

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Estrutura *versus* função: aspectos estruturais e funcionais do
Jaburetox e da urease de *Proteus mirabilis***

Valquiria Broll

Porto Alegre, Setembro 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**estrutura *versus* função: aspectos estruturais e funcionais do Jaburetox e
da urease de *Proteus mirabilis***

Valquiria Broll

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor.

Porto Alegre, Setembro 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**estrutura *versus* função: aspectos estruturais e funcionais do Jaburetox e
da urease de *Proteus mirabilis***

Valquiria Broll

Orientação:

Prof^a. Dra. Célia Carlini
Centro de Biotecnologia (CBIOT) – UFRGS
Instituto do Cérebro (InsCer) – PUC-RS

Co-orientação:

Prof. Dr. Stefano Ciurli
Università di Bologna – UNIBO - Itália

Dr. Diogo Ribeiro Demartini
Centro de Biotecnologia (CBIOT) - UFRGS

Porto Alegre, setembro 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**estrutura *versus* função: aspectos estruturais e funcionais do Jaburetox e da
urease de *Proteus mirabilis***

Valquiria Broll

Banca de avaliação

Prof. Dr. Charley Staats
Centro de Biotecnologia (CBIOT) - UFRGS

Prof. Dr. João Alexandre Barbosa
Instituto de Ciências Biológicas – UNB

Dr. Eduardo Zimmer
Departamento de Bioquímica - UFRGS

Dra. Angela Piovesan
(Revisora da dissertação e membro suplente)
Instituto do Cérebro (InsCer) – PUC-RS

Porto Alegre, setembro 2017

CIP – Catalogação da Publicação

CIP - Catalogação da Publicação

Broll, Valquiria

Estrutura versus função: aspectos estruturais e funcionais do Jaburetox e da urease de *Proteus mirabilis* / Valquiria Broll.

-- 2017.

147 f.

Orientador: Célia Regina Carlini.

Coorientadores: Stefano Ciurli, Diogo Demartini.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Urease de *Proteus mirabilis*. 2. Jaburetox. 3. moonlighting. 4. IDP. I. Carlini, Célia Regina, orient. II. Ciurli, Stefano, coorient. III. Demartini, Diogo, coorient. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Dra. Célia R. Carlini, pela confiança em meu trabalho e todas as oportunidades proporcionadas. Agradeço à Célia por estar sempre presente, sempre disponível a discutir qualquer dúvida, sempre com muita calma, sensibilidade e paciência consegue nos acalmar e ver o lado construtivo de tudo.

Agradeço a meu co-orientador, Dr. Diogo Ribeiro Demartini, por acreditar no meu trabalho.

Agradeço a meu co-orientador Dr. Stefano Ciurli por seu encorajamento diário e suporte, proporcionando um crescimento diário não apenas como cientista mas como pessoa.

À CAPES, CNPq, especialmente ao projeto Ciências sem Fronteiras pelo apoio financeiro.

Aos professores Dr. Itabajara Vaz, Dr. Guido Lenz por acompanharem o andamento desta tese, como comissão de acompanhamento. Aos secretários do PPGBCM, a Silvinha e o Luciano, que sempre atendem nossos pedidos, e respondem nossas dúvidas com atenção, agilidade e sempre com um sorriso no rosto! Agradeço aos técnicos Massimo e Fábio, do CERM por seu ótimo trabalho e disponibilidade, sempre com muita simpatia.

Agradeço aos colegas do LAPROTOX e LANEUROTOX, pela amizade e por estarem sempre dispostos a discutir e ensinar. Agradeço à Barbara por ter me acolhido no laboratório em Bologna e ter sido sempre tão gentil comigo, agradeço à Lucia por suas longas conversas e seu sorriso contínuo – “*non importava se eri contenta oppure no, doveva sorridere sempre!*“. Muso, com seu humor tão particular, mas sempre tão disponível e basta conhece-lo um pouquinho melhor para admirá-lo. Agradeço muito ao Luca, por ser um super colega e amigo, tantas e tantas confabulações, companhia matutina e noturna de laboratório... obrigada pela grande ajuda. Agradeço à Marta, a mais nova colega e a mais nova amiga, com a qual é impossível não se divertir com suas “lamentações quotidianas”.

Algumas pessoas foram fundamentais não só a construção da tese como à formação de meu caráter como pesquisadora. Uma destas pessoas é a Fe Lopes, que tenho tanto a agradecer. Não só por ser uma grande colega mas por ser uma grande amiga. Companheira para qualquer hora, amiga com a qual se pode sempre contar. Fe, tu consegue ver sempre o lado bom em tudo e vê sempre o melhor em cada um, tu sabe respeitar cada um com suas individualidades e particularidades. Te admiro muito.

Rodrigo Braun, grande amigo e colega, tu és, com certeza, uma das pessoas que mais admiro - quanto conhecimento em uma pessoa só, impressionante! Anne Helene, grande parceira de laboratório, companhia para todos os momentos. Leo e Nati, agradeço tanto por ter tido o prazer de conhece-los. Aprendi tanto com vocês, vocês me ensinaram como se faz ciência, como ser uma eficiente, objetiva. Agradeço por vocês nos terem dado o prazer de tê-los conosco, por três ótimos anos.

Agradeço à minhas mãe, Sueli e minhas irmãs por acreditarem e confiarem em mim, acima de tudo por toda compreensão. A meus amigos, Pedroso, Fran, Alinne, Vêro, Dessa, Harry, Felipe Kessler, Diego, Rafa, Vini, Leandro, pela amizade. Agradeço a todos meus amigos por me darem suporte. Quanta saudade...

Bologna me deu tantos presentes, me deu uma família à qual me apoia e me faz muito orgulhosa de fazer parte. Matteo, obrigada por estar ao meu lado, obrigada por me entender, me motivar a melhorar a cada dia mais.

Obrigada a todos que de alguma forma colaboraram para que esta tese fosse possível.

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 PROTEÍNAS <i>MOONLIGHTING</i>	15
1.2 PROTEÍNAS INTRINSECAMENTE DESORDENADAS.....	16
1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA BACTERIANOS COMO PROTEÍNAS <i>MOONLIGHTING</i>	18
1.4 <i>PROTEUS MIRABILIS</i>	18
1.5 UREASES.....	20
1.6 UREASES – UMA VISÃO <i>MOONLIGHTING</i> PARA TOXINAS	25
1.7 JABURETOX (JBTX)	29
1.8 UREASE DE <i>PROTEUS MIRABILIS</i> - PMU	34
2 OBJETIVO GERAL.....	37
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
CAPITULO 1	38
THE NON-ENZYMATIC TOXICITY OF <i>PROTEUS MIRABILIS</i> UREASE AS REVEALED BY ITS ISOLATED SUBUNITS.....	39
CAPITULO 2	78
STRUCTURAL ANALYSIS OF THE INTRINSICALLY DISORDERED PROTEIN JABURETOX AND ITS INTERACTION WITH MEMBRANE MODELS.....	79
3 DISCUSSÃO GERAL	93
4 CONCLUSÕES GERAIS	99
5 REFERÊNCIAS	100
APÊNDICE.....	109
ANÁLISE DE PROTEÍNAS/PEPTÍDEOS INTRINSECAMENTE DESORDENADOS.....	110
1 DICROÍSMO CIRCULAR	115
1.1 ANÁLISE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE IDPS	117
2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) APLICADA A IDPS	119
2.1 TOCSY	120
2.2 NOESY.....	121
2.3 HSQC.....	122
2.4 ESPECTROS DE TRIPLA RESONÂNCIA	124
2.5 CÁLCULO DE ESTRUTURA DE UMA PROTEÍNA	132
2.6 ÍNDICE DE DESLOCAMENTO QUÍMICO (<i>CHEMICAL SHIFT PERTURBATION</i>)	132
3 REFERÊNCIAS.....	134

ANEXO I	137
JABURETOX-INDUCED TOXIC EFFECTS ON THE HEMOCYTES OF <i>RHODNIUS PROLIXUS</i> (HEMIPTERA: REDUVIIDAE)	138
JABURETOX AFFECTS GENE EXPRESSION AND ENZYME ACTIVITIES IN <i>RHODNIUS PROLIXUS</i> , A CHAGAS' DISEASE VECTOR.....	139
HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSES INDUCED BY THE UREASE-DERIVED PEPTIDE JABURETOX IN THE MODEL ORGANISM <i>RHODNIUS PROLIXUS</i>	140
PLIABLE NATURAL BIOCIDES: JABURETOX IS AN INTRINSICALLY DISORDERED INSECTICIDAL AND FUNGICIDAL POLYPEPTIDE DERIVED FROM JACK BEAN UREASE.....	141
ANEXO II	142
SOYBEAN UBIQUITOUS UREASE WITH PURIFICATION FACILITATOR: AN ADDITION TO THE MOONLIGHTING STUDIES TOOLBOX	143
CURRICULUM VITAE	144

Índice de Figuras

Figura 1: Fatores de virulência sintetizados por <i>P. mirabilis</i> ligados a UTIs e CAUTIs.....	20
Figura 2: Esquema de reação de hidrólise da ureia.	21
Figura 3: Representação em <i>cartoon</i> dos componentes do sítio ativo da urease	22
Figura 4: Representação esquemática da forma enzimaticamente ativa das ureases.	23
Figura 5: Esquema geral de ação entomotóxica do peptídeo pepcanatox proveniente da Canatoxina.	30
Figura 6: A) Representação da estrutura tridimensional da JBU em sua forma mínima ativa. B) Sequência de aminoácidos do polipeptídeo entomotóxico Jbtx.	31
Figura 7: A) Estrutura tridimensional do Jbtx obtida por ensaios de dinâmica molecular. B) Cálculos de propensão à formação de estrutura secundária (SSP) do Jbtx quando em solução	33
Figura 8: A) Regiões presentes na sequência do Jbtx que por análise de RMN apresentam estrutura secundária definida. B) Estrutura tridimensional do peptídeo extraída do PDB (Código 2MM8)	33
Figura 9: Organização genética para o <i>cluster</i> gênico da urease de <i>Proteus mirabilis</i>	34
Figura 10: Esquema geral da reação enzimática da PMU.	36

CAPÍTULO 1

Figura 1: Operon e purificação da PMU.....	43
Figura 2: Esquema da construção de plasmídeos e purificação das subunidades da PMU	44
Figura 3: PMU e suas subunidades como indutores de agregação plaquetária.....	46
Figura 4: Efeitos antifúngicos da PMU e suas subunidades em leveduras.	48
Figura 5: Atividade entomotóxica das subunidades da PMU	50
Figura 6: Comparação entre as ureases	52
Figura S1: Cultivo de culturas celulares para seleção de colônias produtoras de PMU	72
Figura S2: Alinhamento entre Jbtx e ureases.	73
Figura S3: Alinhamento da sequência de aminoácidos das ureases de <i>P. mirabilis</i> e <i>H. pylori</i> com peptídeo proveniente do colágeno responsável pela interação com GPVI	76

