido o material centrifugado (13.000 rpm/1 min). A seguir, a coluna foi encaixada em tubo de 1,5mL e o DNA foi eluído com 30 μ L de água *Milli Q*.

4.11 Purificação do DNA plasmidial

O protocolo de extração de plasmídios de *E. coli* foi baseado na técnica de lise alcalina descrita por Birboim e Dolly (1979) com algumas modificações. Colônias individuais de *E. coli* foram incubadas em meio L (4-5 mL) com o antibiótico

ampicilina (100 µg/mL) a 37°C, sob agitação (200-250 rpm), durante 18 h. A cultura de células foi centrifugada (10.000 x g/2 min) e o sedimento foi, então, ressuspenso em 200 µL de TE. Em seguida, foram adicionados 360 µL de Solução II (item 4.1.3.11), invertendo-se gentilmente o tubo várias vezes e incubando-se à temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de Solução III (item 4.1.3.12), o tubo foi invertido gentilmente por várias vezes e incubado em gelo por 5 min. O material foi centrifugado (10.000 x g/5 min) e o sobrenadante transferido para um novo tubo ao qual foram adicionados 750 µL de isopropanol 100%, procedendo-se à centrifugação (10.000 x g/5 min). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 200 µL de TE. Foram adicionados 110 µL de acetato de amônia 7,5 M misturando-se vigorosamente. A solução foi centrifugada (10.000 x g/10 min) e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado por adição de 750 µL de etanol 100% e o sistema foi centrifugado (10.000 x g/5 min). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%, sendo novamente centrifugado (10.000 x g/2 min). O sobrenadante foi descartado e, após secagem a vácuo, o precipitado foi ressuspenso em 50 µL de TE e 0,5 µL de RNase A.

A purificação plasmidial também foi realizada utilizando-se o *QIAPrep Spin Mini Kit* (QIAGEN) seguindo-se as recomendações do fabricante quando era necessária maior pureza para seqüenciar o material.

4.12 Purificação do DNA plasmidial com fenol-clorofórmio

Colônias individuais de *E. coli* foram incubadas em 100 mL de meio L com o antibiótico ampicilina (100 µg/mL) e as células foram crescidas a 37°C, sob agitação (200-250 rpm), durante 20 h. A cultura celular foi centrifugada (5.000 x g/10 min) e o sedimento ressuspenso em 2 mL de TE. A seguir, foram adicionados 6 mL de Solução II preparada na hora, invertendo-se gentilmente o tubo várias vezes, o qual foi incubado por 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 6 mL de Solução III, o tubo foi invertido gentilmente por várias vezes e incubado em gelo por 10 min. O material foi centrifugado (10.000 x g/10 min) e o sobrenadante filtrado com gaze e transferido para um novo tubo ao qual foram adicionados 10 mL

de clorofane. Esse material foi centrifugado (2.000 rpm/10min), a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e, a seguir, foi adicionado um volume igual de isopropanol. O material foi homogeneizado gentilmente e centrifugado (10.000 x g/10 min). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 70% procedendo-se à centrifugação (10.000 x g/5 min). O sobrenadante foi descartado e, após secagem a vácuo, o precipitado foi ressuspensionado em 200 µL de TE e 20 µL de RNase A.

Para obter maior grau de purificação de DNA, 15 µg de solução plasmidial foram dissolvidos em 250 µL de água destilada e a este volume adicionaram-se 15 µL de EtBr e 140 µL de acetado de amônio 7,5 M. A solução foi homogeneizada e mantida fora da luz UV. A seguir, foram adicionados 420 µL de fenol-clorofórmio, o tubo foi invertido gentilmente várias vezes e foi realizada uma rápida centrifugação (12.000 x g/2 min). A fase aquosa foi removida para um tubo novo, foram adicionados 2 volumes de etanol 100%, incubando-se por 2 min à temperatura ambiente e, em seguida, o sistema foi submetido a centrifugação (12.000 x g/5 min). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com etanol 70% e centrifugado (12.000 x g/5min). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em tampão TE contendo RNase A.

4.13 Digestão do DNA com enzimas de restrição

Todas as digestões realizadas neste estudo foram feitas com as enzimas de restrição *XhoI* (Promega) e *BamHI* (Qbiogene), com tampão NEB2 e em presença de BSA, de acordo com as recomendações dos fabricantes. A concentração do material utilizado variou entre 500 ng e 5 µg e o sistema foi incubado em banho-maria a 37°C por 2-3 h.

O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% a 2% preparado com tampão TAE 1X, de acordo com o tamanho do fragmento a ser purificado. A região do gel que continha o fragmento de interesse foi cortada e submetida a purificação utilizando o *kit GeneClean* (Bio101), seguindo-se as recomendações do fabricante.

4.14 Sistema de ligação

Os sistemas de ligação foram feitos na proporção de 1:3 (vetor/inserto) para ligação de extremidades coesivas. O volume do sistema de ligação foi entre 10-20 μ L e a quantidade de T4 DNA ligase foi de 400 U. Nos ensaios de ligação utilizou-se enzima T4 DNA ligase proveniente da New England Biolabs Inc., que recomenda incubação a 16°C, e da Promega, que recomenda incubação a 4°C. O sistema foi incubado por 16-24 h.

4.15 Transformação de células de *E. coli*

As células da linhagem de *E. coli* foram inoculadas em 5 mL de meio LB e incubadas a 37°C, sob agitação (200-250 rpm), durante 16 h. Em seguida, 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 30 mL de meio LB e a cultura foi incubada a 37°C, sob agitação (200-250 rpm) até atingir a OD₆₀₀ de 0,2-0,3. As células foram coletadas por centrifugação (5.000 x g/10 min/4°C), o *pellet* ressuscitado em 10 mL de solução de cloreto de cálcio 100 mM e, novamente centrifugado (5.000 x g/10 min/4°C). As células foram ressuscitadas em 1 mL de solução de cloreto de cálcio 100 mM. As células DH5 α foram estocadas em presença de 15% de glicerol em alíquotas de 100 μ L a -80 °C e as células BL21 DE3 λ pLysS, BL21 [DE3] C41, BL21 [DE3] C43, BL21 [DE3] PRILL e SURE foram utilizadas logo após esse experimento em alíquotas de 50 μ L.

Foi adicionado às células competentes metade do volume do sistema de ligação e o sistema foi incubado em gelo por 30 min. O choque térmico foi realizado a 42°C por 90 s, adicionou-se 1mL de meio LB e, a seguir, foi feita incubação em banho-maria a 37°C por 1 h. Foram plaqueadas de 50-200 μ L de células transformadas em cada placa de Petri contendo meio LB-ágar acrescido de ampicilina (100 μ g/mL). Quando necessário, 40 μ L de uma solução de X-gal 2% foram espalhados na superfície das placas contendo LB-ágar.

4.16 Indução da expressão da enzima recombinante

Células de *E. coli* (BL21 DE3λ pLysS, BL21 [DE3] C41, BL21 [DE3] C43, BL21 [DE3] PRILL e SURE) contendo o vetor com o inserto (controle positivo) e outra sem o vetor (controle negativo) foram inoculadas em 50-100 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C, sob agitação (200-250 rpm), por 2 h. Coletou-se 1 mL da cultura (tempo de indução = 0) a 8.000 rpm/2 min, descartando-se o sobrenadante; o *pellet* foi ressuspendido em 50 µL de tampão de amostra 2X para proteína. Ao material restante foi adicionado isopropil-β-tiogalactosídeo (IPTG) 1 mM (item 4.1.3.24), seguindo-se incubação a 37°C, sob agitação (200-250 rpm), por 2 h. Foram coletadas amostras de 1 mL nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 min após a indução com IPTG. Essas amostras foram, então, coletadas e tratadas como descrito anteriormente.

O mesmo experimento de indução da expressão da enzima recombinante, citado acima, foi modificado com a adição de rifampicina na concentração final de 200 µg/mL depois de 25 min de indução. O material coletado e tratado da mesma forma citada acima foi comparado em SDS-PAGE com o material obtido sem a adição de rifampicina.

4.17 Análise de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

O gel de poliacrilamida foi preparado nas concentrações de 10% ou 12%. As amostras de proteínas foram preparadas adicionando-se tampão de amostra desnaturante (item 4.1.2.13) na concentração final de 1X, fervidas por 5 min e aplicadas no gel. Em seguida, o gel foi submetido a eletroforese a 120 V em tampão de corrida Tris-glicina com SDS 1X (item 4.1.2.11). No final da eletroforese, o gel foi corado com *Coomassie Blue* R-250 por 20 min e descorado com solução descorante (item 4.1.3.18) até as bandas de proteína ficarem nítidas.

4.18 Western Blot

Após a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi colocado em solução de transferência (item 4.1.3.20) por 15 min. Para a transferência foi empregado equipamento de transferência da Bio-Rad. Para a montagem foram colocados 6 papéis de filtro, uma membrana de nitrocelulose, o gel de poliacrilamida e mais 6 papéis de filtro, nesta ordem. Todo o material citado acima havia sido mergulhado anteriormente em tampão de transferência. A transferência foi realizada a 10 V por 30 min e a amperagem não excedeu $5,5 \text{ mA/cm}^2$. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com *Ponceau S* 1X e o gel transferido foi corado com *Coomassie Blue* R-250 e descorado com solução descorante. Marcaram-se na membrana de nitrocelulose as posições dos poços, do marcador de proteína e da proteína esperada e, em seguida, retirou-se o *Ponceau S* (item 4.1.3.17) com água destilada. A membrana foi lavada com PBS e bloqueada com *Blotto* (5 g de leite em pó diluído em PBS-T) a 16°C durante a noite. A membrana foi lavada três vezes com PBS-T por 5 min. Foi adicionado o anticorpo anti-His-tag conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) na diluição de 1:1.000, seguindo-se incubação à temperatura ambiente, sob agitação, por 2 h. Após esse período, a membrana foi lavada três vezes por 5 min com PBS e uma vez com APB (item 4.1.3.22). A solução reveladora (item 4.1.3.23) foi adicionada e, ao aparecer a proteína marcada com o anticorpo, a reação foi parada com água destilada.

4.19 Purificação da enzima recombinante

Após a expressão da enzima recombinante (item 4.16), foi realizada a purificação da uricase recombinante. Primeiramente, a purificação foi realizada em uma escala menor, seguindo o protocolo 14 (*The QIAexpressionist* – 06/2003) e, depois, em uma escala maior, de 100 mL, seguindo os protocolos 6, 8 e 11 (*The QIAexpressionist* – 07/1997).

Para a purificação em uma escala menor utilizou-se 1 mL de cultura induzida, que foi coletada (15.000 x g/1 min) e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspendido em 100 μL de tampão de lise (item 4.1.2.5) e foi adicionada lisozima

(1 mg/mL). O sistema foi incubado em gelo por 30 min e, em seguida, misturado vigorosamente, evitando-se a formação de bolhas, e centrifugado (15.000 x g/10 min). O sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 mL e foram adicionados 20 µL de resina de agarose ligada a níquel (Ni-NTA) (*slurry* 50%), misturando-se gentilmente por 30 min a 4°C. O material foi centrifugado (1.000 x g/10 s) e o sobrenadante transferido para um novo tubo. A resina foi lavada duas vezes com 100 µL de tampão de lavagem (item 4.1.2.6) e a proteína foi eluída três vezes com 20 µL de tampão de eluição (item 4.1.2.7).

Para a purificação em uma escala maior foram utilizados 100 mL de meio de cultura induzida por IPTG. A cultura foi coletada (4.000 x g/20 min/4°C), descartando-se o sobrenadante e o *pellet* foi armazenado a -80°C por 16 h. O *pellet* foi ressuscitado em 4 mL de tampão de lise contendo lisozima (1 mg/mL) e incubado por 30 min no gelo. Em seguida, o material foi submetido a sonicação com seis vezes pulsos de 10 s a 200-300 W, mantendo-se o sistema no gelo durante este procedimento. Em seguida, esse material foi aplicado em coluna cromatográfica, constituída por uma seringa hipodérmica de 5 mL contendo 1 mL de Ni-NTA (*slurry* 50%), já equilibrada com o tampão de lise a 4°C. O mesmo material foi aplicado através da resina por cinco vezes e, depois, coletado em microtubos de 1,5 mL. O tampão de lavagem foi adicionado à coluna de 1 mL em 1 mL, e cada amostra de 1 mL foi coletada separadamente em microtubo até volume final de eluição de 8 mL. Na etapa de eluição da enzima recombinante, o tampão de eluição (volume final de 4 mL) foi adicionado à coluna e 500 µL foram coletados separadamente em 4 microtubos.

As amostras obtidas após a cromatografia de Ni-NTA foram dialisadas contra água destilada, liofilizadas e ressuscitadas em 4 mL de tampão 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. Com esse material foi realizada cromatografia de troca iônica em coluna contendo 60 mL de resina Q-Sepharose com fluxo de 1,5 mL/1 min.

4.20 Determinação da atividade uricásica

O ensaio de atividade enzimática foi realizado com a incubação da enzima em tampão Tris HCl 10mM, pH 8,0 a 37° C por 15 min. Em seguida, foi adicionada a solução reagente (item 4.1.3.24) e realizada a leitura da absorbância em

espectrofotômetro de luz visível a 555 nm à temperatura ambiente por 5 min. Os ensaios foram realizados três vezes e em triplicata. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima que degrada 1,0 μmol de ácido úrico em 1 min à temperatura ambiente. Utilizou-se a fórmula matemática descrita em Kikkoman (<http://www.kikkoman.co.jp/bio/e/common/rinsyou.html>) para o cálculo da atividade enzimática, como segue:

$$U/\text{mL} = (\Delta A_s - \Delta A_o) \times 1 \text{ mL} \times F_d / 32,8 \times 0,5 \times (\text{volume da amostra})$$

sendo:

U = unidade enzimática;

ΔA_s = média da absorbância em presença da enzima uricase;

ΔA_o = média da absorbância em ausência da enzima uricase (branco);

32,8 = coeficiente de extinção molar da quinoneimina sob as condições do ensaio ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$);

Fd = fator de diluição;

1 mL = volume final do ensaio;

0,5 = fator baseado no fato de que 1 mol de peróxido de hidrogênio produz 0,5 de quinoneimina.

E, finalmente, o método de Bradford foi utilizado para a determinação da proteína (BRADFORD, 1976).

4.21 Seqüenciamento

O produto de PCR obtido com *Taq* Platinum foi seqüenciado automaticamente utilizando-se o *MegaBACE Dye Terminator kit* (GE Helthcare) e analisado em seqüenciador MegaBACE 1000 (GE Healthcare). A quantidade de amostra submetida ao seqüenciamento automático foi de 200 ng de DNA, utilizando-se 1 μL de solução de *primer* 5 pmol/mL (Anexo D). A análise da qualidade do seqüenciamento foi realizada pelos programas Phrad e Phred e a análise das seqüências foi realizada pela comparação com a seqüência depositada em banco de dados com o auxílio do programa Blast-n.

4.22 Espectrometria de massa

As amostras obtidas após a cromatografia de afinidade em resina de níquel (item 4.19) foram dialisadas em água destilada e liofilizadas.

A fração liofilizada obtida foi dissolvida em água nanopura, misturada em uma solução saturada de uma matriz constituída por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (1:3 = 2 μ L de amostra para cada 6 μ L de matriz), depositada em uma placa do tipo *Anchorchip* com 600 mm (0,5 μ L por *spot*) e posta para secar à temperatura ambiente. Os componentes tiveram suas massas moleculares exatas determinadas utilizando espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando calibração externa sob modo de operação linear (positivo) em frequência de 50 Hz.

5 RESULTADOS

5.1 Clonagem do gene da uricase de *B. subtilis*

Para clonar o gene *pucL*, que codifica a enzima uricase de *B. subtilis*, foi utilizada a técnica de PCR. Após isolamento de DNA cromossomal de *B. subtilis*, a concentração deste foi estimada em 3,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e a solução foi diluída para uma concentração de trabalho de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Para amplificação do gene da uricase foi realizada uma PCR com *primers* desenhados a partir da seqüência publicada do gene *pucL* de *B. subtilis*. Inicialmente, foi feita uma PCR com *Taq* polimerase obtendo-se um fragmento de $\sim 1,5$ kb (dados não mostrados), tamanho consistente com o gene *pucL*. Para reduzir a possibilidade de erros durante a PCR, o experimento foi repetido usando-se, desta vez, a DNA polimerase *Taq* Platinum (uma mistura de *Taq* polimerase e *Pfu* polimerase), uma enzima de alta fidelidade. Mais uma vez, foi obtido um fragmento de $\sim 1,5$ kb utilizado para os ensaios seguintes. A Figura 12 mostra o resultado desse experimento.

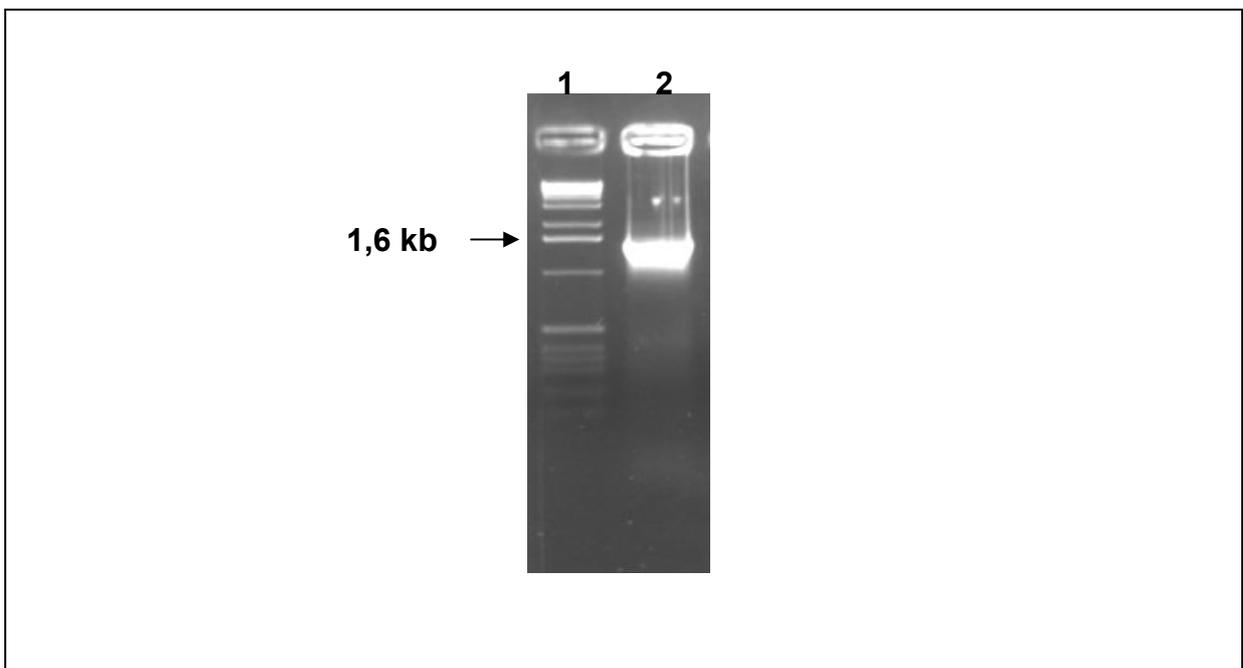


Figura 12. Análise em gel de agarose 0,8% do gene *pucL* amplificado por PCR utilizando *Taq* Platinum. 1) Marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen); 2) Gene da uricase amplificado ($\sim 1,5$ kb).

O produto de PCR foi purificado e, em seguida, ligado ao plasmídio pGEM-T, seguindo-se a transformação de *E. coli* DH5 α . A seguir, foi realizada uma *mini prep* de clones transformantes selecionados e os plasmídios obtidos foram submetidos a uma digestão com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I para verificar a presença do inserto de ~1,5 kb. Um dos plasmídios que continha o inserto de tamanho esperado foi selecionado (pGEMURI) para a continuação do trabalho (Figura 13).

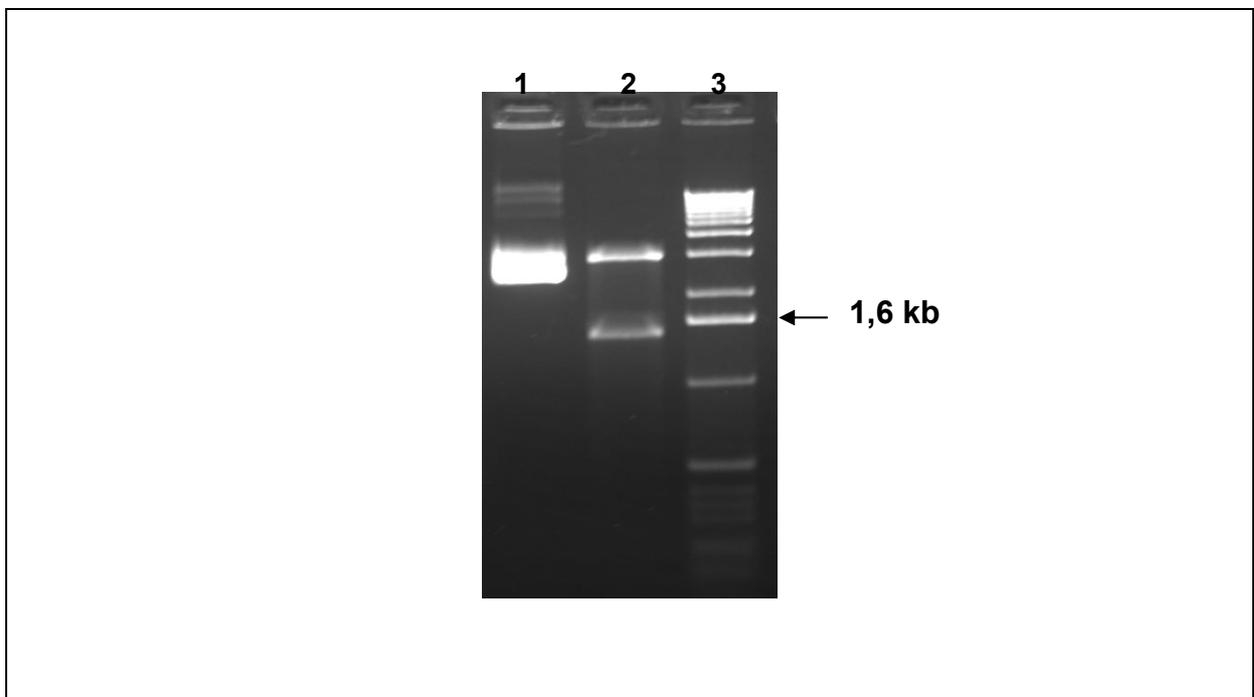


Figura 13. Análise de restrição em gel de agarose 0,8% do vetor pGEMURI. 1) pGEMURI intacto; 2) pGEMURI digerido com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I; 3) Marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen).

A clonagem do gene da uricase foi confirmada por seqüenciamento das extremidades do produto da PCR obtido com a *Taq* Platinum. Para o seqüenciamento foram utilizados os *primers* PUCL5 e PUCL3. As duas seqüências obtidas foram submetidas à análise Blast-n e o resultado foi uma alta identidade com o gene *pucLM* de *B. subtilis* (Figura 14).

```

gi|32468813|emb|Z99120.2|BSUB0017 Bacillus subtilis complete genome (section 17 of 21): from 3213330 to 3414388
Length = 201059

Score = 646 bits (326), Expect = 0.0
Identities = 382/390 (97%), Gaps = 8/390 (2%)
Strand = Plus / Plus

Query: 38  atgcggagagatccgcagcactacggccgtt-cgtcccttctgatctcacncgaca 96
          |||
Sbjct: 118943 atgcggagagatccgcagcactacggccgttctcgtcccttctgatctcac-cg-ca 119000

Query: 97  aaatgactggcattgtaaagctgcggatcgagacacagcttgatttaataaaaaagc 156
          |||
Sbjct: 119001 aaatgactggcattgtaaagctgcggatcgagacacagcttgatttaataaaaaagc 119060

Query: 157 atccccgtctcgtgaacaaacgaaacaatgacgcgatgactcggtagagagcagcag 216
          |||
Sbjct: 119061 atcccc-gctcg-gaacaaa-gaaaacaatga-gcgatgactcggtagagagcagcag 119116

Query: 217 aacgcaggctcggcaaatagAACAGCAGGAATACGAGGAGTTTCTCATGCTGAATGAA 276
          |||
Sbjct: 119117 aacgcaggctcggcaaatagAACAGCAGGAATACGAGGAGTTTCTCATGCTGAATGAA 119176

Query: 277 cactattatgatcgctcggcttctttatttagcgggaaagcgaacag 336
          |||
Sbjct: 119177 cactattatgatcgctcggcttctttatttagcgggaaagcgaacag 119236

Query: 337 gacattcaccaagaccctgctggcaaggctgagagcgaacgagaacggagttccagca 396
          |||
Sbjct: 119237 gacattcaccaag-ccctgctgcaaggctgagagcgaacgagaacggagttccagca 119295

Query: 397 ggccctatagaattaccgaatcgccc 426
          |||
Sbjct: 119296 ggccctatagaattaccgaatcgccc 119325

>gi|32468813|emb|Z99120.2|BSUB0017 Bacillus subtilis complete genome (section 17 of 21): from 3213330 to
3414388
Length = 201059

Score = 664 bits (335), Expect = 0.0
Identities = 335/335 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1  gaaacogtatggcggcgcggttcggtgtagactttctttgagccgggattcttc 60
          |||
Sbjct: 120262 gaaacogtatggcggcgcggttcggtgtagactttctttgagccgggattcttc 120203

Query: 61  gacaaccgtatcccagtgatttgagattggaagctgacatcagtgagctcgggaa 120
          |||
Sbjct: 120202 gacaaccgtatcccagtgatttgagattggaagctgacatcagtgagctcgggaa 120143

Query: 121 cctcgtaaatattctcagccgatgatagattaggtttggattgaaggggttcgag 180
          |||
Sbjct: 120142 cctcgtaaatattctcagccgatgatagattaggtttggattgaaggggttcgag 120083

Query: 181 ctctgtaaaaacggtgctcgtctaaagtcggactgtcagccgcaacgtagcgtgctgg 240
          |||
Sbjct: 120082 ctctgtaaaaacggtgctcgtctaaagtcggactgtcagccgcaacgtagcgtgctgg 120023

Query: 241 atcagaagcgtatgagtcattgtattcatattgccagctgatgttaaatagacaaa 300
          |||
Sbjct: 120022 atcagaagcgtatgagtcattgtattcatattgccagctgatgttaaatagacaaa 119963

Query: 301 cagcggcggttgcctctccgggagagtcgtat 335
          |||
Sbjct: 119962 cagcggcggttgcctctccgggagagtcgtat 119928

```

Figura 14. Resultado da análise Blast-n da seqüência do produto de PCR.

5.2 Expressão de uricase em *E. coli*

Para a expressão do gene da uricase em bactéria foi escolhido o vetor de expressão pET21a (Novagen), que foi amplificado em *E. coli* DH5 α . O vetor obtido foi submetido a duas digestões. A primeira foi realizada com a enzima de restrição *Xho*I (Promega) e a segunda, com a enzima de restrição *Bam*HI (Qbiogene). Após a confirmação da linearização do vetor, este foi eluído em gel de agarose 0,8%. Esse mesmo procedimento foi realizado para obter o fragmento de ~1,5 kb presente no vetor pGEMURI. Logo após, foi feito o sistema de ligação seguindo-se transformação de *E. coli* DH5 α por choque térmico. Quatro clones foram amplificados e submetidos a análises. Uma análise preliminar dos plasmídios intactos em gel de agarose revelou que os clones 1, 2, 3 e 5 poderiam ter o inserto devido a um retardamento eletroforético em comparação com o vetor pET21a intacto (clone 4), enquanto o clone 6 aparentemente não possuía inserto (Figura 15).