CAPÍTULO 2

Figura 1: Interação do Jbtx-FITC com células de leveduras analisadas ao microscópio de fluorescência.....	83
Figura 2: Interação do Jbtx-FITC com sistema nervoso de baratas <i>N. cinerea</i> analisadas ao microscópio de fluorescência	84
Figura 3: Análise estrutural do Jbtx em presença de micelas de SDS	85
Figura 4: Interação do Jbtx-FITC com sistema nervoso de baratas <i>N. cinerea</i> em presença de micelas, LUVs e bicelas.	86
Figura 5: Análise estrutural do Jbtx em presença de LUVs negativamente carregadas	87
Figura 6: Dicroísmo circular do Jbtx em presença de LUVs com diferentes composições lipídicas	88
Figura 7: Análise estrutural do Jbtx em presença de bicelas.	89
Figura S1: Purificação do Jbtx.	92

APÊNDICE

Figura 1: Típico resultado proveniente da análise de IDPs utilizando o algoritmo PONDR.....	112
Figura 2: Típico resultado obtido a partir de uma análise em busca de MoRFs	113
Figura 3: Típico resultado obtido com o <i>software</i> ANCHOR	113
Figura 4: Espectros padrões para estruturas ordenadas na forma de α -helice (traçado vermelho), β -folhas (traçado verde) e random coil (traçado azul)	116
Figura 5: A) Espectro de dicroísmo circular da proteína intrinsecamente desordenada α -sinucleína. B) Espectro de dicroísmo circular da proteína ubiquitina.....	117
Figura 6: Representação geral da análise de CD de uma interação proteína-ligante	117
Figura 7: A) Esquema do potencial energético de uma proteínas globular, ordenada. B) e de uma proteína intrinsecamente desordenada.....	119
Figura 8: A) Ilustração dos prótons envolvidos em uma análise $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY. B) Desenho esquemático das interações identificadas em um espectro bidimensional $^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY.....	121

Figura 9: A) Representação esquemática dos átomos envolvidos em uma análise de espectros bidimensionais NOESY. B) Esquema mostrando as diversas regiões de interação identificadas em um espectro NOESY.	121
Figura 10: A) Espectro $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC de uma proteína que apresenta estrutura tridimensional definida B) Espectro $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC de uma proteína intrinsecamente desordenada.	123
Figura 11: Exemplificação dos espectros tridimensionais heteronucleares hCCH-TOCSY (A) e $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC – NOESY (B).	124
Figura 12: Representação esquemática de espectros bi e tridimensionais.	125
Figura 13: Sequência de impulsos para aquisição dos espectros HNCACB (A) e HNcoCBCA (B).	126
Figura 14: <i>Chemical shift</i> relativos aos Carbonos alfa e beta ($\text{C}\alpha$ e $\text{C}\beta$) dos aminoácidos contidos na sequência de uma proteína.	127
Figura 15: Sequência de impulsos para aquisição dos espectros HNCA (A) e HNcoCA (B).	128
Figura 16: Sequência de impulsos para aquisição dos espectros HNCO (A) e HN(CA)CO (B).	129
Figura 17: Sequência de impulsos para aquisição dos espectros HBHANH (A) e HBHA(CO)NH (B).	130
Figura 18: <i>Chemical shift</i> relativos aos hidrogênios alfa e beta ($\text{H}\alpha$ e $\text{H}\beta$) dos aminoácidos contidos na sequência de uma proteína.	131
Figura 19: Esquema geral da variação do <i>chemical shift</i> verificado em um espectro RMN bidimensional. ...	133

Índice de tabelas

Tabela 1: Atividades biológicas testadas para ureases provenientes de diferentes organismos.....26

CAPÍTULO 1

Tabela S1: Desenho experimental para RSM.....69

Tabela S2: Análise de variância ANOVA com uso do programa Statistica 7.7.....70

Tabela S2: Validação do experimento de superfície de resposta 71

APÊNDICE

Tabela 1: Átomos observáveis por RMN, com momento magnético nuclear de *spin*..... 122

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Quilodalton
LB	Luria Bertani
NBT	Cloreto de <i>p</i> -nitro azul de tetrazólio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	20 mmol.L ⁻¹ de fosfato de sódio e 3 mol.L ⁻¹ de cloreto de sódio
PEB	20 mmol.L ⁻¹ de fosfato de sódio, 1 mmol.L ⁻¹ de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e 5 mmol.L ⁻¹ de β-mercaptoetanol
pH	Potencial iônico de hidrogênio
PRP	Plasma rico em plaquetas
RSM	Método de superfície de resposta
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TRIS-HCl	Tris(hidroxi metil)aminometano HCl
TTBS	Tris(hidroxi metil)aminometano HCl: 20 mM pH 7,5 com Cloreto de sódio 150 mM e 0,05 % de Tween 20
TTBS-caseína	Tris(hidroxi metil)aminometano HCl: 20 mM pH 7,5 com Cloreto de sódio 150 mM, 0,05 % de Tween 20 e 5 % de caseína.
Tween 20	Polioxietilenosorbitano
PMU	Urease de <i>Proteus mirabilis</i>
PmUrey	Subunidade γ da PMU codificada pelo gene <i>ureA</i>
PmUreβ	Subunidade β da PMU codificada pelo gene <i>ureB</i>
PmUrea	Subunidade α da PMU codificada pelo gene <i>ureC</i>
HPU	Urease de <i>Helicobacter pylori</i>
HpUreβ	Subunidade β da PMU codificada pelo gene <i>ureA</i>
HpUrea	Subunidade α da PMU codificada pelo gene <i>ureB</i>
JBU	Urease de <i>Canavalia ensiformis</i>
Jbtx	Jaburetox - polipeptídeo proveniente da hidrólise da JBU por enzimas do tipo catepsina.
SPU	Urease de <i>Sporosarcina pasteurii</i> previamente conhecida como <i>Bacillus pasteurii</i>

Resumo

Ureases são proteínas *moonlighting*, com mapeamento da estrutura-atividade ainda pouco compreendido. A urease de *Proteus mirabilis* (PMU) é um importante fator de virulência. PMU apresenta-se em solução como um trímero onde cada monômero apresenta três subunidades estruturais: PmUre α , PmUre β e PmUre γ . Neste trabalho, identificamos que a PMU se comporta como agonista, promovendo agregação plaquetária e é tóxica a leveduras, provocando alterações morfológicas. Estas características foram já descritas para outras ureases e também identificadas para a PmUre β . As subunidades γ e β da PMU são capazes de ativar o sistema imune do inseto *Rhodnius prolixus* e quando testadas em *Dysdercus peruvianus*, PmUre β apresentou maior toxicidade que as subunidades recombinantes γ e α quando administrados por via oral a este inseto. A atividade de agonista da PMU acredita-se que seja devido à porção contida na PmUre β identificada como uma duplicação gênica entre a PmUre β e a urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) correspondente à porção α na PMU. A atividade entomotóxica da JBU é devido à liberação do polipeptídeo jaburetox (Jbtx) após hidrólise da JBU por enzimas do tipo catepsina. A PMU e sua subunidade β apresentam um *overlap* de toxicidade com o Jbtx, devido à existência de uma duplicação gênica entre as sequências de nucleotídeos do Jbtx e da PmUre β . Outro fator determinante para a toxicidade apresentada pela PmUre β seria a perda de estrutura quando em solução, conforme descrito para o Jbtx, foi classificado como uma proteína intrinsecamente desordenada capaz de interagir com lipídios presentes na membrana celular alterando a permeabilidade da mesma, sugerindo a interação Jbtx-membrana como base para sua entomotoxicidade. Visando investigar esta interação, foram analisadas soluções contendo Jbtx em presença de modelos de membrana artificiais. Quando em presença de micelas compostas por SDS, Jbtx teve um aumento de estruturas secundária e terciária. Em presença de vesículas e bicelas, o polipeptídeo apresentou uma pequena alteração estrutural nas porções N e C-terminal. Nossos resultados sugerem que o Jbtx é capaz de ancorar-se à membrana celular de insetos, devido uma interação com os lipídios presentes na mesma, de modo a facilitar seu contato com um alvo específico presente na membrana plasmática.

Abstract

Ureases are moonlighting proteins, with poorly structure-activity mapping properties characterized. Urease from *Proteus mirabilis* (PMU) is an important virulence factor for this bacteria. PMU is a trimeric protein in which each monomer is composed by three structural subunits: PmUre α , PmUre β and PmUre γ . In this work, we identified that PMU acts as an agonist, promoting platelet aggregation and was shown to be toxic against yeasts causing morphological alterations, the same characteristics observed for PmUre β and already described for other ureases. PmUre γ and PmUre β subunits are able to activate the immune system of the insect *Rhodnius prolixus*. In addition, when tested against *Dysdercus peruvianus*, PmUre β showed higher toxicity to this insect than the recombinant subunits α or γ if administered orally. The agonist activity of PMU is due to a portion of intragenic duplication at PmUre β , this duplication was found between *ureB* and *Canavalia ensiformis* (JBU) gene corresponding to a subunit from PMU. Entomotoxic activity of JBU is mainly due to a polypeptide release, this polypeptide is called jaburetox (Jbtx), after urease hydrolysis by cathepsin-like enzymes. Both PmUre β and Jbtx present regions of intragenic duplication, which seem to be an explanation for the toxicity of PMU and Jbtx overlap. A second issue is that PmUre β loses its structure when in solution, the same characteristic described for Jbtx that is an intrinsically disordered polypeptide able to interact with lipids present on cellular membranes. That interaction alters its permeability hinting to a role of Jbtx-membrane interaction as the basis for its toxicity. Intending to investigate the interaction between Jbtx and cellular membranes we performed experiments of Jbtx in presence of artificial membranes (micelles, large unilamellar vesicles - LUVs, and bicelles). The polypeptide when in presence of SDS micelles had an increase of its secondary and tertiary structures. When Jbtx interacted with LUVs, and bicelles as well, the polypeptide presented a slight change of structure at its terminal regions. Our results suggest that Jbtx could anchor to the cellular membrane by an interaction with lipids in order to facilitate its interaction with a membrane-bound target present at the plasma membrane.

1 INTRODUÇÃO

A presente tese segue com uma introdução geral dos assuntos a serem abordados terminando com os objetivos propostos para em cada um dos capítulos dispostos na tese. O primeiro capítulo é uma compilação dos resultados obtidos utilizando a urease de *Proteus mirabilis* e suas subunidades estruturais como fonte de estudo das ureases e suas propriedades moonlighting, estes dados estão compilados na forma de um artigo atualmente submetido à revista Nature Chemical Biology. O segundo capítulo desta tese é composto pelos dados obtidos a partir de análises experimentais e estruturais do peptídeo jaburetox em presença de estruturas lipídicas mimetizando membrana celular. Após apresentação de cada um dos capítulos expomos uma discussão geral dos dados e conclusões gerais desta tese de doutorado.

Como apêndice desta tese temos uma breve revisão de análise de proteínas (peptídeos) intrinsecamente desordenadas (IDPs), sendo descritas as técnicas de dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear voltadas para análise de IDPs. Os anexos I e II são compostos pela primeira página de cada um dos artigos científicos publicados relacionados ao tema abordado nesta tese ou independente do tema desta, respectivamente.

1.1 *Proteínas moonlighting*

Proteínas *moonlighting* são, por definição, proteínas que apresentam duas ou mais funções diferentes e não correlacionadas (JEFFERY, 1999; JAROCKI *et al.*, 2015). A primeira aparição do termo foi nos anos 1970, utilizado por Robert Freedman, em um relatório escrito para uma reunião da sociedade de bioquímica em 1978 (FREEDMAN, 1978), porém o termo acabou se difundindo na literatura apenas no final dos anos 90, a partir da publicação de uma definição do termo por Constance Jeffery, em 1999 (JEFFERY, 1999).

De acordo com Piatigorsky, a terminologia correta para o fenômeno descrito seria “*gene sharing*”, pois a proteína expressa, apresentando duas ou mais funções, é transcrita a partir de uma sequência gênica única, e estas diferentes atividades exercidas não devem ser tratadas como funções secundárias ou como uma função que não deveria ser exercida pela

proteína (PIATIGORSKY, 1998, 2007; LIGABUE-BRAUN & CARLINI, 2015). Porém, devido à imensa aceitação do termo *moonlighting* pela comunidade científica, este será o termo utilizado neste trabalho para definir a multifuncionalidade de proteínas.

Em sua publicação de 1999, Constance Jeffery iniciou a descrever os diferentes mecanismos pelos quais uma proteína pode ser identificada como *moonlighting* (JEFFERY, 1999, 2003, 2015; LIGABUE-BRAUN & CARLINI, 2015), conforme descritas abaixo:

- *Localização*: Uma proteína pode apresentar diferentes funções de acordo com o local onde esta é expressa. Podendo estar localizada em diferentes compartimentos intracelulares;
- *Célula*: A mesma proteína pode ter diferentes funções de acordo com o tipo de célula pela qual é expressa.
- *Estado de oligomerização e formação de complexos*: Algumas proteínas podem apresentar diferentes atividades quando em estados oligoméricos diferentes ou quando presentes em diferentes complexos proteicos.
- *Sítio de ligação*: Proteínas podem apresentar diferentes funções devido à presença de mais de um sítio de ligação em sua sequência.
- *Estado conformacional*: Proteínas com estados de transição entre ordenada-desordenada (desordenada-ordenada) ou com regiões que apresentem alteração de conformação, devido à função a ser exercida.

É muito importante definir também os mecanismos pelos quais proteínas podem exercer diferentes funções não correlacionadas entre si, mas que não as classificam como *moonlighting*, como no caso de funções adquiridas devido a uma não especificidade ao substrato, ou devido à mutação gênica ou mesmo a partir de modificações pós-traducionais (COPLEY, 2003, 2012; JAROCKI *et al.*, 2015).

1.2 *Proteínas intrinsecamente desordenadas (do inglês Intrinsically disordered proteins - IDPs)*

Proteínas intrinsecamente desordenadas (IDPs) foram recentemente descritas como proteínas com pouca ou nenhuma estrutura secundária ou terciária (UVERSKY, 2014,

2016). IDPs apresentam uma ampla plasticidade em sua estrutura tridimensional, sendo incapazes de obter uma conformação tridimensional de forma independente, definição que foi capaz de modificar o paradigma de estrutura-função como era então conhecido (UVERSKY, 2014, 2016).

Esta classe de proteínas não é um achado recente. Já nos anos 50, Jirgensons e colaboradores apresentaram esquemas que incluíam uma classe de proteínas chamadas desordenadas (JIRGENSONS, 1966; DEFORTE & UVERSKY, 2016). IDPs estão sendo vastamente discutidas na literatura, por pelo menos 75 anos, e podem ser encontradas com diversas denominações, como listado por Vladimir Uversky em sua revisão de introdução às IDPs publicada em 2014 (UVERSKY, 2014):

“floppy, pliable, rheomorphic, flexible, mobile, partially folded, natively denatured, natively unfolded, natively disordered, intrinsically unstructured, intrinsically denatured, intrinsically unfolded, intrinsically disordered, vulnerable, chameleon, malleable, protein clouds, dancing proteins, proteins waiting for partners, e muitas outras combinações entre nativa/intrinsicamente/naturalmente e desordenada/desnaturada/unfolded”.

IDPs são descritas como proteínas com uma alta plasticidade, moléculas com uma extensa possibilidade de conformações possíveis, sendo tipicamente compostas por *foldons* e *unfoldons*. *Foldons* são regiões presentes em uma proteína desordenada que apresentam capacidade de estruturar-se de forma independente. Os *unfoldons* são estruturas tidas como plásticas, capazes de migrar entre estrutura ordenada e desordenada a fim de atuar biologicamente. Dentre *foldons* e *unfoldons* existem algumas formas intermediárias, assim denominadas: a) *foldon induzido*, que é representado por regiões capazes de adquirir uma estrutura tridimensional quando em presença de seu ligante específico; b) *não-foldon*, são estruturas incapazes de adquirir estrutura secundária ou terciária mantendo-se desestruturada; c) *semi-foldons*, que como diz o nome, apresentam-se em um estado de semi-estrutura, não adquirindo uma estrutura tridimensional definida. (UVERSKY, 2016).

Em 2005, Tompa e colaboradores estudaram 11 diferentes proteínas intrinsicamente desordenadas, de forma a comprovar a sua teoria de que a alta maleabilidade de IDPs faz com que estas apresentem grande tendência a um comportamento *moonlighting* (TOMPA *et al.*, 2005). Esta tendência *moonlighting* das IDPs

é identificada através de mecanismos envolvendo a sua capacidade de adquirir diferentes conformações, o que possibilita sua interação com um ou mais ligantes específicos (TOMPA *et al.*, 2005).

1.3 *Fatores de virulência bacterianos como proteínas moonlighting*

O tema *moonlighting* é ainda emergente e fundamental para o estudo de bactérias. Proteínas *moonlighting* são altamente conservadas entre procariotos e eucariotos, dentre as quais geralmente são enzimas importantes no metabolismo ou chaperonas atuando como agentes na sinalização celular, bem como participando na adesão celular (HENDERSON & MARTIN, 2011, 2013). Muitas destas proteínas estão envolvidas na patogênese bacteriana, como fator de virulência, sendo responsáveis pela ativação da resposta imune do hospedeiro, e causando diversas infecções (HENDERSON & MARTIN, 2011; JEFFERY, 2015).

1.4 *Proteus mirabilis*

Bactérias do gênero *Proteus* são Gram-negativas que fazem parte da família *Enterobacteriaceae*. O gênero *Proteus* é constituído por quatro espécies: *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Proteus myxofaciens* e *Proteus mirabilis*. *P. mirabilis* apresenta diferenciação celular, partindo da forma *swimming* à forma *swarming*. A diferenciação celular *swimming/swarming* ocorre como resposta ao meio facilitando a motilidade das células, auxiliando fortemente na colonização de superfícies sólidas (RÓZALSKI *et al.*, 1997; MANOS & BELAS, 2006).

O gênero *Proteus* é encontrado principalmente no solo e em águas contaminadas, bem como no trato intestinal de diferentes animais participando da decomposição de matéria orgânica (JACOBSEN *et al.*, 2008; GIBBS & GREENBERG, 2011). *P. mirabilis* é uma bactéria uropatogênica oportunista sendo classificada como a terceira maior causadora de infecções no trato urinário (BAHASHWAN & SHAFEY, 2013), e pode-se explicar este alto índice de contaminação devido a sua massiva presença no intestino de humanos, resultando em autocontaminação bem como a sua transmissão entre pacientes

hospitalizados (CHOW *et al.*, 1979; RÓZALSKI *et al.*, 1997; COKER *et al.*, 2000; MANOS & BELAS, 2006).

Complicações causadas pelas infecções por *P. mirabilis* incluem cistite, pielonefrite, urolitíase, prostatites, inclusive a incrustação de cateteres, representando mais de 44 % das infecções urinárias associadas ao uso de catéteres (CAUTIs) nos Estados Unidos (ARMBRUSTER & MOBLEY, 2012). A população feminina apresenta maior propensão a infecções no trato urinário (UTIs), sendo os riscos aumentados em mulheres grávidas e idosos. O maior risco é verificado em pacientes hospitalizados, principalmente quando é necessário o uso prolongado de cateteres pelo paciente (independente do sexo e/ou idade) (MAGLIANO *et al.*, 2012).

A bactéria *P. mirabilis* apresenta muitas estratégias de desenvolvimento no hospedeiro, com um mecanismo de defesa bastante sofisticado. Fazem parte destes mecanismos: reações não específicas envolvidas na adesão do patógeno a mucosas do hospedeiro; controle na transferência de ferro, e ainda, formas de evitar a fagocitose pelo hospedeiro. Este patógeno produz fatores de virulência (que podem ser visualizados na Figura 1), os quais são importantes e/ou essenciais para instalação e manutenção das infecções urinárias associadas. Estes fatores de virulência são sintetizados pela bactéria, protegendo-a de eliminação por enzimas ou pelo sistema imunológico do hospedeiro (Coker *et al.*, 2000).

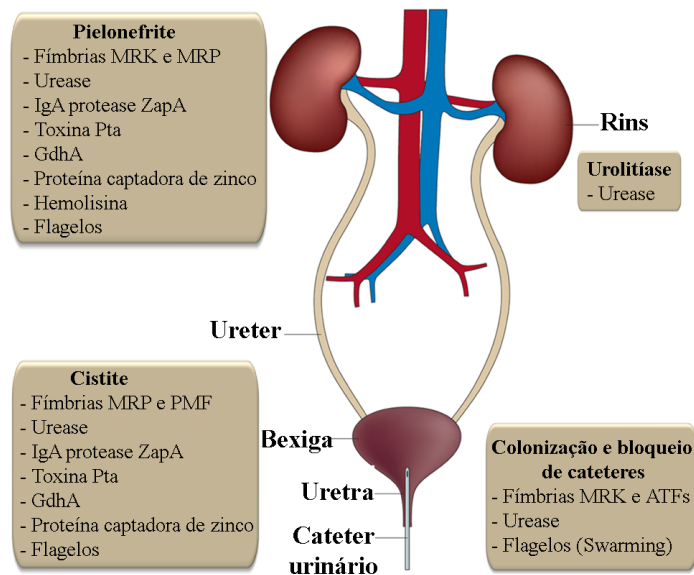


Figura 1: Fatores de virulência sintetizados por *P. mirabilis* ligados a UTIs e CAUTIs. ATFs: fímbrias de temperatura ambiente; GdhA: glutamato desidrogenase; IgA: imunoglobulina A; MRK: manose-resistente *Klebsiella*-like; MRP: manose-resistente de *Proteus*. Adaptada de Armbruster e Mobley, 2012 (ARMBRUSTER & MOBLEY, 2012).