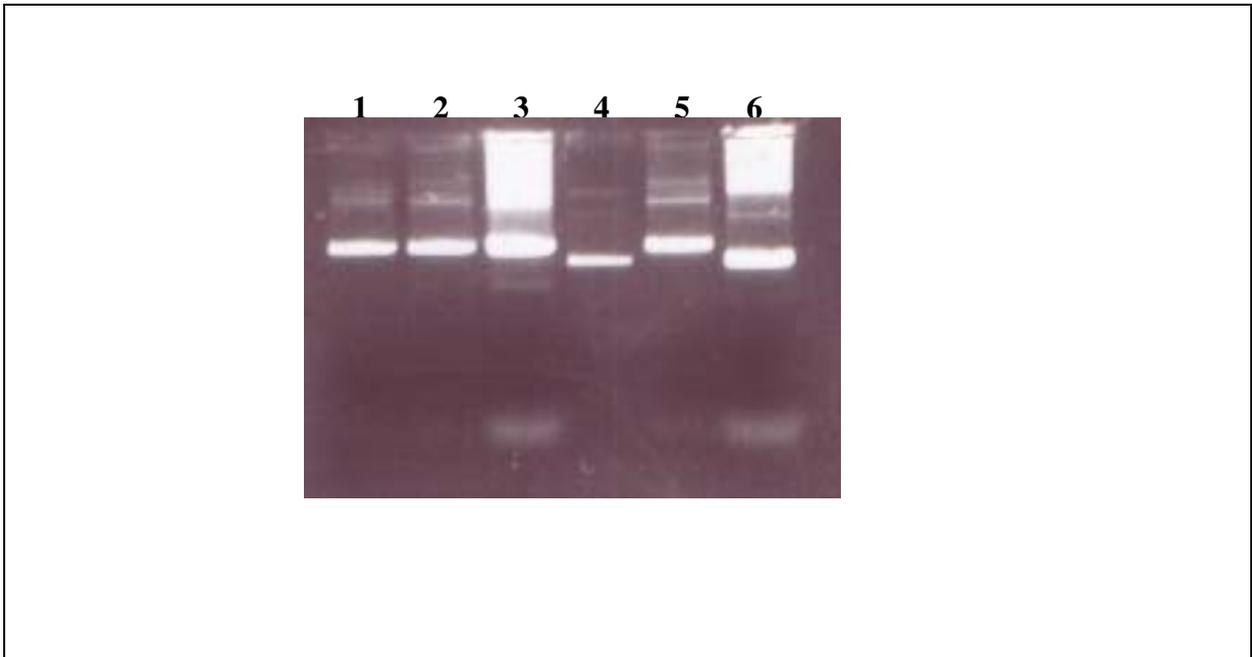


Figura 15. Análise em gel de agarose 0,8% de plasmídios isolados após transformação com sistema de ligação pET21a + gene *pucl*. 1) clone 1; 2) clone 2; 3) clone 3; 4) pET21a intacto; 5) clone 4; 6) clone 5.

Os clones 1, 2 e 5 foram submetidos a uma digestão com as enzimas de restrição *Xho*I e *Bam*HI e a presença do inserto foi confirmada pela liberação de fragmento de ~1,5 kb (dados não mostrados). A Figura 16 mostra a análise de restrição do clone 1, denominado pETURI, o qual foi selecionado para a continuação do trabalho.

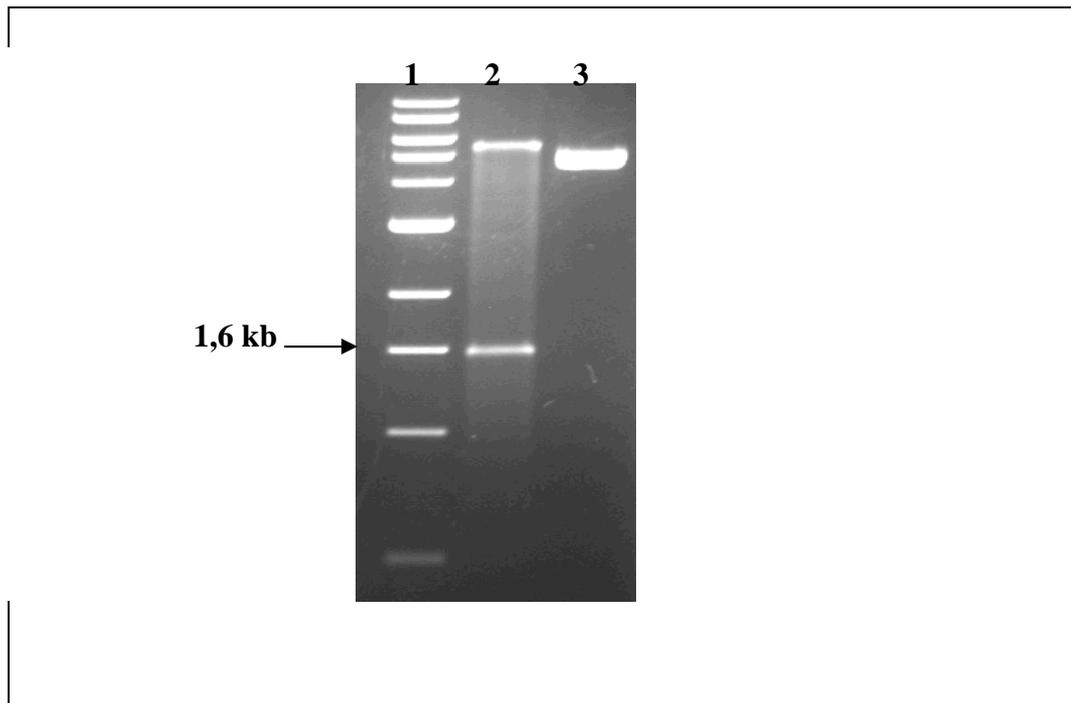


Figura 16. Análise de restrição em gel de agarose 0,8% do vetor pETURI. 1) 1 kb DNA Ladder (Invitrogen); 2) pETURI digerido com *Bam*HI e *Xho*I; 3) pETURI intacto.

O vetor pETURI foi usado para transformar as linhagens de *E. coli* BL21 DE3 λ pLysS, BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43, BL21 (DE3) PRILL e SURE. Colônias transformantes isoladas foram submetidas à análise de indução por adição de IPTG 1 mM. Amostras de culturas de células de *E. coli* BL21 DE3 λ pLysS contendo o vetor pETURI foram coletadas no tempo zero (antes da indução) e nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min após a indução. A Figura 17 mostra o resultado do ensaio de indução, podendo-se notar a presença de uma banda protéica de ~63 kDa que aumenta em intensidade após a indução com IPTG (a massa molecular teórica da proteína recombinante foi calculada em 58,9 kDa) (Figura 18).

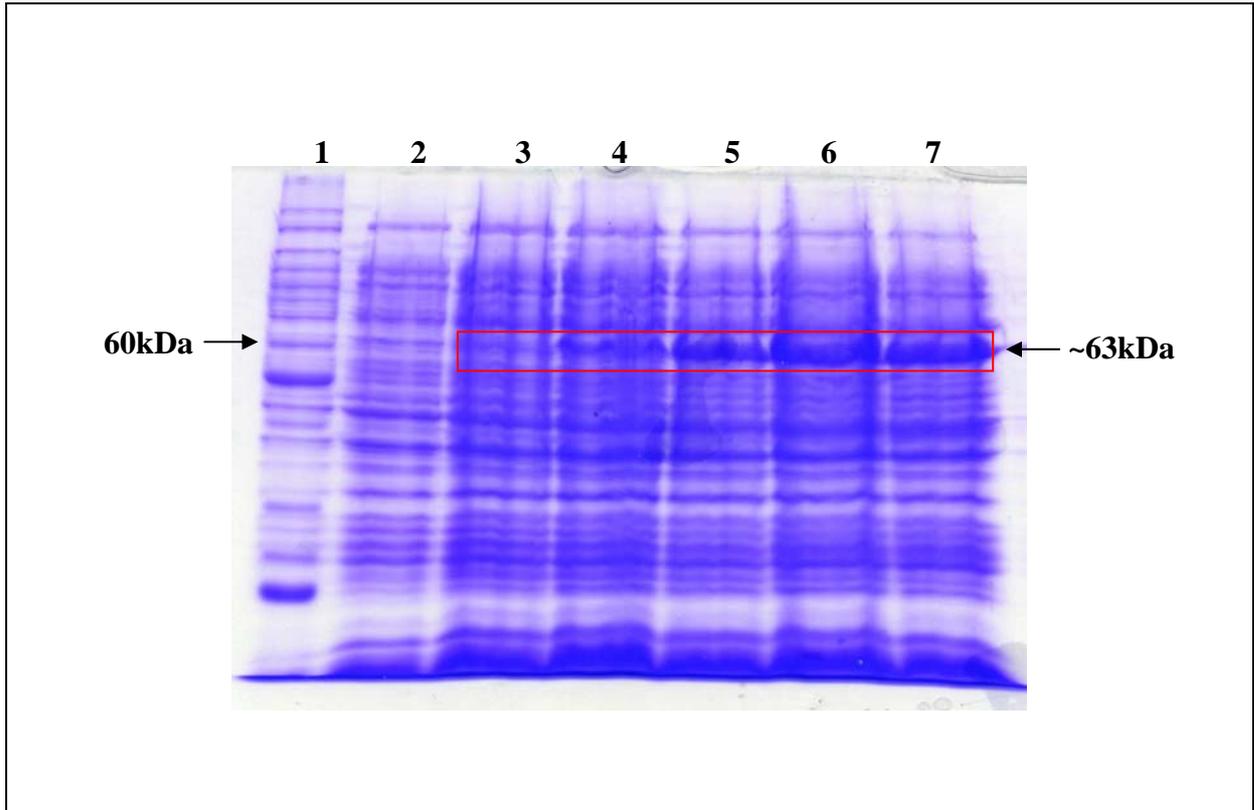


Figura 17. Análise em gel SDS-PAGE 12% da indução de expressão da uricase em *E. coli* BL21 DE3λ pLysS. Amostras de extrato de células expressando uricase foram coletadas em diversos tempos e analisadas em gel de poliácridamida 12%. 1) Marcador *BenchMarker* – Invitrogen. 2) t = 0; 3) t = 15 min; 4) t = 30 min; 5) t = 60 min; 6) t = 90 min; 7) t = 120 min.

MASMTGGQQM	GRGSMFTMDD	LNQMDTQTLT	DTLGSIFEHS	SWIAERSAAL	RPFSSLSDLH	60
RKMTGIVKAA	DRETQLDLIK	KHPRLGTKKT	MSDDSVREQQ	NAGLGKLEQQ	EYEEFLMLNE	120
HYYDRFGFPF	ILAVKGTKQ	DIHQALLARL	ESERETEFQQ	ALIEIYRIAR	FRLADIITEK	180
GETQMKRTMS	YGKGNVFAYR	TYLKPLTGVK	QIPSSFAGR	DNTVVGVDVT	CEIGGEAFLP	240
SFTDGDNTLV	VATDSMKNFI	QRHLASYEGT	TTEGFLHYVA	HREFLDYSHM	DTITLTGEDI	300
PFEAMPAYEE	KELSTSRLVF	RRSRNERSRS	VLKAERSGNT	ITITEQYSEI	MDLQLVKVSG	360
NSFVGFIRDE	YTTLPEDGNR	PLFVYLNISW	QYENTNDSYA	SDPARYVAE	QVRDLASTVF	420
HELETPSIQN	LIYHIGCRIL	ARFPQLTDVS	FQSQNHTWDT	VVEEIPGSKG	KVYTEPRPPY	480
GFQHFVTVRE	DAEKEKQKAA	EKCRSLKALG	HH HHHH			516

Massa molecular (Isotopically Averaged) = 58933,0547

pI estimado = 6,34

Carga estimada a pH 7,0 = -7,5

Figura 18. Seqüência teórica da enzima recombinante produzida em *E. coli*. Em preto, a seqüência da uricase codificada pelo gene *puL* de *B. subtilis*. Em vermelho, os resíduos de aminoácidos introduzidos à seqüência do gene *puL* após clonagem no vetor pET21a. As características da proteína indicadas abaixo da seqüência foram determinadas pelo programa Protein Calculator v3.2 (s. d.).

Nos ensaios de indução com as linhagens *E. coli* BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43, BL21 (DE3) PRILL e SURE, contendo o vetor pETURI, notou-se a presença de uma banda protéica de ~63 kDa que aumenta de intensidade após a indução com IPTG.

O ensaio de indução de expressão de uricase em *E. coli* BL21 DE3λ pLysS foi realizado com a adição de rifampicina na concentração final de 200 µg/mL na tentativa de diminuir a síntese protéica de proteínas intracelulares produzidas pela bactéria e, desta forma, facilitar a purificação da enzima recombinante. A Figura 19 mostra diminuição da banda protéica expressa, bem como das demais proteínas com a adição de rifampicina.

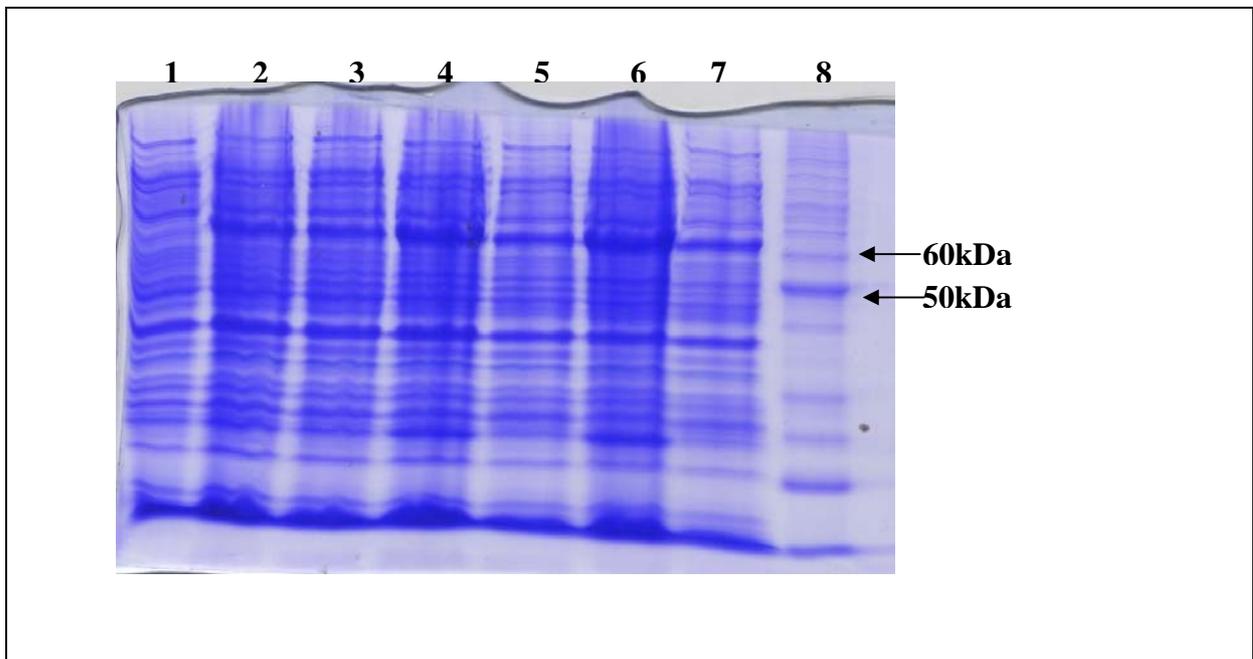


Figura 19. Comparação da indução de expressão da uricase em *E. coli* BL21 DE3λ pLysS sem e com a adição de rifampicina. Amostras de extrato de células expressando uricase foram coletadas em diversos pontos e analisadas em gel de poliácridamida 12%. 1) t = 0; 2) t = 60 min sem rifampicina; 3) t = 60 min com rifampicina; 4) t = 120 min sem rifampicina; 5) t = 120 min com rifampicina; 6) t = 180 min sem rifampicina; 7) t = 180 min com rifampicina; 8) Marcador *BenchMarker* – Invitrogen.

Para confirmar que a proteína de indução é específica para células contendo o vetor pETURI foi feita indução com células transformadas com o vetor pET21a. As amostras foram coletadas no tempo zero (antes da indução) e depois de 3 h de

indução. A Figura 20 mostra que a proteína de indução de ~63 kDa é específica em células transformadas com o vetor pETURI.

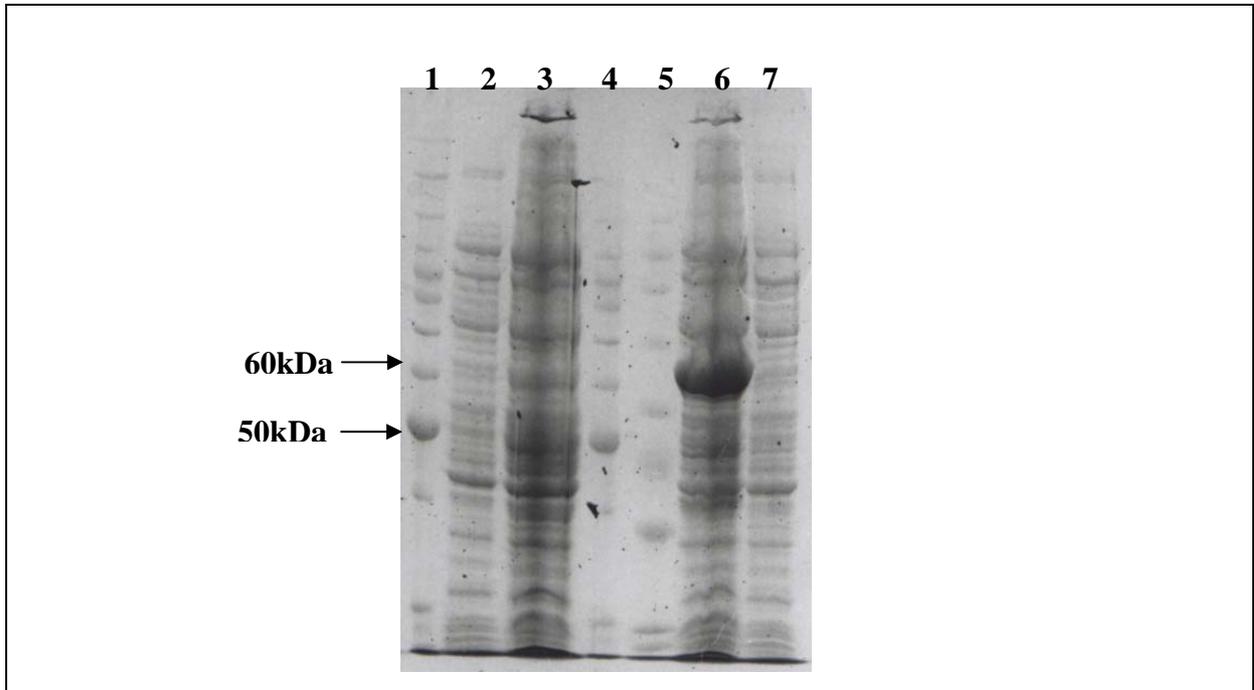


Figura 20. Análise em gel SDS-PAGE 10% do perfil protéico de células BL21 DE3λ pLysS transformadas com os vetores pET21a e pETURI e submetidas a indução com IPTG. 1) Marcador *BenchMarker*; 2) BL21/pET21a, t = 0; 3) BL21/pET21a, t = 3 h; 4) Marcador *BenchMarker*; 5) Marcador *SigmaMARKER™*; 6) BL21/pETURI, t = 3 h, 7) BL21/pETURI, t = 0.

A linhagem de *E. coli* BL21 DE3λ pLysS foi escolhida para os ensaios seguintes por produzir uma proteína recombinante estável e solúvel em grandes quantidades. Para confirmar que a banda de indução correspondia a uma espécie protéica contendo uma cauda de histidina (His-tag), foi realizado o ensaio de Western Blot com as amostras obtidas no ensaio de indução (Figura 17), utilizando-se o anticorpo anti-His-tag (Sigma). O resultado do Western Blot (Figura 21) revelou que o anticorpo foi capaz de reconhecer a principal proteína de indução de ~63 kDa e que outras espécies menores também foram reconhecidas.

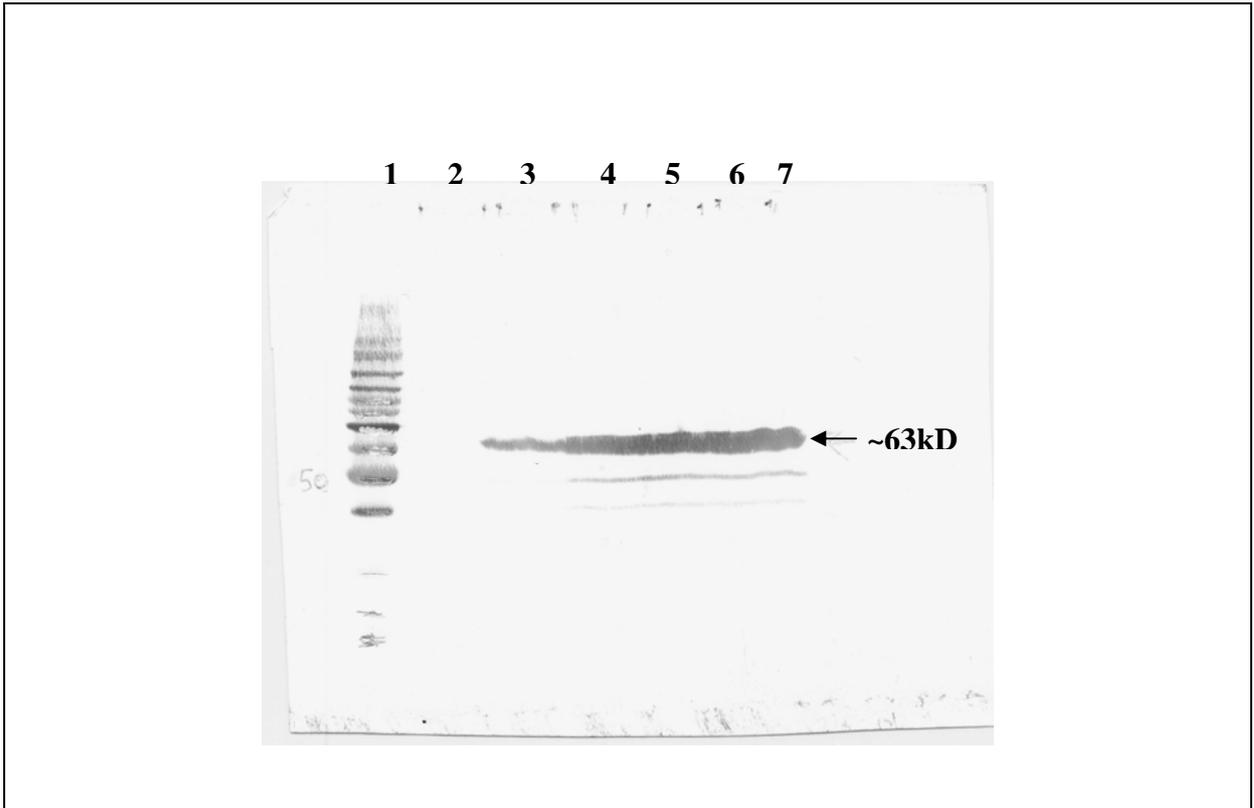


Figura 21. Western Blot de culturas de *E. coli* BL21 DE3 λ pLysS expressando uricase de *B. subtilis*. Extratos de células expressando uricase foram coletados em diversos tempos de indução e a proteína recombinante foi detectada com anticorpo anti-His-tag. 1) Marcador *Bench Marker*; 2) t = 0; 3) t = 15 min; 4) t = 30 min; 5) 60 min; 6) 90 min; 7) 120 min.

5.3 Purificação da enzima recombinante

A enzima recombinante obtida da cultura de *E. coli* BL21 DE3 λ pLysS foi submetida a uma primeira etapa de purificação em coluna contendo Ni-NTA. Para tanto, 100 mL de uma cultura de células induzidas com IPTG 1 mM por 3 h foram lisados e o sobrenadante foi aplicado na coluna de afinidade. Após lavagem, a enzima foi eluída com tampão de eluição contendo imidazol 200 mM. A Figura 22 mostra o perfil protéico das amostras coletadas da coluna Ni-NTA.

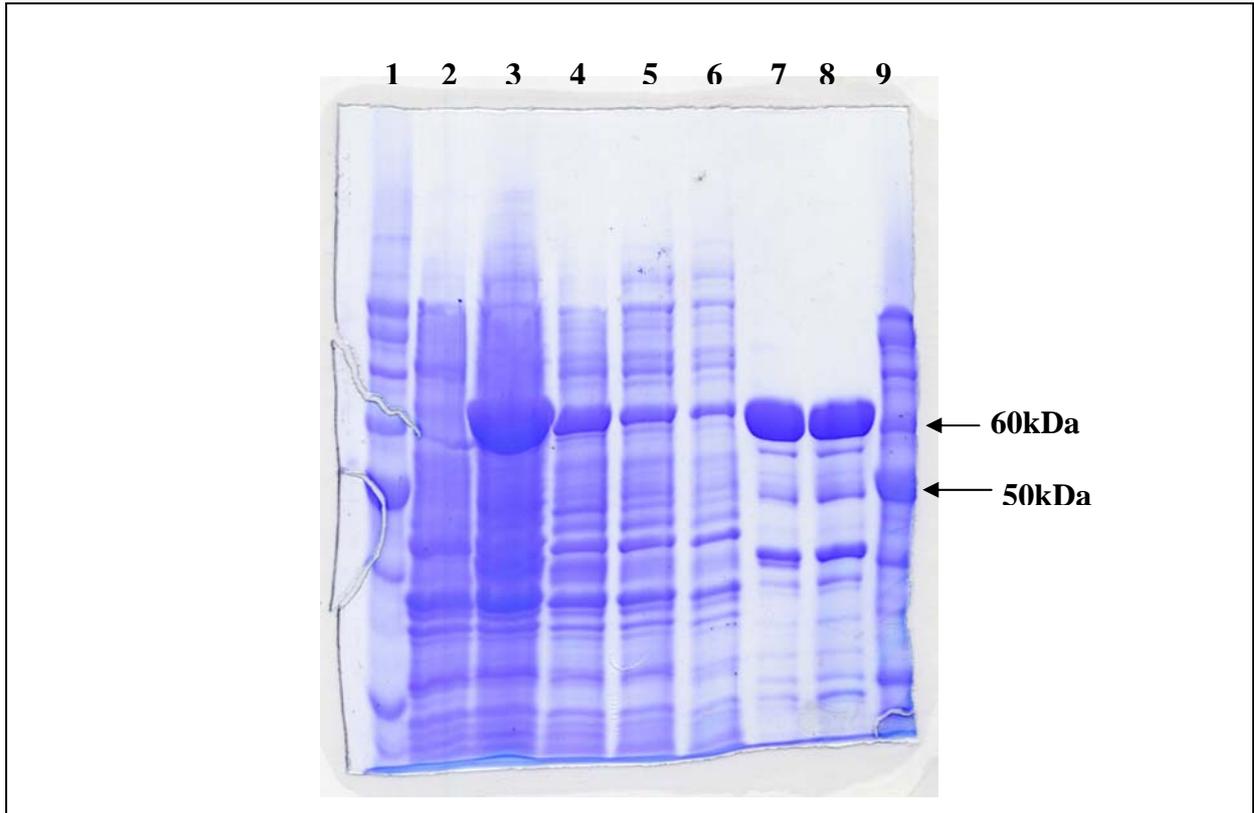


Figura 22. Análise em gel SDS-PAGE 12% das etapas de purificação da enzima recombinante em coluna de afinidade Ni-NTA. 1) Marcador *Bench Marker*; 2) Células antes da indução ($t = 0$); 3) Células após 3 h de indução; 4) Amostra do extrato celular antes da aplicação na coluna (*input*); 5) *Flow-thru*; 6) Lavagem; 7) Terceira fração de 500 μ L eluída com imidazol 200 mM; 8) Quarta fração de 500 μ L eluída com imidazol 200 mM; 9) Marcador *Bench Marker*.