Dentre os fatores citados na Figura 1, temos a urease de *P. mirabilis* (PMU) que atua na hidrólise da ureia, presente na urina, aumentando o pH do meio e proporcionando a sua sobrevivência e colonização do trato urinário. A PMU é definida como um crítico fator de virulência (JOHNSON, D E *et al.*, 1993), e será abordado adiante neste trabalho.

1.5 Ureases

Ureases (EC 3.5.1.5) são amino-hidrolases, dependentes de níquel, que catalisam a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono, mecanismo esquematizado na Figura 2 (BLAKELEY *et al.*, 1969; MOBLEY & HAUSINGER, 1989). A catálise da hidrólise da ureia causa aumento do pH do meio devido à liberação de amônia, causando graves consequências à saúde de humanos bem como à agricultura (MOBLEY & HAUSINGER, 1989; FOLLMER, 2008).

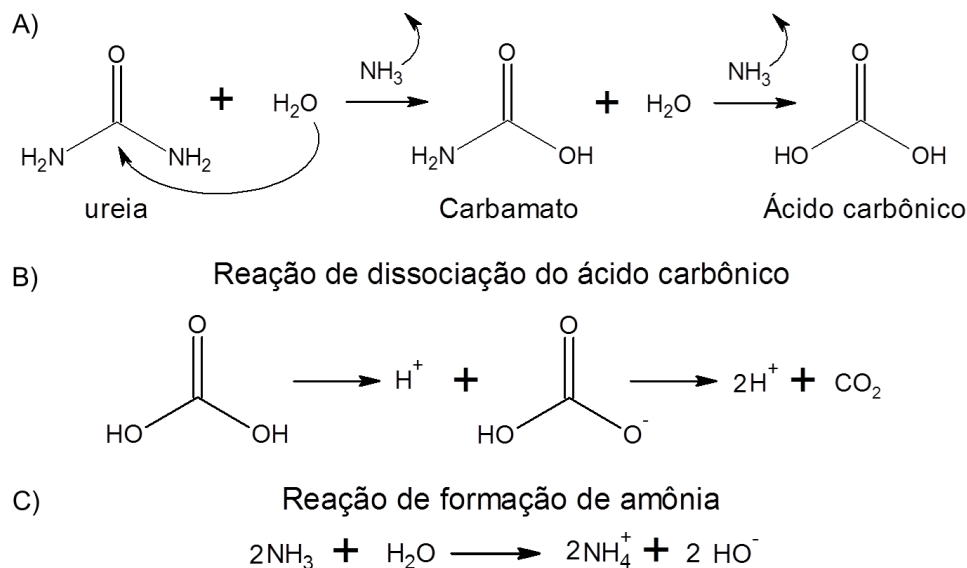


Figura 2: Esquema de reação de hidrólise da ureia. **A)** Para cada molécula de ureia hidrolizada tem-se a formação de uma molécula de amônia e uma molécula de carbamato. O carbamato gerado reage com a água resultando em uma molécula de amônia e um ácido carbônico. **B)** A reação de dissociação do ácido carbônico leva à liberação de um próton e após a dissociação completa do ácido há a formação de uma molécula de gás carbônico. **C)** As amônias geradas (mostradas em A) são protonadas devido à sua interação com a água do meio, que é então alcalinizado. Esquema adaptado de Mobley e Hausinger, 1989 (MOBLEY & HAUSINGER, 1989).

Ureases são enzimas encontradas em diversos organismos como plantas, algas, bactérias e fungos (HAUSINGER, 1987; MOBLEY & HAUSINGER, 1989). Uma das ureases de *Canavalia ensiformis* (JBU) foi, historicamente, a primeira enzima a ser cristalizada, por Sumner em 1926 (SUMNER, 1926). Em seu trabalho, Sumner demonstrou pela primeira vez que enzimas são proteínas, proporcionando avanços fundamentais para a bioquímica (SUMNER, 1926). Estas enzimas apresentam dois átomos de níquel em seu sítio ativo, cada átomo coordenado por dois resíduos de histidina, um aspartato e uma lisina carbamilada, como pode ser visto no esquema mostrado na Figura 3A (FOLLMER & CARLINI, C R, 2005; MARONEY & CIURLI, 2014).

Ureases apresentam uma estrutura em forma de alça, que quando fechada é capaz de inativar a enzima enzimaticamente, pois impossibilita a interação da enzima com seu substrato (ZAMBELLI *et al.*, 2011). Esta sequência é altamente conservada entre ureases e pode ser verificada na Figura 3B, evidenciada em azul.

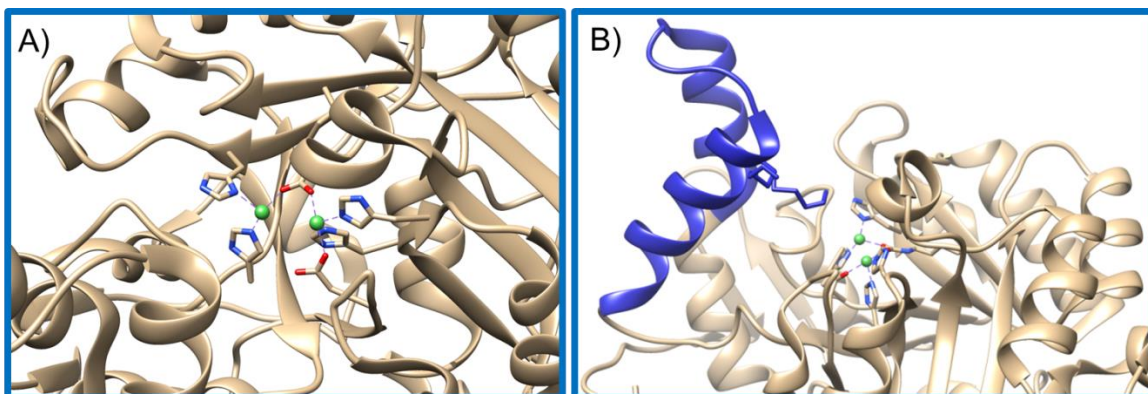


Figura 3: Representação em *cartoon* dos componentes do sítio ativo da urease. **A)** Ilustração do sítio catalítico da urease mostrando as quatro histidinas interagindo com cada um dos átomos de níquel (esferas em verde), o aspartato e a lisina carbamilada (PDB: 3LA4). **B)** Representação de uma alça flexível presente na JBU, na sua posição aberta, evidenciando a cisteína 592 (PDB: 3LA4).

Cada monômero da JBU apresenta uma cadeia polipeptídica constituída por 840 aminoácidos e massa molecular de 90 kDa. A forma mínima, enzimaticamente ativa, da JBU em solução é a de um trímero, com 270 kDa mas sua conformação nativa é a de um hexâmero com 540 kDa. Sua estrutura foi resolvida por Balasubramanian e Ponnuraj (Figura 4A), através de cristalografia de raios X. Esta estrutura está depositada no banco de dados de proteínas (PDB – Protein Data Bank) com o código 3LA4 (BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010).

Assim como as ureases vegetais, as ureases provenientes de fungos apresentam-se como trímeros ou hexâmeros com apenas uma subunidade estrutural (α), enquanto que as ureases bacterianas são multímeros complexos, formados por duas (α e β) ou três (α , β e γ) subunidades (OLIVERA-SEVERO *et al.*, 2006; BECKER-RITT & CARLINI, 2012; LIGABUE-BRAUN *et al.*, 2013). Alguns exemplares de ureases bacterianas tiveram já sua estrutura resolvida por cristalografia, como por exemplo a urease de *Sporosarcina pasteurii* (SPU) com código PDB 4CEU (Figura 4B) (BENINI *et al.*, 2014) e a urease de *Helicobacter pylori* (HPU) codificada no PDB como 1E9Z (Figura 4C) (HA *et al.*, 2001).

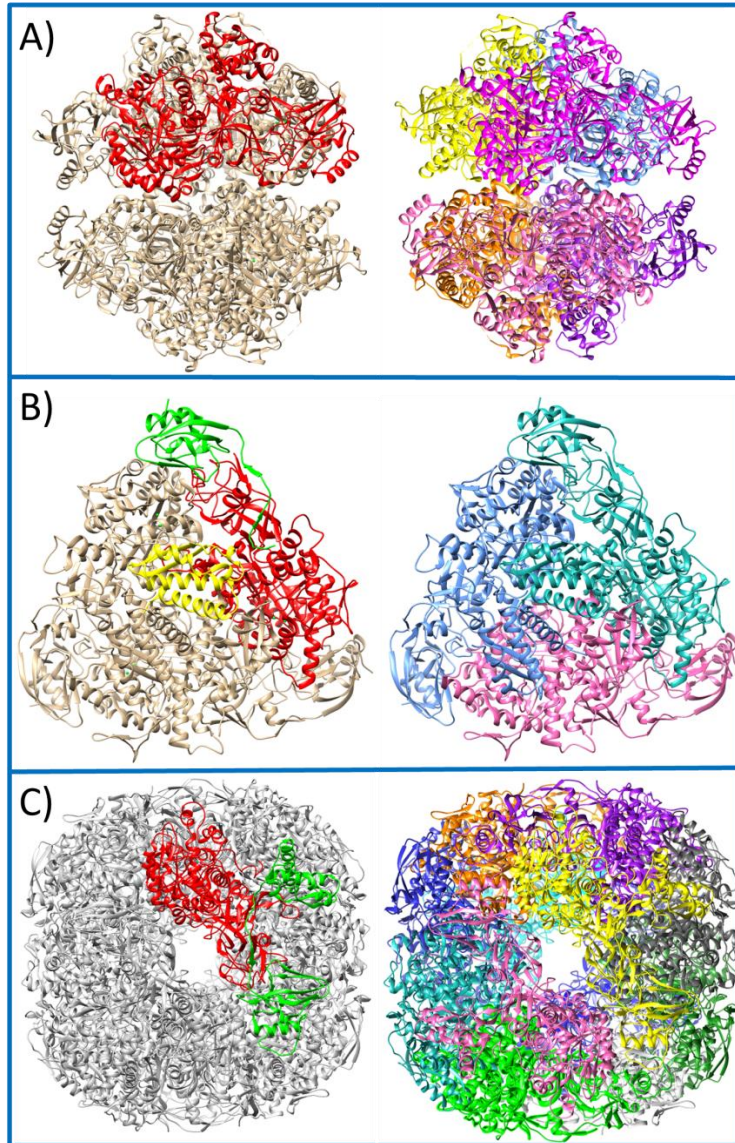


Figura 4: Representação esquemática da forma enzimaticamente ativa das ureases. **A)** Representação em *cartoon* da JBU (PDB: 3LA4) em sua forma hexamérica, enzimaticamente ativa. À esquerda do painel, representada a forma monomérica da JBU em vermelho enquanto que à direita são representadas cada um dos monomeros necessários para formação da estrutura hexamérica (α_6). **B)** Representação em *cartoon* da SPU (PDB: 4CEU) em sua forma trimérica, enzimaticamente ativa. À esquerda do painel, estão as três subunidades estruturais da SBU, evidenciadas as subunidades γ , β e α em amarelo, verde e vermelho, respectivamente. À direita são representadas cada uma das três subunidades representando a forma trimérica da enzima ($\alpha\beta\gamma$)₃. **C)** Representação em *cartoon* da HPU (PDB: 1E9Z) em sua forma dodecamérica, enzimaticamente ativa. À esquerda são evidenciadas as subunidades estruturais da HPU, subunidade β em verde e α em vermelho, enquanto que à direita é representada a forma dodecamérica da enzima, representada como (($\alpha\beta$)₃)₄.