A presença da proteína de indução foi detectada em todas as frações eluídas, embora sua maior concentração tivesse sido verificada nas frações eluídas com imidazol. Isso revela que houve saturação da coluna. Também foi verificada a presença de outras espécies protéicas menores do que 60 kDa, as quais poderiam ser produtos de degradação no N-terminal da proteína, pois o C-terminal contém o His-tag responsável pela interação com a coluna.

Nessa etapa de purificação parcial foi realizado o ensaio de atividade enzimática das amostras eluídas com imidazol 200 mM, obtendo-se atividade específica de 39 U/mg. Uma nova tentativa de purificação foi realizada com diferentes concentrações de imidazol presente no tampão de eluição, com a finalidade de reduzir a quantidade de espécies protéicas menores do que 60 kDa presentes na fração eluída. A eluição foi feita por *step gradiente* com concentrações crescentes de imidazol de 50, 100, 150 e 200 mM. A Figura 23 mostra a eluição da

proteína em todas as frações contendo diferentes concentrações de imidazol presente no tampão de eluição. A atividade enzimática também foi detectada em todas as frações citadas acima. Todavia, o *step gradiente* de imidazol não foi suficiente para otimizar a purificação devido à degradação enzimática.

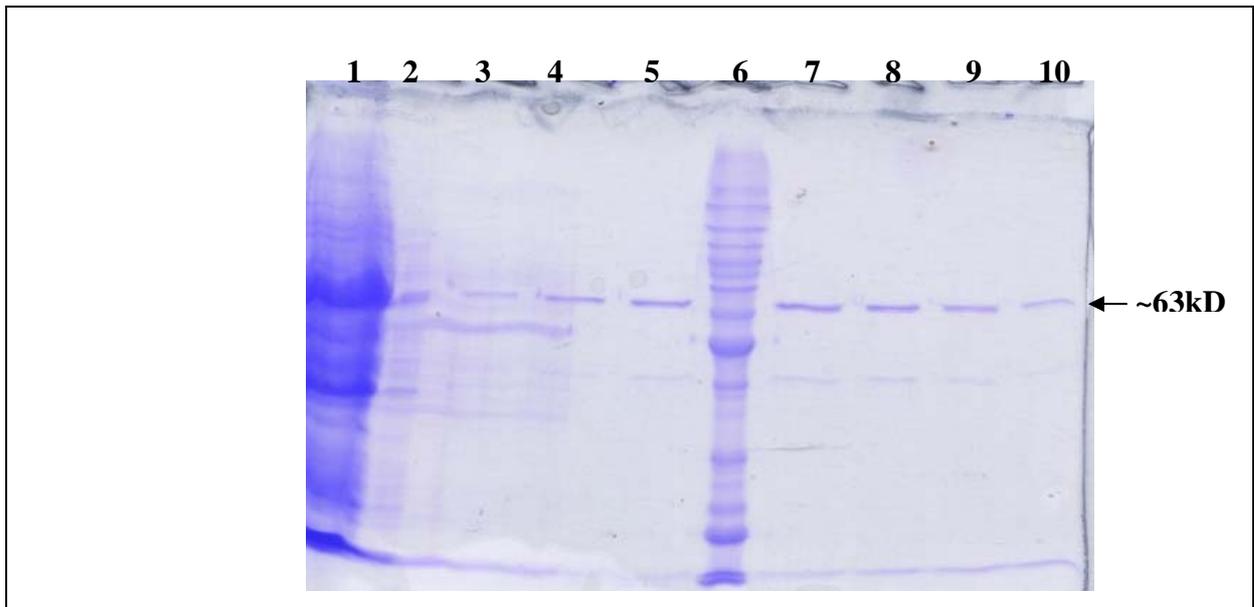


Figura 23. Análise em gel SDS-PAGE 12% das proteínas eluídas por *step gradiente* com o tampão de eluição contendo diferentes concentrações de imidazol (50, 100, 150 e 200 mM). 1) Amostras de células 3 h após indução; 2) Eluição com imidazol 50mM; 3) Eluição com imidazol 50mm; 4) Eluição com imidazol 100 mM; 5) Eluição com imidazol 100 M; 6) Marcador *Bench Marker*; 7) Eluição com imidazol 150 mM; 8) Eluição com imidazol 150 mM; 9) Eluição com imidazol 200 mM; 10) Eluição com imidazol 200 mM.

Uma nova etapa de purificação utilizando resina de troca iônica (Q-Sepharose) foi realizada com a amostra obtida após purificação em coluna contendo Ni-NTA na tentativa de melhorar a purificação da enzima uricase. Esse material foi dialisado, liofilizado e ressuspendido em tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,0 antes de ser aplicado na resina de troca iônica. A coluna continha 60 mL de resina Q-Sepharose e a cromatografia foi realizada em fluxo de 1 mL/min. A Figura 24 mostra o perfil protéico da amostra após a eluição da proteína de resina Q-Sepharose.

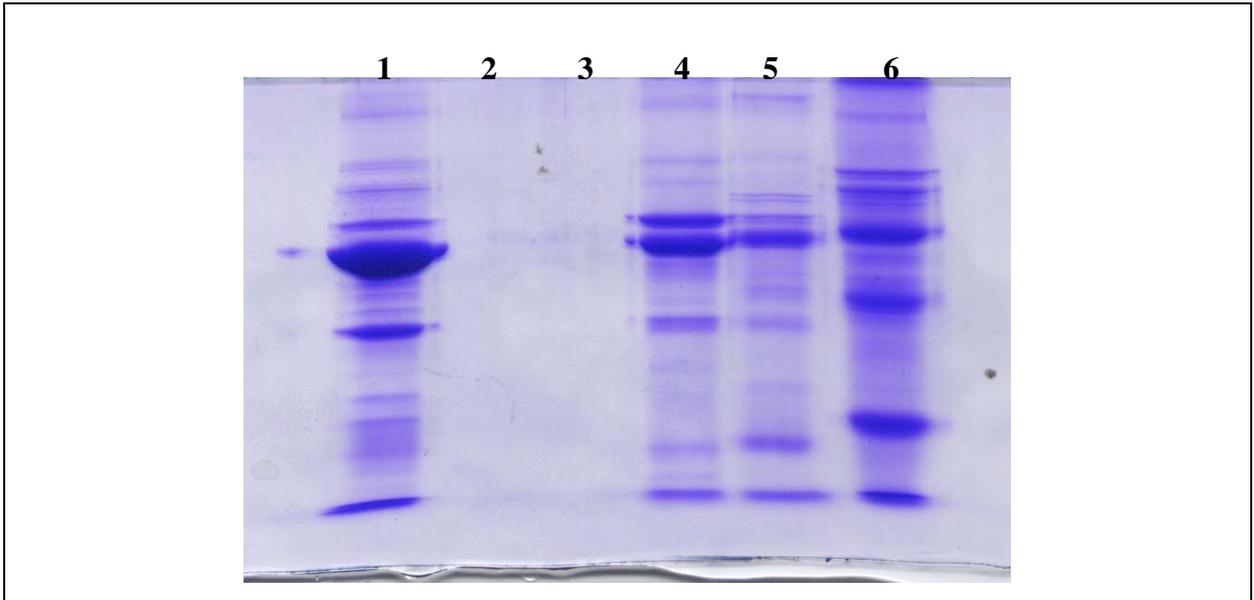


Figura 24. Análise das etapas de purificação da enzima recombinante em gel SDS-PAGE 12%. 1) Amostra aplicada na coluna – 4mL; 2) Lavagem da resina com 50 mL de tampão Tris-HCl, pH 8,0; 3) Lavagem da resina com mais 30 mL de tampão Tris –HCl, pH 8,0; 4) Amostra eluída da resina na concentração de 0,45 a 0,5M, dialisada, liofilizada e ressuspensa em 100µL de água destilada; 5) Amostra eluída da resina na concentração de 0,4-0,5M, dialisada, liofilizada e ressuspensa em 100µL de água destilada; 6) Marcador *SigmaMARKER*[™] (Sigma).

5.4 Caracterização da enzima recombinante

A espectrometria de massa foi realizada para se determinar a massa molecular precisa da enzima recombinante. O ensaio detectou a presença de um íon de massa molecular igual a 58,67 kDa, bem próxima daquela calculada a partir da seqüência obtida pelo seqüenciamento do gene da uricase amplificado por PCR do banco de dados, que é de 58,9 kDa. A Figura 25 mostra a detecção de um íon de massa molecular de 58,67 por espectrometria de massa com a amostra purificada por *step gradiente*.

O ensaio para a determinação do pH ótimo foi realizado utilizando os seguintes tampões na concentração final de 50 mM: citrato de sódio pH 2,5; citrato de sódio pH 3,0; acetato de sódio pH 4,5; acetato de sódio pH 5,0; fosfato de sódio pH 6,0; fosfato de sódio pH 7,0; Tris-HCl pH 8,0; Tris-HCl pH 9,0; e Tris-HCl pH 10,0. O ensaio enzimático foi realizado à temperatura ambiente, como descrito no item

4.20. A Figura 26 mostra que o pH ótimo da enzima recombinante é 8,0 e que a atividade é específica para este pH.

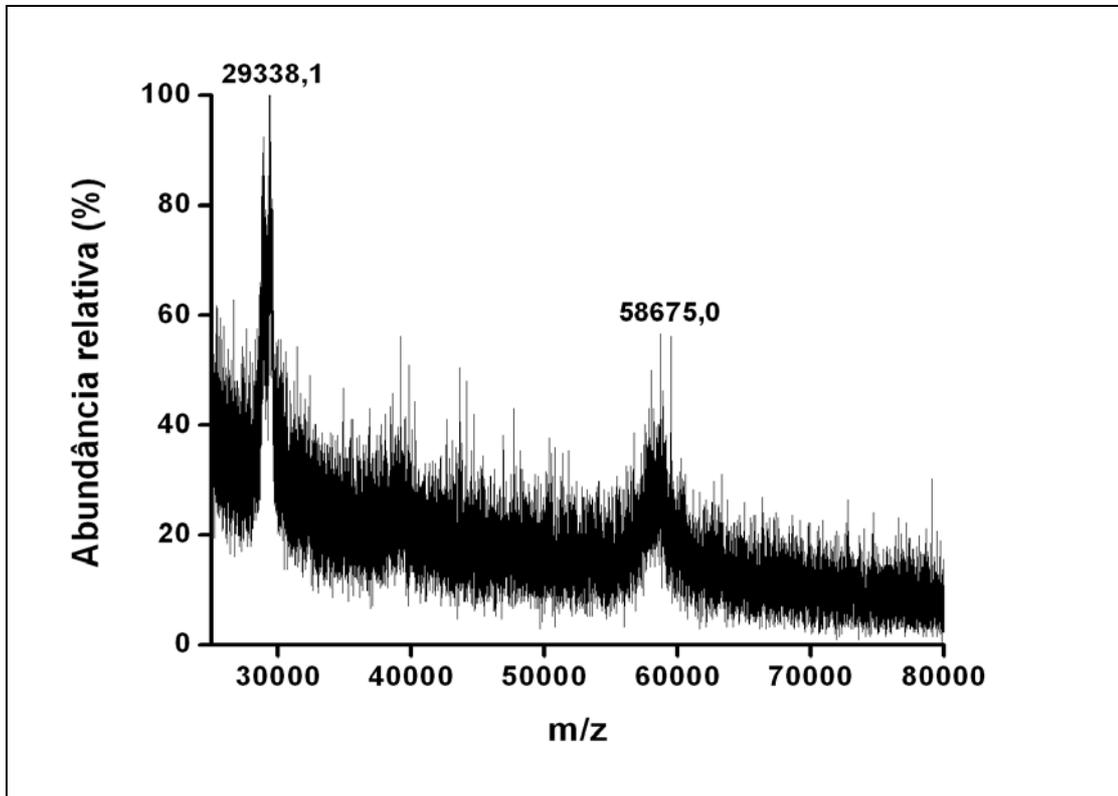


Figura 25. Espectrometria de massa. Detecção de um íon com massa molecular de 58,67 kDa.

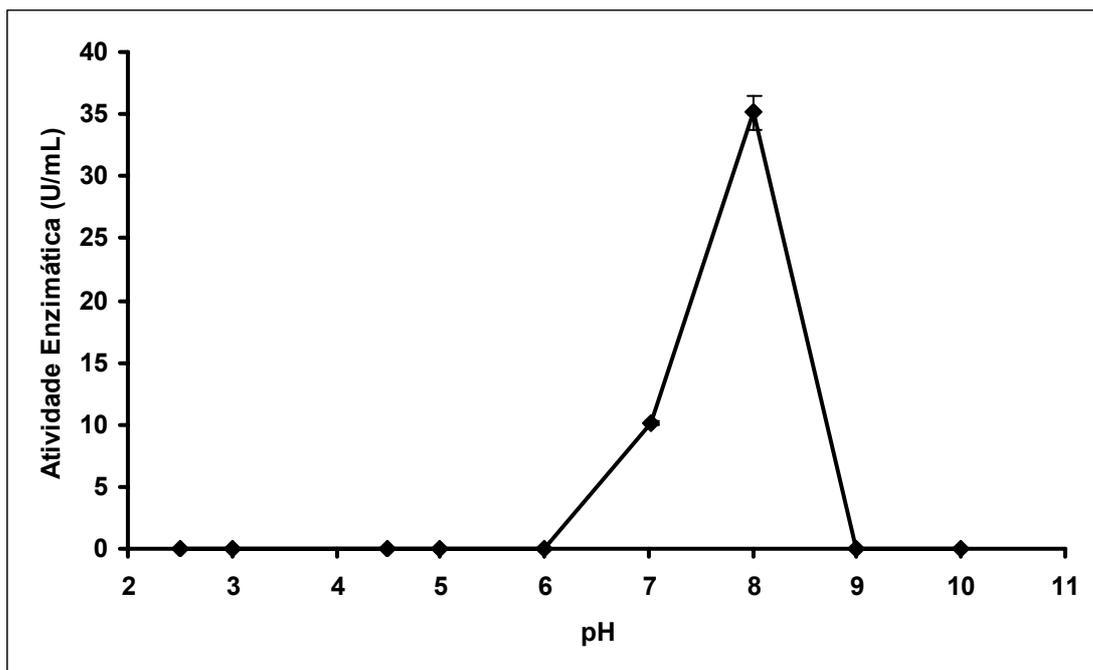


Figura 26. Determinação do pH ótimo da enzima recombinante.