A diferença mais evidente entre as ureases está em sua estrutura quaternária nativa, conforme mostrado na Figura 4. A JBU apresenta-se como um hexâmero α_6 , com apenas uma subunidade. Na Figura 4A é mostrada a estrutura do hexâmero estrutural da JBU, à esquerda está em evidência apenas uma das subunidades α (em vermelho) enquanto que à direita da figura vemos em diferentes cores, cada um dos seis monômeros. Na Figura 4C temos a urease de *H. pylori* (HPU) mostrada na forma de *cartoon* como um dodecâmero $((\alpha\beta)_3)_4$, sendo cada monômero composto por duas subunidades diferentes, Urea (em vermelho) e Ure β (em verde) mostradas à esquerda da Figura 4C, enquanto que à direita da mesma Figura são identificadas cada um dos 12 monômeros ($\alpha\beta$) presentes com cores diferentes (HA *et al.*, 2001). Em geral as ureases bacterianas apresentam-se como um trímero $(\alpha\beta\gamma)_3$ cada um formado por Urea, Ure β e Ure γ , como por exemplo a SPU (Figura 4B) e PMU (HEIMER & MOBLEY, 2001; CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016). Na Figura 4B vemos a estrutura trimérica da SPU, composta por três subunidades, α , β e γ , sendo à esquerda evidenciadas cada uma das subunidades em vermelho, verde e amarelo enquanto que à direita estão evidenciadas cada um dos monômeros compostos pela combinação de $\alpha\beta\gamma$ em três cores diferentes.

Apesar da abundância das ureases em plantas, ainda não há muitas informações sobre sua função nos vegetais. Sua principal função pode estar relacionada à reciclagem de nitrogênio (SIRKO & BRODZIK, 2000) mesmo que a ureia, seu principal metabólito, não seja abundante em plantas, ou ainda estar ligada à defesa da planta contra fitófagos e outros patógenos (CARLINI, *et al.*, 1988; POLACCO & HOLLAND, 1993; POLACCO *et al.*, 2013).

A função de ureases microbianas está intimamente relacionada à patogênese destes micro-organismos, sendo consideradas como um fator de virulência para algumas bactérias como por exemplo *P. mirabilis*, *H. pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, dentre tantas outras, bem como para fungos e leveduras como *Cryptococcus gatti*, *Cryptococcus neoformans* e *Coccidioides posadasii* (CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016). Esta propriedade é na maioria dos casos ligada à atividade enzimática da urease e à sua toxicidade descrita em função da liberação da amônia, que é um composto tóxico ao hospedeiro e causa aumento do pH do meio (ARMBRUSTER & MOBLEY, 2012; CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016).

1.6 Ureases – uma visão moonlighting para toxinas

O estudo dos efeitos biológicos das ureases de forma independente de sua atividade enzimática teve início com Carlini e Guimarães, em 1981, quando estes purificaram a partir da planta *C. ensiformis* uma enzima capaz de provocar convulsão e morte em ratos e camundongos ($DL_{50} = 0,5 - 2,0$ mg/kg) quando injetada intraperitonealmente (CARLINI & GUIMARÃES, 1981). A enzima purificada foi chamada de canatoxina (CNTX), onde o prefixo “cana” é originado da grafia de sua fonte de origem, *Canavalia*, e o sufixo “toxina” claramente devido à sua toxicidade. Anos mais tarde, Follmer e colaboradores demonstraram que a CNTX era uma isoforma da JBU, apresentando-se como um dímero de 95 kDa cada monômero, e em vez de dois átomos de Ni^{2+} como a JBU, esta apresenta um átomo de Ni^{2+} e um átomo de Zn^{2+} . Devido à diferente composição de metais no sítio ativo da CNTX, sua atividade enzimática seria reduzida em 30 – 40 % quando comparada à JBU (FOLLMER, *et al.*, 2001; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Ainda em 2001, Follmer e colaboradores verificaram que CNTX e JBU compartilhavam algumas atividades biológicas como a capacidade de ativar a agregação de plaquetas e ligar-se a glicoconjugados. Estas atividades são mantidas por ambas proteínas mesmo após sua inibição enzimática com uso do inibidor p-hidroximercurobenzoato (pHMB) (FOLLMER *et al.*, 2001). Com os dados apresentados, foi possível determinar que as atividades biológicas identificadas para as ureases eram independentes da atividade enzimática (LIGABUE-BRAUN & CARLINI, 2015; CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016).

Desde então, ureases bacterianas e de plantas foram testadas quanto à sua atividade biológica independente da atividade ureolítica. Como pode ser visto na Tabela 1, muitas das atividades detectadas são compartilhadas entre as ureases.

Tabela 1: Atividades biológicas testadas para ureases provenientes de diferentes organismos (BECKER-RITT *et al.*, 2007; CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016; MARTINELLI *et al.*, 2016). CNTX: Canatoxina, JBU: Urease de *C. ensiformis*, rGST-uSBU: Urease ubíqua da soja recombinante conjugada com GST, rHPU: Urease de *H. pylori* recombinante SPU: Urease de *S. pasteurii*, nt: não testado.

		Edema de pata	Atividade antifúngica		Atividade inseticida <i>R. prolixus</i>			Agregação de plaquetas
			Fungos filamentosos	Leveduras	Ingestão	Injeção	Agregação de hemócitos	
Plantas	CNTX	0,3 mg/pata (Ratos)	50 μ M	nt	0,6 – 1,3 μ g.mg ⁻¹	nt	nt	54 μ g.ml ⁻¹
	JBU	0,3 mg/pata (Ratos)	0,31 mg.mL ⁻¹	0,1 mg.mL ⁻¹	0,1 μ g.mg ⁻¹	0,25 μ g.mg ⁻¹	0,12 μ g.mL ⁻¹	15,8 μ g.mL ⁻¹
	rGST-uSBU	nt	0,24 mg.mL ⁻¹	0,24 mg.mL ⁻¹	nt	50 ng.mg ⁻¹	0,12 μ g.mL ⁻¹	33 μ g.mL ⁻¹
Bactérias	rHPU	0,5 – 45 μ g/pata (Camundongos)	0,55 – 0,93 mg.mL ⁻¹	nt	nt	nt	nt	55 – 410 μ g.mL ⁻¹
	SPU	nt	0,15 – 0,54 mg.mL ⁻¹	nt	nt	nt	nt	200 – 800 μ g.mL ⁻¹

Estudos *in vivo*, realizados em ratos e camundongos, demonstraram que a CNTX induz bradicardia, hipertensão e hipotermia, que ocorrem antes do fenômeno de convulsão, característico de sua ação tóxica (BARJA-FIDALGO *et al.*, 1991; FERREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2000). Diversamente da CNTX, a JBU não é letal a ratos (dados não publicados) e camundongos após injeção intravenosa (FOLLMER *et al.*, 2001).

A urease de *Helicobacter pylori* (HPU), extensivamente usada como modelo de urease bacteriana, foi capaz de causar morte em camundongos após episódios de hipotermia e convulsão, do mesmo modo que com CNTX (BAIK *et al.*, 2005).

Estudos mostraram que doses nanomolares da CNTX induzem excitose em diversos tipos celulares, como plaquetas, neutrófilos, sinaptossomas, ilhotas pancreáticas, mastócitos, etc. Estes efeitos são mediados por eicosanóides e por alterações dos níveis intracelulares de cálcio (CARLINI *et al.*, 1985; BARJA-FIDALGO *et al.*, 1991; GHAZALEH *et al.*, 1997).

Em 2004, Follmer e colaboradores detectaram indução de excitose em plaquetas para as ureases de planta, JBU, e a urease embrião específico de soja (eSBU) e ainda para uma urease bacteriana, a partir da bactéria *Sporosarcina pasteurii* – previamente conhecida como *Bacillus pasteurii* (FOLLMER *et al.*, 2004). Poucos anos mais tarde, Wassermann e colaboradores verificaram que a HPU era capaz de ativar a agregação de plaquetas (WASSERMANN *et al.*, 2010). Neste mesmo trabalho, e em Olivera-Severo e colaboradores de 2006, foi visto que a indução de agregação seria através da rota do ácido araquidônico, seguindo pela via da 12-lipoxigenase (OLIVERA-SEVERO *et al.*, 2006; WASSERMANN *et al.*, 2010).

Quando testada contra insetos, foi possível detectar efeito entomotóxico da proteína em alguns grupos. Dentre os insetos suscetíveis testados estão *Rhodnius prolixus*, *Dysdercus peruvianus* e *Callosobruchthys maculatus*. Entretanto, os insetos *Manduca sexta*, *Drosophila melanogaster* e *Aedes aegypti* não foram afetados pela presença de CNTX, indicando uma relação entre as enzimas digestivas dos insetos e a atividade entomotóxica da proteína (CARLINI *et al.*, 1997; FERREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2000; STANISÇUASKI *et al.*, 2005). A isoforma majoritária da urease produzida pela *C. ensiformis*, JBU, foi também testada contra os insetos *R. prolixus*, *D. peruvianus* e *Oncopeltus fasciatus*, os

quais mostraram-se suscetíveis à proteína (FOLLMER *et al.*, 2004; PIOVESAN *et al.*, 2008; STANISÇUASKI *et al.*, 2010; DEFFERRARI *et al.*, 2011).

Assim como *C. ensiformis*, a soja (*Glicine max*) apresenta 3 isoformas de urease. São elas: a urease majoritária, embrião específica (eSBU) é sintetizada apenas no embrião da planta em desenvolvimento (POLACCO & HAVIR, 1979; POLACCO & WINKLER, 1984; POLACCO & HOLLAND, 1993), a urease ubíqua (uSBU) encontrada em todas as partes da planta (TORISKY *et al.*, 1994) e tem também uma terceira isoforma, chamada SBU-III encontrada, com baixo nível de expressão, em sementes e raízes de plantas jovens (WIEBKE-STROHM *et al.*, 2016). Em 2016, dados publicados pelo nosso grupo sobre a atividade entomotóxica para a uSBU recombinante, demonstraram que a proteína é capaz de causar morte em *R. prolixus* 96 h após injeção. Sendo também capaz de causar agregação de hemócitos seja *in vitro* ou *in vivo* (MARTINELLI *et al.*, 2016).

Quando testadas em fungos selecionados, tanto a CNTX como a JBU inibiram a germinação de esporos e o crescimento de hifas de vários fungos filamentosos, incluindo fungos fitopatogênicos (BECKER-RITT *et al.*, 2007; POSTAL *et al.*, 2012). A atividade antifúngica da JBU para leveduras foi também demonstrada, causando inibição da proliferação celular e formação de pseudo-hifas em doses submicromolares (POSTAL *et al.*, 2012). Da mesma forma que para JBU, a uSBU foi testada contra diferentes espécies de fungos e leveduras promovendo inibição na proliferação celular (MARTINELLI *et al.*, 2016).

Muitas das atividades biológicas das ureases de planta são compartilhadas com ureases bacterianas como por exemplo seus efeitos pró-inflamatórios (UBERTI *et al.*, 2013), indução de agregação plaquetária (OLIVERA-SEVERO *et al.*, 2006; WASSERMANN *et al.*, 2010), conforme citada anteriormente, assim como atividade entomotóxica e antifúngica (LIGABUE-BRAUN & CARLINI, 2015). Em 2012, Salvadori e colaboradores identificaram atividade inseticida para urease proveniente de bactérias do gênero *Photorhabdus* (SALVADORI *et al.*, 2012); mesmo que dados de 2004, por Follmer e colaboradores indicassem a não atividade inseticida por parte da urease bacteriana de *S. pasteurii* (FOLLMER *et al.*, 2004). Com estes dados foi proposta a existência de mais de um domínio ativo na sequência da urease, pois a sequência até então identificada como

entomotóxica era ausente na SPU, motivo descrito para sua não atividade inseticida (FOLLMER *et al.*, 2004; CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016).

Além da atividade entomotóxica identificada para diversas ureases, estas proteínas também possuem atividade antifúngica. Ocorre uma inibição do crescimento de fungos e leveduras mesmo após inibição de sua atividade enzimática com uso de *pHMB* (BECKER-RITT & CARLINI, C R, 2012; POSTAL *et al.*, 2012). Além da JBU ser uma proteína tóxica *per se*, ela apresenta mais de uma sequência peptídica com as mesmas atividades biológicas. Em 2012, Postal e colaboradores demonstraram que na sequência da JBU existem mais de uma porção da proteína responsável por sua atividade antifúngica. Foram testados pequenos peptídeos (< 10 kDa) obtidos após hidrólise da JBU com papaína. Alguns destes peptídeos, mesmo não tendo nenhuma homologia a outras sequências já conhecidas como antifúngicas para ureases, apresentaram esta atividade (POSTAL *et al.*, 2012; LIGABUE-BRAUN & CARLINI, 2015).

Conforme citado por Carlini e Ligabue-Braun em sua revisão sobre ureases publicada em 2016, a multifuncionalidade das ureases é inegável e deixa claro que toxicidade deve ser considerada como uma propriedade *moonlighting* (CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016).

1.7 *Jaburetox (Jbtx)*

A atividade entomotóxica da isoforma de urease, CNTX, foi identificada como grupo-dependente, onde, apenas insetos com enzimas digestivas do tipo aspártico e cisteíno peptidases eram suscetíveis à ação da proteína (FERREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2000; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; STANISÇUASKI *et al.*, 2005; DEFFERRARI *et al.*, 2011;). A atividade inseticida da CNTX foi caracterizada como dependente da liberação de um peptídeo de 10 kDa chamado pepcanatox (com seu prefixo pep referente a peptídeo e seu sufixo canatox referente à fonte de origem, a CNTX) - esquema ilustrado na Figura 5 (FERREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2000).

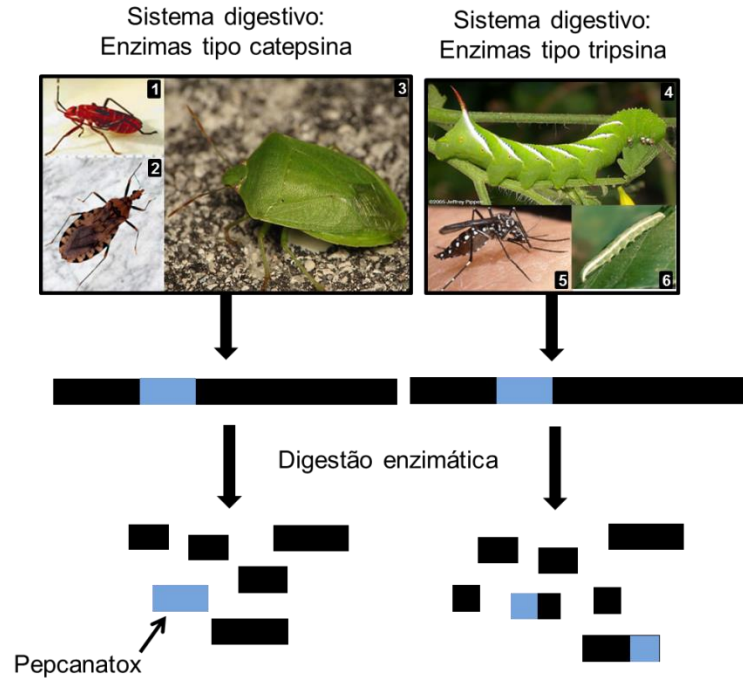


Figura 5: Esquema geral da ação entomotóxica do peptídeo pepcanatox proveniente da Canatoxina. 1. *Dysdercus peruvianus*, 2. *Rhodnius prolixus*, 3. *Nezara viridula*, 4. *Manduca sexta*, 5. *Aedes aegypti*, 6. *Anticarsia gemmatilis*.

Em 2007, Mulinari e colaboradores clonaram um peptídeo recombinante baseado na sequência do pepcanatox utilizando como molde o gene *jbureII* da *C. ensiformis*. O peptídeo expresso foi chamado jaburetox (Jbtx, com o prefixo Jabure proveniente de Jack bean urease e o sufixo tox faz alusão à sua toxicidade) e a sequência de aminoácidos, bem como sua posição localizada na urease podem ser examinadas na Figura 6. Jbtx mostrou-se capaz de causar morte em insetos antes não suscetíveis a ureases, apresentando um espectro de ação maior que para CNTX (STANISÇUASKI *et al.*, 2005; MULINARI *et al.*, 2007; TOMAZETTO *et al.*, 2007).

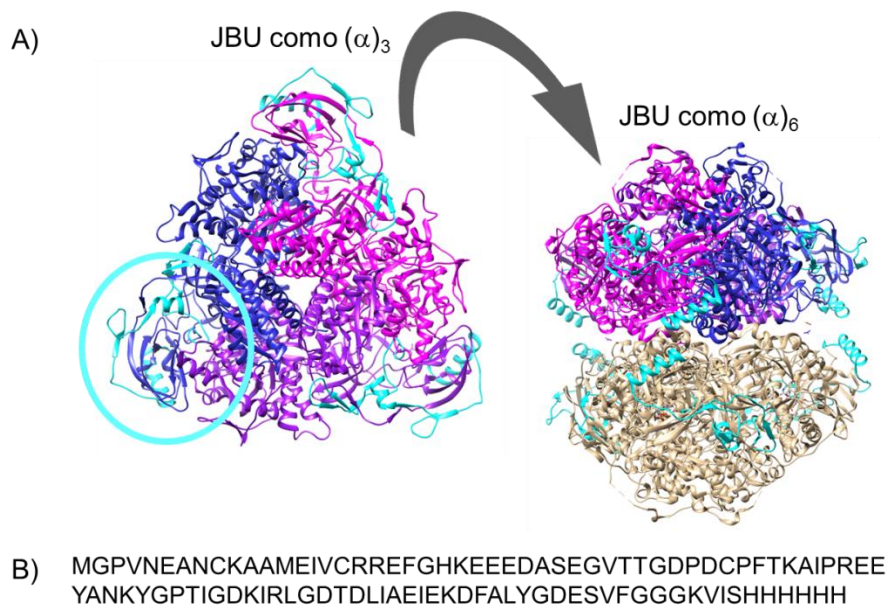


Figura 6: **A)** Representação da estrutura tridimensional da JBU em sua forma mínima ativa (à esquerda) composta por um trîmero $[(\alpha)_3]$, com cada monômero mostrado em azul, lilás e rosa. A sequência correspondente ao Jbtx é mostrada em ciano (evidenciada com um círculo em ciano). No painel à direita temos a representação tridimensional da forma hexamérica $[(\alpha)_6]$ da JBU também identificada em ciano as regiões correspondentes à sequência do Jbtx. Código PDB: 3LA4. **B)** Sequência de aminoácidos do polipeptídeo entomotóxico Jbtx.

Utilizando o inseto modelo para doença de Chagas, *R. prolixus*, verificou-se que o Jbtx aumenta os níveis de guanosina monofosfato cíclico (cGMP) nos tubos de Malpighi, inibindo a secreção e impedindo o transporte de íons transmembrana fazendo com que a secreção de fluidos seja inibida (STANISÇUASKI *et al.*, 2009). Em 2007 foram descritos como sintomas precursores à morte de insetos após injeção do Jbtx, paralisia e movimentos descoordenados de antenas, indicativos de que o sistema nervoso dos insetos seja um alvo para o polipeptídeo (MULINARI *et al.*, 2007; TOMAZETTO *et al.*, 2007). Para estudar esta interação entre o polipeptídeo e o sistema nervoso de insetos, Galvani e colaboradores em 2015, e Fruttero e colaboradores em 2017, utilizaram dois insetos modelo para doença de chagas: *Triatoma infestans* na Argentina e *R. prolixus*, no Brasil (GALVANI *et al.*, 2015; FRUTTERO *et al.*, 2017). Galvani e colaboradores confirmaram os achados comportamentais anteriores, onde os insetos apresentaram movimentos descoordenados das patas e antenas, e também não mostraram capacidade de reação à fuga (GALVANI *et al.*, 2015). Ambos autores foram capazes de confirmar a interação do peptídeo com o sistema

nervoso central por ensaios de imunohistoquímica e microscopia de fluorescência (GALVANI *et al.*, 2015; FRUTTERO *et al.*, 2017).