O ensaio para a determinação da temperatura ótima foi realizado incubando-se a enzima por 30 min a diferentes temperaturas (4°C, 25°C, 37°C, 40°C, 60°C e 80°C) e, em seguida, foi determinada a atividade enzimática como citado no item 4.20. A Figura 27 mostra que a temperatura ótima da enzima recombinante é em torno de 37°C.

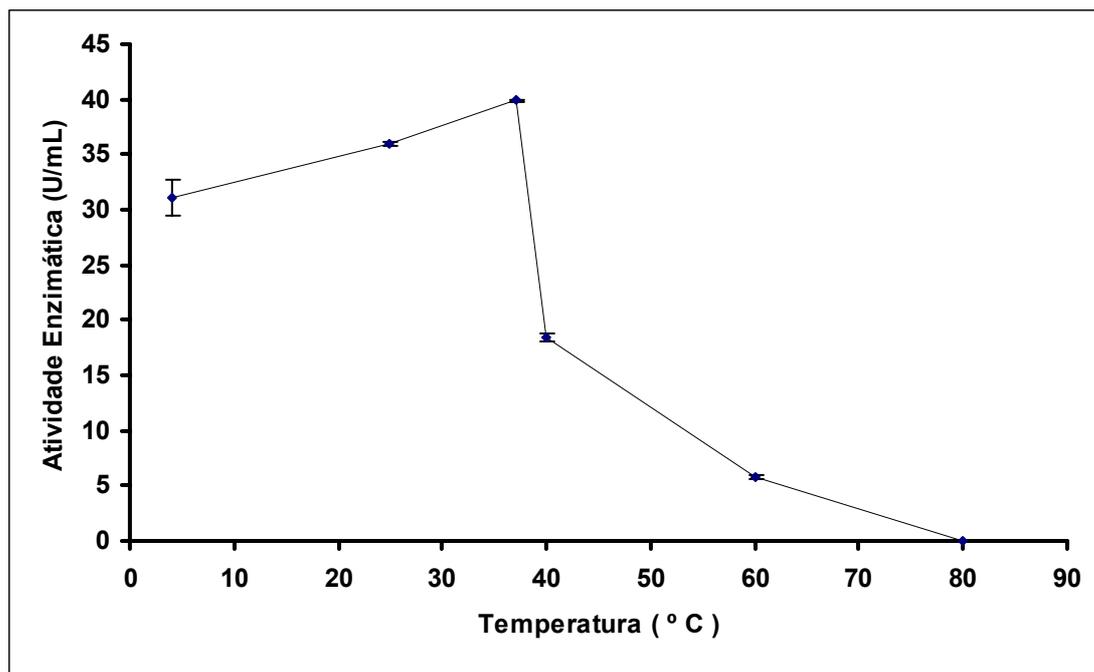


Figura 27. Determinação da temperatura ótima da enzima recombinante.

No ensaio de estabilidade enzimática, a enzima recombinante foi armazenada a diferentes temperaturas (-20°C, 4°C e 37°C) e foram coletadas alíquotas nos tempos 0, 0,5, 1, 3, 12, 24, 48 e 72 h para o ensaio enzimático descrito no item 4.20. A Figura 28 mostra a estabilidade da enzima recombinante quando armazenada a diferentes temperaturas.

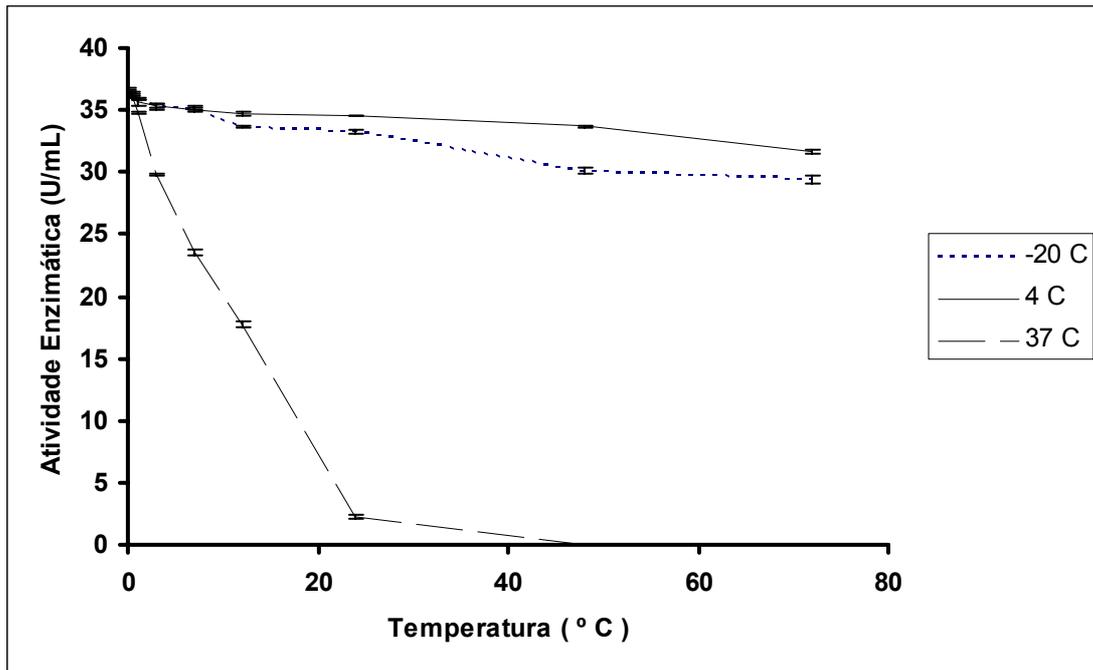


Figura 28. Determinação da estabilidade da enzima recombinante.

6 DISCUSSÃO

O tratamento de pacientes com gota e hiperuricemia nos Estados Unidos é realizado com a utilização do alopurinol, alcalinização da urina e hidratação (TERKELTAUB, 2006). O alopurinol é uma pró-droga que se transforma em um metabólito mais ativo no fígado, o oxipurinol, que por sua vez promove a inibição da enzima XO e, conseqüentemente, a formação do ácido úrico. A utilização prolongada do alopurinol provoca efeitos colaterais, como a hepatotoxicidade decorrente da elevação de transaminases, e a síndrome da hipersensibilidade, com 20% de taxa de mortalidade (TERKELTAUB, 2003).

Na Europa, em 1975, a Uricozyme[®] (urato oxidase não-recombinante) passou a ser utilizada no tratamento da hiperuricemia e se mostrou eficaz na redução dos níveis de ácido úrico (CAIRO, 2002). A Rasburicase[®] derivada da expressão do cDNA da urato oxidase de uma cepa modificada de *A. flavus* e expresso em *S. cerevisiae*, passou a ser utilizada em 2002 no controle dos níveis de ácido úrico no plasma de pacientes com hiperuricemia (SANOFI-AVENTIS, 2002).

A Rasburicase[®] difere do alopurinol por promover a redução dos níveis de ácido úrico no plasma, enquanto o segundo só é efetivo no combate do ácido úrico produzido durante o tratamento ao inibir a enzima XO (UENG et al., 2005).

Diante do relevante papel terapêutico e de diagnóstico da uricase, o principal objetivo deste estudo foi o de desenvolver, por meio de técnicas de Engenharia Genética, uma linhagem de bactéria que expressasse esta enzima em altos níveis. A enzima recombinante deverá ser utilizada futuramente em ensaio de diagnóstico para detecção de ácido úrico em pacientes com gota e em seu tratamento.

Dentre as fontes de uricase consideradas para a produção comercial desta enzima destaca-se *Bacillus subtilis*. Um estudo feito por Schultz et al. (2001) mostrou que a principal atividade da uricase de *B. subtilis* LMD 69.3 está associada ao gene *pucL* (494 resíduos de aminoácidos). Além desse, o gene *pucM*, com 121 resíduos de aminoácidos, mostrou uma seqüência que apresenta alta similaridade com a proteína de ligação ao hormônio da tireóide (JUNG et al., 2006). O gene *pucM* provavelmente está envolvido na remoção do produto final da reação da uricase e atuando como um ativador desta enzima (LEE et al., 2005).

Huang e Wu (2004) realizaram um estudo com uma linhagem de *B. subtilis* termofílica (TB-90) com o objetivo de obter uricase recombinante mais resistente para ser utilizada em ensaio colorimétrico em microplaca de 96 poços. Essa enzima está sendo considerada para uso futuro em kits de diagnóstico para detecção de ácido úrico em pacientes com gota.

A primeira etapa realizada para a obtenção da uricase nesta pesquisa foi o desenho de *primers* específicos para a amplificação do gene que codifica uricase em *B. subtilis*. O desenho dos *primers* foi baseado na seqüência publicada do gene *pucLM*. Os *primers* foram desenhados de tal forma que toda a região codante do gene seria amplificada, enquanto sítios de restrição seriam introduzidos nas extremidades para facilitar a clonagem direcionada no vetor de expressão (Figuras 8, 9 e 11). Embora o DNA cromossomal extraído de várias linhagens de *B. subtilis* tenha sido usado como *template* para PCR (dados não mostrados) somente foi possível a amplificação de um produto de PCR com o tamanho esperado quando se utilizou o DNA cromossomal da linhagem de *B. subtilis subtilis* LMD 69.3. Isso pode ser explicado pelo fato de que a seqüência publicada do gene *pucLM* é baseada na seqüência completa do genoma de *B. subtilis subtilis* LMD 69.3 (KUNST et al., 1997), uma das linhagens utilizadas neste trabalho (Figura 9). Pequenas variações de seqüência encontradas nos genes *pucLM* de outras linhagens podem ter impedido uma eficiente amplificação deste gene utilizando os *primers* desenhados nesta pesquisa.

Como a presença de introns é rara em bactérias, o gene que codifica a uricase pôde ser amplificado por PCR usando-se DNA cromossomal extraído de *B. subtilis*. A PCR foi realizada com DNA polimerase de alta fidelidade (*Taq* Platinum) para minimizar a introdução de mutações durante a amplificação (Tabela 2). Um fragmento de ~1,5 kb foi obtido, consistente com o tamanho esperado para o gene *pucLM* de *B. subtilis* (Figura 12). A identidade do gene *pucLM* foi confirmada pelo seqüenciamento das extremidades do amplicon clonado (Figura 14).

Para expressão do gene da uricase em *E. coli* foi escolhido um vetor de expressão da série pET, o plasmídio pET21a, por ser um sistema altamente controlável de expressão da proteína-alvo (Figura 11). O controle da expressão nesse plasmídio é realizado em nível transcricional pelo promotor T7-*lac*.

O genoma da *E. coli* BL21 DE3 possui o gene que codifica para a T7 RNA polimerase sob controle do promotor *lacUV5*. Além desse gene, o genoma possui o gene *lacI*, que codifica para o repressor *lac*, o qual se liga ao promotor *lac*, impedindo, assim, que a T7 RNA polimerase seja produzida em ausência de IPTG. O gene *lacI* também está presente no vetor pET. Sob condições de repressão (ausência do indutor IPTG), tanto o gene da T7 RNA polimerase quanto o gene-alvo estão transcricionalmente bloqueados por causa da ligação do repressor *lacI* na região operadora. Após a adição do indutor IPTG, a repressão é eliminada.

A presença do plasmídio pLysS na linhagem de *E. coli* BL21 DE3 promove maior controle da produção da proteína-alvo, pois ele produz a T7 lisozima, que inibe a T7 RNA polimerase. O gene da T7 RNA polimerase, que está sob controle do promotor *lacUV5* nas células das linhagens λ DE3, pode ser expresso em pequenas quantidades no estado não induzido. Assim, o plasmídio pLysS seria mais uma forma de controle de produção da proteína-alvo no estado não induzido (MIERENDORF et al., 1994).

No vetor pET21a há, ainda, uma seqüência de seis histidinas logo após o sítio múltiplo de clonagem (*XhoI*), possibilitando que a proteína recombinante seja sintetizada com uma cauda de poli-His na sua porção C-terminal (Figura 11). Essa seqüência de seis histidinas presente na proteína expressa facilita a sua purificação por cromatografia de afinidade em Ni-NTA, além de propiciar a sua detecção por Western Blot (McCORMICK; MIERENDORF, 1994).

O vetor pETURI (Figura 10) foi usado para a transformação da várias cepas de *E. coli* (Quadro 1) visando avaliar a melhor hospedeira para a expressão do gene *pucL*. O sistema *E. coli* é um dos mais utilizados para a expressão heteróloga de proteínas e várias cepas com características especiais estão disponíveis (JANA; DEB, 2005). De todas as cepas utilizadas para o ensaio de indução, destacaram-se a BL21/pLysS e a PRIL, embora este estudo tenha se concentrado na primeira (Quadro 1).