Jbtx compartilha diversas atividades biológicas com as ureases, dentre as quais temos atividade entomotóxica e também ação antifúngica contra diversos fungos filamentosos e leveduras de importância médica (POSTAL *et al.*, 2012). Dados do nosso grupo sugerem que esta ação inseticida, bem como antifúngica, sejam consequência de uma interação entre o peptídeo e lipídios presentes na membrana (BARROS *et al.*, 2009; MARTINELLI *et al.*, 2014). Esta interação proporcionaria uma desorganização da membrana celular e consequente ruptura da mesma, ocasionando um desequilíbrio no transporte de íons pela formação de canais iônicos na membrana (PIOVESAN *et al.*, 2014). Martinelli e colaboradores, em 2014, demonstraram que assim como o peptídeo inteiro, suas porções N e C-terminal, separadamente, são capazes de interagir com lipídios de forma equivalente ao polipeptídeo completo (MARTINELLI *et al.*, 2014).

Elucidações com respeito à estrutura do polipeptídeo vieram apenas em 2015, quando Lopes e colaboradores determinaram sua estrutura em solução. Baseado na análise estrutural de proteínas, o Jbtx foi determinado como sendo um monômero com massa molecular de 11 kDa quando em solução, e sem uma estrutura tridimensional definida, sendo, portanto, classificando como membro do grupo de proteínas intrinsecamente desordenadas (LOPES *et al.*, 2015). Previamente ao trabalho de Lopes e colaboradores, Martinelli havia determinado por estudos de modelagem molecular que o jaburetox apresentava muito pouca estrutura secundária, chegando a quase 85 % de sua estrutura na forma de *random coil*, conforme mostrado na Figura 7A (MARTINELLI *et al.*, 2014).

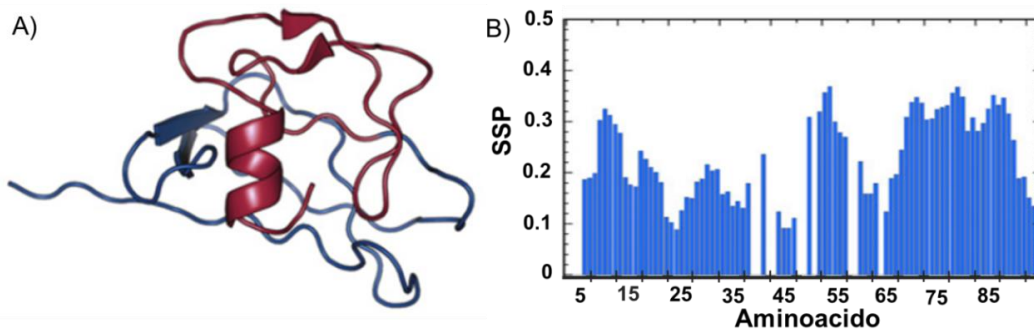


Figura 7: **A)** Estrutura tridimensional do Jbtx obtida por ensaios de dinâmica molecular, após simulação de 500 ns por Martinelli e colaboradores em 2014. Figura adaptada de Martinelli et al. 2014 (MARTINELLI *et al.*, 2014). **B)** Cálculos de propensão à formação de estrutura secundária (SSP) do Jbtx quando em solução executados por Lopes e colaboradores em 2015. Valores entre 0 e +1 são relativos α -hélices enquanto que valores negativos, entre -1 e 0, são típicos para β -folhas. Figura adaptada de Lopes et al. 2015 (LOPES *et al.*, 2015).

Lopes e colaboradores fazendo uso de experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) observaram que Jbtx é formado basicamente por *coils* apresentando uma baixa tendência à formação de α -hélices, conforme mostrado na Figura 7B. A análise de estrutura baseada nos resultados de RMN determinaram a presença de três pequenas regiões com tendência a formar estrutura secundária, entre os aminoácidos V4 e E20 uma pseudo α -hélice, entre R48 e G 56 e as Isoleucinas 63 e 74 duas regiões de *turn-like*, conforme pode ser visualizado na Figura 8A.

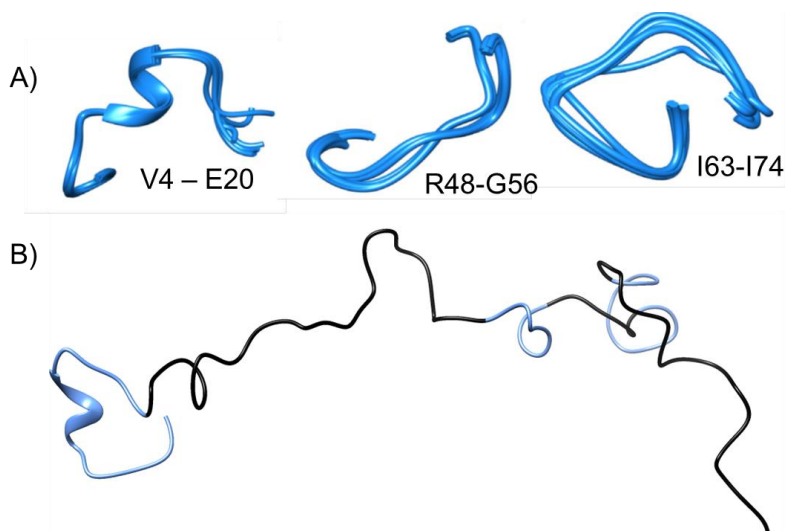


Figura 8: **A)** Regiões presentes na sequência do Jbtx que por análise de RMN apresentam estrutura secundária definida. V4 a E20, R48 a G56 e I63 a I74. Figura adaptada de Lopes et al. 2015 (LOPES *et al.*, 2015). **B)** Estrutura tridimensional do peptídeo extraída do PDB (Código 2MM8) com as regiões mostradas em A evidenciadas em azul.

Na Figura 8B é evidenciada a estrutura tridimensional do Jbtx calculada a partir de dados de RMN, disponível no banco de dados de proteínas com código PDB 2MM8. Acredita-se que as porções com tendência a estruturar-se (Figura 8A) podem ser as responsáveis pelas atividades identificadas para o polipeptídeo. Sendo uma IDP, o Jbtx não apresenta estrutura secundária (Figura 8A), nem mesmo terciária (Figura 8B) definida quando em solução. Entretanto, ao entrar em contato com seu ligante alvo presente na membrana celular de insetos ou fungos, poderia adquirir uma conformação tridimensional, passando pela transição desordenada-ordenada, típica de IDPs (PIOVESAN *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2015;).

1.8 Urease de *Proteus mirabilis* - PMU

A urease de *P. mirabilis* tem sua expressão induzida pela presença de ureia, e seu operon compreende oito genes contíguos, conforme demonstrado na Figura 9.

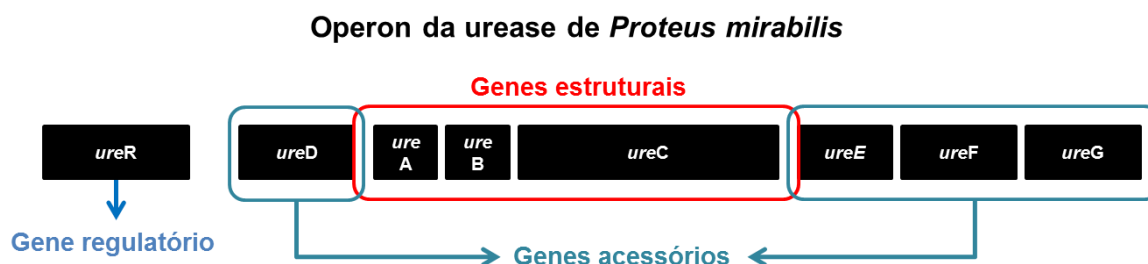


Figura 9: Organização genética para o cluster gênico da urease de *Proteus mirabilis* (MOBLEY *et al.*, 1995).

O operon da PMU é composto pelos genes estruturais *ureA*, *B* e *C*, os quais codificam as subunidades α (UreA), β (UreB) e γ (UreC) da enzima, com 11, 12,2 e 61 kDa, respectivamente. Quando em solução, a sua forma nativa apresenta-se como um trímero de trímeros $(\alpha\beta\gamma)_3$, com massa molar de aproximadamente 280 kDa (JONES & MOBLEY, 1987; COKER *et al.*, 2000). Os genes acessórios *ureD*, *ureE*, *ureF* e *ureG* codificam proteínas acessórias responsáveis pela montagem da PMU. As proteínas UreD, UreE e UreF estão envolvidas na inserção do níquel na apoenzima, dando origem à proteína enzimaticamente ativa (MOBLEY *et al.*, 1995). O gene *ureG* é responsável pela expressão de uma GTPase essencial para ativação da enzima. Quando uma das sequências gênicas codificantes para as proteínas acessórias, UreE, UreF ou UreG é removida do

DNA, atividade enzimática da PMU não é mais detectável (SRIWANTHANA *et al.*, 1993). O oitavo gene que compõe o operon da urease de *P. mirabilis* é o fator de transcrição *ureR*, que codifica uma proteína regulatória, responsável por ativar a transcrição dos genes estruturais e acessórios na presença de ureia (DATTELBAUM *et al.*, 2003). Há evidências de que a UreR liga-se à ureia presente no trato urinário causando alterações no *folding* da proteína. A alteração na estrutura tridimensional da UreR proporciona interação com uma porção do DNA entre os genes *ureD* e *ureR* ativando a expressão do operon da urease (DATTELBAUM *et al.*, 2003; POORE & MOBLEY, 2003).

Conforme exposto anteriormente, a PMU é considerada um fator de virulência, sem o qual a bactéria não é capaz de causar ou manter a infecção no hospedeiro. De acordo com Johnson e colaboradores, linhagens urease-negativa desta bactéria são incapazes de estabelecer infecção nos rins de camundongos (JOHNSON *et al.*, 1993).

Sabe-se até o momento que este crítico fator de virulência está diretamente associado a urolitíases, pielonefrite, coma hepático, incrustação de cateteres e, ainda, encefalopatia hepática a partir da intoxicação por amônia liberada devido à sua atividade enzimática (MOBLEY & HAUSINGER, 1989). A hidrólise da ureia promove um aumento no pH da urina, podendo chegar a valores superiores a 9,0 (IRWIN *et al.*, 2013). Com o aumento do pH, de 6,5 a 9,0, sais antes solúveis na urina passam a precipitar, formando cálculos e consequentes danos teciduais. Os cálculos mais comumente encontrados são compostos pelos minerais estruvita ($(\text{MgNH}_4\text{PO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e carbonato hidróxi-apatita ($[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4\text{CO}_3\text{OH})_6] \cdot \text{OH}$) (JONES & MOBLEY, H. L T, 1989; FOLLMER, 2010), o mecanismo de precipitação destes sais pode ser visualizado na Figura 10.