Após indução com IPTG, foi observado o surgimento de uma abundante espécie protéica com massa molecular aparente de aproximadamente 63 kDa (Figura 17), valor superior à massa molecular esperada para a proteína recombinante, que era de 58,9 kDa (Figura 18).

A análise por Western Blot das amostras de indução mostrou que a banda observada de ~63 kDa era reconhecida pelo anticorpo anti-His tag, o que revela que esta proteína possui uma His-tag (Figura 21). Além dessa proteína, a análise de Western Blot também revelou uma outra banda menos abundante um pouco abaixo do marcador de 60 kDa (Figura 21), espécie protéica que deve ser um produto de degradação proteolítica na porção N-terminal da proteína recombinante, pois o C-terminal contém o His-Tag responsável pela interação com o anticorpo.

Na tentativa de impedir a degradação da enzima após a indução, o *pellet* celular foi ressuspendido em solução de lise celular contendo um *cocktail* de inibidores, como PMSF, leupeptina e EDTA. Em seguida, esse material foi aplicado à coluna NI-NTA para melhorar a purificação. O resultado obtido não foi satisfatório por não ter impedido a degradação da enzima recombinante, sendo necessários novos testes com outros inibidores para reduzir o problema da degradação.

Uma possível explicação para a discrepância entre os valores de massa molecular obtido e esperado se deve ao fato de que a análise por SDS-PAGE não é um ensaio preciso para a determinação da massa molecular por causa dos diversos artefatos de migração. Esses artefatos podem ocorrer por efeito do sal presente no tampão das amostras, causando retardamento na migração das proteínas entre as malhas do gel de poliacrilamida.

Um ensaio mais acurado para a determinação da massa molecular é baseado em espectrometria de massa, uma técnica que determina a massa molecular de componentes ionizáveis presentes em uma determinada amostra.

A técnica de espectrometria de massa denominada MALDI-TOF consiste na aplicação do material em pequenas quantidades (geralmente em concentrações da ordem de nanomolar) em uma placa metálica contendo uma matriz que promove a sua protonação. As macromoléculas cristalizadas com essa matriz são submetidas à incidência de um laser que possibilita a aceleração dos componentes moleculares ao longo de um analisador de massas até a chegada em um detector, e o tempo necessário para esse processo é diretamente proporcional à massa molecular dos íons formados. A visualização gráfica se dá sob a forma de um espectro com o eixo da abscissa (x) representando a razão massa/carga (grau de protonação das macromoléculas) e com o eixo da ordenada (y) representando a abundância dos íons que atingem o detector.

Neste trabalho, a espectrometria de massa foi realizada para determinar a massa molecular da proteína recombinante. Este ensaio detectou a presença de um íon com 58,67 kDa, ou seja, com massa molecular calculada próxima daquela esperada (58,9 kDa) (Figuras 18 e 25). Uma possível explicação para essa pequena diferença de ~230 Da na massa molecular da proteína detectada por espectrometria de massa se deve a uma provável degradação na porção N-terminal que já havia sido observada no ensaio de Western Blot (Figura 21).

Em outros estudos, realizados por Yamamoto et al. (1996) e Huang e Wu (2004), a clonagem e a expressão do gene da uricase a partir de uma bactéria termofílica de *Bacillus* sp. TB-90 e de *B. subtilis* em *E. coli* resultou em duas proteínas de massas moleculares diferentes. A proteína obtida de *Bacillus* sp. TB-90 apresentou massa molecular de 37,99 kDa e a de *B. subtilis*, 55 kDa, enquanto na presente pesquisa a proteína recombinante obtida de *B. subtilis* apresentou massa molecular de aproximadamente 59 kDa.

Na tentativa de diminuir a síntese de proteínas intracelulares produzidas pela bactéria hospedeira (*E. coli* BL21 DE3λ pLysS) nos ensaios de indução e facilitar a purificação da enzima recombinante, foi realizado um novo ensaio de indução com a adição de rifampicina (Figura 19). A rifampicina é um antibiótico semi-sintético que inibe a RNA polimerase da *E. coli* de forma específica, impedindo a produção adicional de proteínas da célula hospedeira. Todavia, a inibição não se estende à produção da proteína recombinante, pois sua transcrição é dirigida pela T7 RNA polimerase, enzima de origem viral não inibida por rifampicina. O resultado obtido neste estudo mostrou que, pelo menos neste caso, o tratamento com rifampicina não foi eficaz para a diminuição significativa da síntese protéica.

Kuderová et al. (1999) utilizaram em seus estudos a mesma concentração de rifampicina (200 µg/mL) e obtiveram resultados satisfatórios na diminuição do *background* de proteínas intracelulares quando a β-glicosidase foi expressa. Uma possível explicação para o fato da rifampicina não ter sido eficaz na presente pesquisa pode ser a concentração de metanol utilizada na sua diluição, que pode ter tido efeito deletério sobre as bactérias, dessa forma diminuindo a expressão da proteína recombinante.

Para a purificação da uricase recombinante foi utilizada a técnica de cromatografia de afinidade usando-se Ni-NTA, que permite a purificação em uma

única etapa. NISHIYA et al. (2002) utilizaram em seus estudos uma única etapa de purificação para a uricase recombinante de *Bacillus* sp. TB-90 que continha seis histidinas na porção C-terminal. Após a remoção das proteínas que não se ligaram à resina, a proteína recombinante foi eluída com proteinase K para promover a quebra específica da His-tag sem afetar as propriedades enzimáticas da uricase recombinante.

No presente trabalho, a purificação da proteína recombinante foi realizada em coluna contendo Ni-NTA, seguindo-se uma única eluição com imidazol (250 mM). A fração contendo a proteína purificada apresentou atividade específica de 39 U/mg (Figura 22). Neste estudo não foi utilizada proteinase K, pois acarretaria custo adicional ao processo e uma etapa a mais para a obtenção da enzima na indústria.

Com a finalidade de melhorar o processo de purificação da enzima, decidiu-se realizar a eluição por *step gradient* de imidazol. O ensaio assim realizado mostrou melhor purificação em decorrência da redução da síntese protéica (Figura 23). Outro ensaio de purificação utilizando resina de troca iônica (Q-Sepharose) também foi realizado para tentar obter frações mais puras e com maior atividade específica, porém, o resultado obtido não foi satisfatório por não ter promovido a purificação da enzima (Figura 24).

As amostras obtidas após a purificação por *step gradient* foram utilizadas para os ensaios de caracterização enzimática. O pH ótimo obtido da uricase recombinante foi específico, pois apresentou alta atividade enzimática em pH 8,0 e resquíio de atividade em pH 7,0 (Figura 26). A temperatura ótima obtida não apresentou variação considerável da atividade enzimática entre 25°C e 37°C (Figura 27). Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Huang e Wu (2004) com a uricase de *B. subtilis* expressa de forma heteróloga em *E. coli*; a enzima recombinante obtida naquela pesquisa apresentou atividade enzimática alta em uma faixa de temperatura entre 20°C e 40°C, com pH ótimo de 8,5. Aqueles pesquisadores conseguiram obter uma uricase mutante de *B. subtilis* termofílico com atividade específica de 13,1 U/mg e atividade enzimática em diferentes valores de pH (pH 6-9).

A uricase recombinante obtida neste estudo apresentou atividade específica alta, de 39 U/mg, quando comparada com aquela de *B. subtilis* termofílico (HUANG; WU, 2004). Por outro lado, a uricase alvo desta pesquisa não apresentou atividade

enzimática em ampla faixa de pH e temperatura. A estabilidade da enzima recombinante também não apresentou alteração considerável quando armazenada às temperaturas de -20°C e 4°C , e quando armazenada a 37°C , a atividade enzimática foi detectada em até 24 horas (Figura 28).

7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nesta pesquisa foi possível clonar o gene da uricase no vetor pET21a. A indução da BL21 foi eficiente ao produzir a enzima intracelularmente em forma solúvel e estável, com pH ótimo de 8,0 e temperatura ótima entre 25°C e 37°C.

Uma nova clonagem do gene *pucLM* será realizada no vetor pET28a(+) na tentativa de acabar com a degradação da enzima ao colocar uma proteção na porção N-terminal da enzima, a His-*taq*.

A enzima recombinante obtida neste estudo apresentou estabilidade à temperatura de 4°C, a mesma utilizada para armazenar a uricase de kits de diagnóstico já comercializados. Futuramente, a enzima obtida nesta pesquisa poderá ser utilizada em ensaios de diagnóstico para a detecção de ácido úrico por ser estável e apresentar alta atividade específica. Possivelmente, poderá ser empregada também no tratamento de pacientes com gota, embora para isso seja necessária melhor purificação, pois este tratamento é feito por via endovenosa.

REFERÊNCIAS

- AKAOKA, I.; KAMATANI, N. Abnormalities in urate metabolism: concept and classification. **Nippon Rinsho**, v. 54, n. 12, p. 3243-3247, 1996.
- AMES, B. N.; CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; HOCHSTEIN, P. Uric acid provides on antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 78, n. 11, p. 6858-6862, 1981.
- ASANO, S.; YAMAMOTO, K.; TESHIMA, S.; KIKUCHI, T.; KAWAMURA, Y. Study of a liquid type reagent for determination of uric acid by using thermostable recombinant uricase. **Rinsho Kagaku**, v. 23, p. 214-220, 1971.
- BAYOL, A.; CAPDEVIELLE, J.; MALAZZI, P.; BUZY, A.; BONNET, M. C.; COLLOC'H, N.; MORNON, J. P.; LOYAUX, D.; FENARA, P. Modification of a reactive cysteine explains differences between Rasburicase[®] and Uricozyme[®], a natural *Aspergillus flavus* uricase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 36, p. 21-31, 2002.
- BECERRA, A.; LAZCANO, A. The role of gene duplication in the evolution of purine nucleotide salvage pathways. **Origin of Life and Evolution of the Biosphere**, v. 28, n. 4-6, p. 539-553, 1998.
- BIRBOIM, H. C.; DOLLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.
- BO, A. S.; CAVALLO-PERIN, P.; GENTILE, L.; REPETTI, E., PAGANO, G. Hypouricemia and hyperuricemia in type 2 diabetes: two different phenotypes. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 31, n. 4, p. 318-321, 2001.
- BONGAERTS, G. P. A.; VOGELS, G. D. Uric acid degradation by *Bacillus fastidiosus* strains. **Journal of Bacteriology**, v. 125, n. 2, p. 689-697, 1976.
- BONSDORFF, T.; GAUTIER, M.; FARSTAD, W.; RONNINGEN, K.; LINGAAS, F.; OLSAKER, I. Mapping of the bovine genes of the *de novo* AMP synthesis pathway. **Animal Genetics**, v. 35, n. 6, p. 438-444, 2004.
- BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROGARD, J. M.; COUMAROS, D.; FRANCKHAUSER, J.; STAHL, A.; STAHL, J. Enzymatic uricolysis: a study of the effect of a fungal urate-oxydase. **Revue Européenne d'Études Cliniques et Biologiques**, v. 17, n. 9, p. 890-895, 1972.
- CAIRO, M. S. Prevention and treatment of hyperuricemia in hematological malignancies. **Clinical Lymphoma**, v. 3, Suppl. 1, p. 26-31, 2002.

- CALICETI, P.; SCHIAVON, O.; VERONESE, F. M. Biopharmaceutical properties of uricase conjugated to neutral and amphiphilic polymers. **Bioconjugate Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 638-646, 1999.
- CHEN, Q.; LIANG, Y.; SU, X.; GU, X.; ZHENG, X.; LUO, M. Alternative IMP binding in feedback inhibition of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 348, n. 5, p. 1199-1210, 2005.
- CHEVALET, L.; TIRABY, G.; CABANE, B.; LOISON, G. Genetic improvements of an industrial strain of *Aspergillus flavus* for urate oxidase production. **Journal of Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 239-247, 1993.
- CHRISTIANSEN, L. C. S.; SCHOU, S.; NYGAARD, P.; SAXILD, H. H. Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the xpt- pbuX operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n.8, p. 2540-2550, 1997.
- CHU, R.; LIN, N.; USUDA, M. S.; REDDY, J. K.; YELDANDI, A. V. Mutational analysis of the putative copper – binding site of rat urate oxidase. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 27, n. 804, p. 781-786, 1996.
- COLLOC'H, N.; MORNON, J. P.; CAMADRO, J. M. Towards a new T-fold protein?: the coproporphyrinogen III oxidase sequence matches many structural features from urate oxidase. **FEBS Letters**, v. 28, n. 1-3, p. 5-10, 2002.
- CONLEY, T. G.; PRIEST, D. G. Non-classical inhibition of uricase by cyanide. **Biochemical Journal**, v. 187, p. 733-738, 1980.
- DINCER, H. E.; DINCER, A. P.; LEVINSON, D. J. Asymptomatic hyperuricemia: to treat or not to treat. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 69, n. 8 p. 594-608, 2002.
- FRAISSE, L.; BONNET, M. C.; FARCY, J. P. de; AGUT, C.; DERSIGNY, D.; BAYOL, A. A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of urate oxidase activity and its kinetic parameters. **Analytical Biochemistry**, v. 309, n. 2, p. 173-179, 2002.
- GOCHMAN, N.; SCHMITZ, M. J. Automated determination of uric acid, with use of a uricase-peroxidase system. **Clinical Chemistry**, v. 17, p. 1154-1159, 1971.
- HUANG, S. H.; SHIH, Y. C.; WU, C. Y.; YUAN, C. J.; YANG, Y. S.; LI, Y. K.; WU, T. K. Detection of serum uric acid using the optical polymeric enzyme biochip system. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 12, p. 1627-1633, 2004.
- HUANG, S. H.; WU, T. K. Modified colorimetric assay for uricase activity and a screen for mutant *Bacillus subtilis* uricase genes following StEP mutagenesis. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 517-523, 2004.
- IWAHANA, H.; ITAKURA, M. Inherited disorders of uric acid metabolism – classification, enzymatic- and DNA-diagnosis. **Nippon Rinsho**. v. 54, n. 12, p. 3303-3308, 1996.

JANA, S.; DEB, J., K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 289-298, 2005.

JIMENEZ, A.; SANTOS, M. A.; POMPEJUS, M.; REVUELTA, J. L. Metabolic engineering of the purine pathway for riboflavin production in *Asbya gossypii*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 5743-5751, 2005.

JUNG, D. K.; LEE, Y.; PARK, S. G.; PARK, B. C.; KIM, G. H.; RHEE, S. Structural and functional analysis of PucM, a hydrolase in the ureide pathway and a member of the transthyretin-related protein family. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 103, n. 26, p. 9790-9795, 2006.

KANG, M. P.; NAKAGAWA, T.; FENG, L.; WATANABE, S.; HAN, L.; MAZZALI, M.; TRUONG, L.; HARRIS, R.; JOHNSON, R. J. A role for uric acid in the progression of renal disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 12, p. 2888-2897, 2002.

KEOUGH, D. T.; BRERETON, I. M.; JERSEY, J.; GUDDAT, L. W. The crystal structure of free human hypoxanthine conformational plasticity throughout the catalytic cycle. **Journal of Molecular Biology**, v. 351, p. 170-181, 2005.

KIDA, J.; KUNIHISA, M. Studies on bacterial uricase. (I) Isolation of uricase producing bacteria and some cultural conditions for production. **Journal of Fermentation Technology**, v. 44, p. 789-796, 1996.

KIKKOMAN. **Glucose oxidase (GOD) from *Aspergillus niger***. s. d. Disponível em: <<http://www.kikkoman.co.jp/bio/e/common/rinsyou.html>>. Acesso em: 20 jun. 2004.

KING, M. W. **Nucleotide metabolism**. 2003. Disponível em: <<http://www.med.unibs.it/~marchesi/nucmetab.html#salvage>>. Acesso em: 20 jun. 2004.

KUDEROVÁ, A.; NANAK, E.; TRUKSA, M.; BRZOBOHATÝ, B. Use of rifampicin in T7 RNA polymerase-driven expression of a plant enzyme: rifampicin improves yield and assembly. **Protein Expression and Purification**, v. 16, n. 3, p. 405-409, 1999.

KUNST, F.; OGASAWARA, N.; MOSZER, I.; ALBERTINI, A. M.; ALLONI, G.; AZEVEDO, V.; BERTERO, M. G.; BESSIERES, P.; BOLOTIN, A.; BORCHERT, S.; BORRISS, R.; BOURSIER, L.; BRANS, A.; BRAUN, M.; BRIGNELL, S. C.; BRON, S.; BROUILLET, S.; BRUSCHI, C. V.; CALDWELL, B.; CAPUANO, V.; CARTER, N. M.; CHOI, S. K.; CODANI, J. J.; CONNERTON, I. F.; DANCHIN A, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature**, v. 390, n. 6657, p. 249-256, 1997.

LEE, Y.; LEE, D. H.; KHO, C.W.; LEE, A. Y.; JANG, M.; CHO, S.; LEE, C. H.; LEE, J. S.; MYUNG, P. K.; PARK, B. C.; PARK, S. G. Transthyretin – related proteins function to facilitate the hydrolysis of 5-hydroxyisourate, the end product of the uricase reaction. **FEBS Letters**, v. 579, v. 21, p. 4769-4774, 2005.

LEGOUX, R.; DELPECH, B.; DUMONT, X.; GUILLEMOT, J. C.; RAMOND, P.; SHIRE, D.; CAPUT, D.; FERRARA, P.; LOISON, G. Cloning and expression in

Escherichia coli of the gene encoding *Aspergillus flavus* urate oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 12, p. 8565-8570, 1992.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000.

LE TISSIER, P. R.; PETERS, J.; SKIDMORE, C. J. Development of an assay method for purine catabolic enzymes in the mouse and its adaptation for use on an autoanalyzer. **Analytical Biochemistry**, v. 222, p. 168-175, 1994.

MARMUR, J; SCHILDKRAUT, C. L. Growth of bacteria labelled with heavy isotopes for the isolation of nucleic acids. **Nature**, v. 25, n. 189, p. 636-638, 1961.

MASERA, G.; JANKOVIC, M.; ZURLO, M. G.; LOCASCIULLI, A.; ROSSI, M. R.; UDERZO, C.; RECCHIA, M. Urate-oxidase prophylaxis of uric acid-induced renal damage in childhood leukemia. **Journal of Pediatrics**, v. 100, n. 1, p. 152-155, 1982.

MASSON, E.; SYNOLD, T. W.; RELLING, M. V.; SCHUETZ, J. D.; SANDLUND, J. T.; PUI, C. H.; EVANS, W. E. Allopurinol inhibits *de novo* purine synthesis in lymphoblasts of children with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 10, n. 1, p. 56-60, 1996.

MATSUI, H.; SHIMAOKA, M; TAKENAKA, Y; KAWASAKI, H.; KURAHASHI, O. Gsk disruption leads to guanosine accumulation in *Escherichia coli*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 5, p. 1230-1235, 2001.

MCCORMICK, M.; MIERENDORF, R. S•Tag™: A multipurpose fusion peptide for recombinant proteins. **Novagen inNovations Newsletter**, v. 1, n. 2, p. 4-6, 1994. Disponível em: <<http://www.emdbiosciences.com/docs/NDIS/inno01-001.pdf>>. Acesso em: 2 set. 2005.

MIERENDORF, R.; YEAGER, K.; NOVY, R. The pET system: your choice for expression. **Novagen inNovations Newsletter**, v. 1, n. 1, p. 1-3, 1994. Disponível em: <<http://www.merckbiosciences.com/docs/NDIS/inno01-000.pdf>>. Acesso em: 2 set. 2005.

MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **Journal of Molecular Biology**, v. 260, n. 3, p. 289-298, 1996.

MODAN, M.; HALKIN, H.; KARASIK, A.; LUSKY, A. Elevated serum uric acid – a facet of hyperinsulinaemia. **Diabetologia**, v. 30, n. 9, p. 713-718, 1987.

MOLECULAR TOOLKIT. s. d. Disponível em: <<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/index.html>>. Acesso em: 15 mar. 2005.

MULHBACHER, J.; MCGEENEY, K.; ISPAS-SZABO, P. Modified high amylose starch for immobilization of uricase for therapeutic application. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 36, p. 163-170, 2002.

MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W. **Harper's biochemistry**. 25 th ed. Columbus: Mac Graw-Hill, 2000.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. s. d. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 19 out. 2004.

NEW ENGLAND BIOLABS. **NEBcutter V2.0**. s. d. Disponível em: <<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>>. Acesso em: 5 dez. 2004.

NISHIYA, Y.; HIBI, T.; ODA, J. A purification method of the diagnostic enzyme *Bacillus* uricase using magnetic beads and non-specific protease. *Protein Expression and Purification*, v. 25, n. 3, p. 426-429, 2002.

NISHIYA, Y.; HIBI, T.; ODA, J. The full DNA sequence of the gene encoding the diagnostic enzyme *Bacillus* uricase. **Journal of Analytical Bio-Sciences**, v. 23, p. 443-446, 2000.

ODA, M.; SATTA, Y.; TAKENAKA, O.; TAKAHATA, N. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 5, p. 640-653, 2002.

OGASAWARA, N. Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase. **Nippon Rinsho**, v. 54, n. 12, p. 3207-3212, 1996.

PATTERSON, D.; BLESKAN, J.; GARDINER, K.; BOWERSOX, J. Human phosphoribosylformylglycineamide amidotransferase (FGARAT): regional mapping, complete coding sequence, isolation of a functional genomic clone, and DNA sequence analysis. **Gene**, v. 239, p. 381-391, 1999.

PROTEIN CALCULATOR v3.2. s. d. Disponível em: <<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>>. Acesso em: 27 maio 2005.

PUI, C. H.; MAHMOUD, H. H.; WILEY, J. M.; WOODS, G. M.; LEVERGER, G.; CAMITTA, B.; HASTINGS, C.; BLANEY, S. M.; RELLING, M. V.; REAMAN, G. H. Recombinant urate oxidase for the prophylaxis or treatment of hyperuricemia in patients with leukemia or lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 3, p. 697-704, 2001.

PUI, C. H.; RELLING, M. V.; LASCOMBES, F.; HARRISON, P. L.; STRUXIANO, A.; MONDESIR, J.-M.; RIBEIRO, R. C.; SANDLUND, J. T.; RIVERA, G. K.; EVANS, W. E.; MAHMOUD, H. H. Urate oxidase in prevention and treatment of hyperuricemia associated with lymphoid malignancies. **Leukemia**, v. 11, n. 11, p. 1813-1816, 1997.

RICARDO, S. D.; BERTRAM, J. F.; RYAN, G. B. Podocyte architecture in puromycin aminonucleoside-treated rats administered tungsten or allopurinol. **Experimental Nephrology**, v. 3, n. 5, p. 270-279, 1995.

SANOFI-AVENTIS. Elitek™ (Rasburicase) **Prescribing information** [package insert]. New York, 2002. Disponível em: <<http://www.sanofi-aventis.us/live/us/en/index.jsp>>. Acesso em: 12 abr. 2005.

SCHULTZ, A. C.; NYGAARD, P.; SAXILD, H. H. Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 11, p. 3293-3302, 2001.

STRYER, L. **Bioquímica**. Tradução João Paulo de Campos, Luiz Francisco Macedo, Paulo Armando Motta. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 881 p.

STUDIER, F. W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. **Journal of Molecular Biology**, v. 219, n. 1, p. 37-44, 1991.

TANAKA, A.; YAMAMURA, M.; KAWAMOTO, S.; FUKUI, S. Production of uricase by *Candida tropicalis* using n-alkane as a substrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 342-346, 1977.

TERKELTAUB, R. A. Gout in 2006 - the perfect storm. **Bulletin for Joint Diseases**, v. 64, n. 1-2, p. 82-86, 2006.

TERKELTAUB, R. A. Clinical practice. Gout. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 17, p. 1647-1655, 2003.

UENG, S. Rasburicase (Elitek): a novel agent for tumor lysis syndrome. **Proceedings (Baylor University. Medical Center)**, v. 18, n. 3, p. 275-279, 2005.

VOGT, B. Urate oxidase (rasburicase) for treatment of severe tophaceous gout. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 20, n. 2, p. 431-433, 2005.

WARING, W. S.; MAXWELL, S. R. J.; WEBB, D. J. Uric acid concentrations and the mechanisms of cardiovascular disease. **European Heart Journal**, v. 23, n. 23, p. 1888-1889, 2002.

WATANABE, Y.; FUKUMOTO, J. Studies on the formation of uricase by *Streptomyces*. Part II. The induced formation of uricase by the resting cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 34, p. 1625-1632, 1970.

WEINER, L.; MODEL, P. Role of an *Escherichia coli* stress-response operon in stationary-phase survival. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 91, n. 6, p. 2191-2195, 1994.

WU, X.; MUZNY, D. M.; LEE, C. C.; CASKEY, C. T. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. **Journal of Molecular Evolution**, v. 34, n. 1, p. 78-84, 1992.

YAMAMOTO, K.; KOJIMA, Y.; KIKUCHI, T.; SHIGYO, T.; SUGIHARA, K.; TAKASHIO, M.; EMI, S. Nucleotide sequence of the uricase gene from *Bacillus sp.* TB-90. **Journal of Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 80-84, 1996.

ZHANG, Z.; DIXON, J. E. *De novo* purine nucleotide biosynthesis. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 42, p. 259-287, 1992.

BIBLIOGRAFIA

CALICETI, P.; SCHIAVON, O.; VERONESE, F. M. Immunological properties of uricase conjugated to neutral and soluble polymers. **Bioconjugate Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 515-522, 2001.

FURUYA, A.; ABE, S.; KINOSHITA, S. Production of nucleic acid-related substances by fermentation processes. XXXIII. Accumulation of inosine by a mutant of *Brevibacterium ammoniagenes*. **Applied Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 263-270, 1970.

GOLDMAN, S. C.; HOLCENBERG, J. S.; FINKLESTEIN, J. Z.; HUTCHINSON, R.; KREISSMAN, S.; JOHNSON, F. L.; TOU, C.; HARVEY, E.; MORRIS, E.; CAIRO, M. S. A randomized comparison between rasburicase and allopurinol in children with lymphoma or leukemia at high risk for tumor lysis. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 2998-3003, 2001.

ISHII, K.; SHIIO, I. Improved inosine production and derepression of purine nucleotide biosynthetic enzymes in 8-azaguanine resistant mutants of *Bacillus subtilis*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, p. 1511-1522, 1972.

KOTANI, Y.; YAMAGUCHI, K.; KATO, F.; FURUYA, A. Inosine accumulation by mutants of *Brevibacterium ammoniagenes* strain improvement and culture conditions. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, p. 399-405, 1978.

MATSUI, H.; SATO, K.; ENEI, H.; HIROSE, Y. Production of guanosine by psicofuranine and decoyinine resistant mutants of *Bacillus subtilis*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 43, p. 1739-1744, 1979.

MATSUI, H.; SATO, K.; ENEI, H.; TAKINAMI, K. 5' Nucleotidase activity in improved inosine-producing mutants of *Bacillus subtilis*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, p. 2347-2352, 1982.

NEIDHARDI, F. C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J. L.; LIN, E. C. C.; LOW, K. B.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H. E. **Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology**. 2nd ed. Washington: ASM Press, 1996.

NOGAMI, I.; KIDA, M.; IJIMA, T.; YONEDA, M.; Studies on the fermentative production of purine derivatives. Part I. Derivation of guanosine and inosine-producing mutants from a *Bacillus* strain. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 32, p. 144-152, 1968.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**. A laboratory manual. 3rd ed., Cold Spring: Harbor Laboratory Press, 2001.

WATANABE, Y.; YANO, M.; FUKUMOTO, J. Studies on the formation of uricase by *Streptomyces*. Part I. The effect of purine bases on the induced formation of uricase by the cultured cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, p. 1282-1290, 1969.