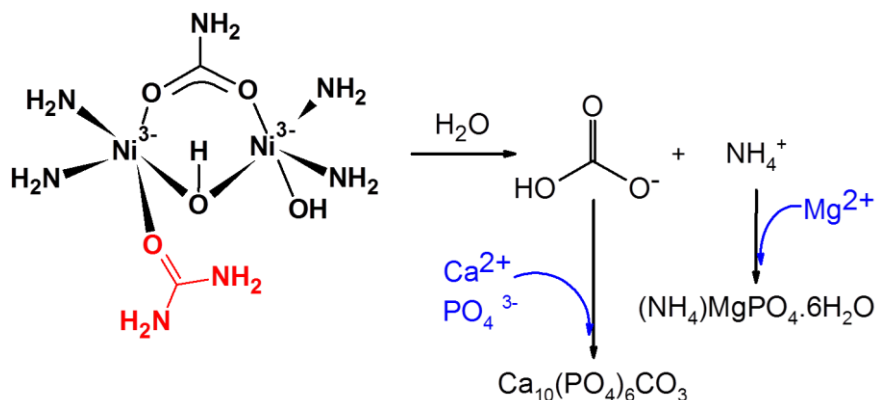


Figura 10: Esquema geral da reação enzimática da PMU e participação dos produtos ácido carbônico e amônia na formação de cristais de fosfato de cálcio e magnésio.

A precipitação de cristais de fosfato de cálcio e de magnésio agregados às bactérias protegem suas colônias de possíveis agentes terapêuticos, mantendo-as de forma latente. Contudo, assim que as bactérias são novamente expostas ao meio, reiniciam ou continuam o processo de infecção. A incrustação de cateteres é também facilitada pela presença de cristais de sais agregados às bactérias, auxiliando na aderência destas ao polímero utilizado para confecção do cateter. Os cálculos, o biofilme formado, ou ainda a combinação destes pode ocasionar um bloqueio parcial, ou até mesmo total do trato urinário causando uma retenção da urina na bexiga, o que leva à distensão da mesma e severa dor ao paciente. Nos casos mais graves, a urina contaminada sofre refluxo até os rins causando pielonefrite aguda (KUNIN, 1997; STICKLER & MORGAN, 2006).

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta tese é compreender a ação *moonlighting* das ureases.

2.1 *Objetivos específicos*

- Purificar a PMU recombinante a partir do plasmídeo pMID 1010 composto pelo operon completo da PMU
- Construir plasmídeos contendo os genes *ureA*, *ureB* e *ureC* de *Proteus mirabilis*, separadamente
- Purificar cada uma das proteínas recombinantes expressas pelos genes *ureA*, *ureB* e *ureC*
- Verificar se a urease (PMU) apresenta atividades já descritas para outras ureases
- Determinar se as subunidades PmUre γ , PmUre β e/ou PmUre α compartilham algumas das atividades biológicas identificadas para ureases
- Purificar o polipeptídeo entomotóxico jaburetox (Jbtx) e construir diferentes estruturas lipídicas que mimetizem membrana celular
- Avaliar a se há mudança de estrutura do jaburetox quando em presença de micelas compostas por SDS, grandes vesículas unilamelares (LUVs) ou bicelas

Capítulo 1

Capítulo 1: The non-enzymatic toxicity of *Proteus mirabilis* urease as revealed by its isolated subunits

Valquiria Broll, Fernanda C. Lopes, Natalia R. Moyetta, Anne Helene S. Martinelli,
Leonardo L. Fruttero, Diogo R. Demartini, Rodrigo Ligabue-Braun, Celia R. Carlini.

Neste capítulo apresentamos o artigo submetido atualmente à revista Nature Chemical Biology. Este artigo é composto pelos estudos executados envolvendo a urease de *Proteus mirabilis* e suas subunidades estruturais como modelo para um maior entendimento das atividades *moonlighting* das ureases. A PMU, assim como as outras ureases já descritas, é uma proteína *moonlighting*. Esta característica parece estar correlacionada majoritariamente à subunidade β da mesma, à qual apresenta a maior gama de atividades identificadas de forma independente de atividade ureolítica das ureases. Identificando as regiões da urease responsáveis por suas atividades independentes de sua atividade enzimática e Com os dados obtidos neste trabalho podemos aprofundar os nossos conhecimentos quanto ao envolvimento das ureases na patogênese bacteriana.

1 **Title: The non-enzymatic toxicity of *Proteus mirabilis* urease as**
2 **revealed by its isolated subunits**

3 **Authors:** Valquiria Broll^{1,*}, Fernanda C. Lopes^{1,2}, Natalia R. Moyetta², Anne Helene S. Martinelli³,
4 Leonardo L. Fruttero^{1,2}, Diogo R. Demartini¹, Rodrigo Ligabue-Braun^{1,2*}, Celia R. Carlini^{1,2,*}.

5
6 **Affiliations:** ¹*Center of Biotechnology, Graduate Program in Cellular and Molecular Biology,*
7 *Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;* ²*Brain Institute -*
8 *InsCer, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil;*
9 ³*Department of Biophysics, Biosciences Institute, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.*

10

11 *Corresponding authors:

12 Valquiria Broll

13 E-mail: valbroll@ufrgs.br

14

15 Rodrigo Ligabue-Braun

16 E-mail: ligabue.braun@gmail.com

17

18 Celia R. Carlini

19 E-mail: celia.carlini@pucrs.br

20

21 **One sentence summary:**

22 Mapping of the fungitoxic, insecticidal, and platelet-interacting activities of a trimeric
23 urease.

24 **Abstract:**

25 BACKGROUND: Ureases are moonlighting proteins displaying non-catalytic properties,
26 including platelet activation, antifungal and entomotoxic effects. The structure-activity
27 mapping of these properties is poorly understood. *Proteus mirabilis* urease consists of
28 three subunits, PmUre α , PmUre β and PmUre γ . OBJECTIVES: To obtain recombinant
29 isolated subunits of this urease and evaluate their biological activities. RESULTS: The
30 holourease promoted platelet aggregation, and toxicity in fungal and insect models. In a
31 way similar to Jaburetox, a polypeptide derived from a plant urease, PmUre β showed
32 the highest toxicity against yeasts and insects. PmUre α only bound to platelet
33 membranes whereas PmUre β activated platelets. Bioinformatics analyses revealed
34 gene/segment duplication and their evolutionary divergence among ureases.
35 CONCLUSIONS: Our findings show that PmUre β (and probably its counterparts in
36 other ureases) carries most of the non-enzymatic activities of these proteins.

37

38 **Main text:**

39 **INTRODUCTION**

40 Ureases are known as nickel-dependent enzymes that catalyze the hydrolysis of
41 urea into ammonia and carbon dioxide. Ureases are also moonlighting proteins that,
42 besides their enzymatic activity, display many other unrelated biological properties (1–
43 3). Protein multifunctionality probably reflects the selective pressure for organisms’
44 increasing complexity without genome changes (3). The moonlighting phenomenon is
45 particularly relevant in microbiology (4). Ureases are virulence factors of different
46 pathogenic bacteria such as *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*,
47 *Helicobacter pylori*, to cite a few (5). Plant and fungal ureases are formed by trimers or
48 hexamers of monomeric subunits, while bacterial ureases can be trimers, hexamers, or
49 dodecamers, with “monomers” composed by two or three subunits (6). The ammonia-
50 independent toxicity of ureases was initially investigated for canatoxin, an isoform of
51 urease of the jack bean plant *Canavalia ensiformis*. Injected intraperitoneally into mice

52 and rats, this urease causes convulsions and death (5). Both canatoxin, as well as the
53 major urease isoform of *C. ensiformis*, the so-called jack bean urease (JBU), promote
54 exocytosis in several cell types, activate blood platelets, display neurotoxic and pro-
55 inflammatory activities, and induce insecticidal and fungitoxic effects (5). Most of these
56 properties, found to be unrelated to their enzyme activities, were also observed for other
57 plant (soybean, cotton) ureases and for bacterial enzymes (*Bacillus pasteurii*,
58 *Helicobacter pylori*) (5).

59 An internal sequence of JBU (91 out of the 840 amino acids in its monomer) was
60 pinpointed as responsible for its insecticidal activity, later represented by a recombinant
61 polypeptide called jaburetox (5, 7). In addition to its entomotoxicity against different
62 insects, jaburetox is also deterrent to filamentous fungi and yeasts (5). The toxic
63 properties of ureases however are not entirely dependent only on their “jaburetox-like”
64 internal sequence. For instance, this sequence is partly missing in all microbial ureases,
65 including those already shown to have entomotoxic activity (5). Consistent with this
66 hypothesis, fungitoxic peptides distinct from Jaburetox were obtained from JBU by
67 papain hydrolysis (8), and jaburetox was found not to be lethal given orally or injected
68 into rats and mice (7). Altogether, these data suggest that more than one protein
69 “domain” accounts for the non-enzymatic activities of ureases.

70 *Proteus mirabilis*, an opportunistic pathogen of the urinary system, produces large
71 amounts of a urease (PMU) well recognized as a virulence factor (9, 10). PMU is a
72 trimeric protein, with “monomers” composed by three subunits, PmUreA or PmUrey
73 (11.0 kDa), PmUreB or PmUreβ (12.2 kDa) and PmUreC or PmUreα (66.0 kDa),
74 encoded by the structural genes *ureA*, *ureB* and *ureC*, respectively. PMU enables the
75 pathogen to hydrolyze urea into carbon dioxide and ammonia, which helps bacterial
76 survival by increasing urine’s pH and N availability. On the other hand, ammonia is
77 toxic for host cells, causing tissue damage (10), and causes urine’s alkalization leading
78 to precipitation of salts and consequent urolithiasis (11).

79 Structure *versus* activity studies on the moonlighting properties of ureases are
80 scarce. There are only a few published reports on biological properties of isolated urease
81 subunits, and these studies are restricted to the *Helicobacter pylori* urease (HPU). This
82 urease consists of two chains, HpUreβ or HpUreA (27 kDa), representing a fusion of
83 PmUrey and PmUreβ, and HpUreα or HpUreB (61 kDa), which is homologous to
84 PmUreα and contains the ureolytic active site. HpUreα was reported to interact with
85 CD74 on T cells and with Th17 lymphocytes (12). An anti-HpUreα antibody directed

86 towards platelet glycoprotein IIIa was shown to be implicated in thrombocytopenic
 87 purpura (13). Finally, HpUre β was found to reach the cell nucleus and to cause
 88 morphological changes in gastric epithelial cells (14).

89 In this work, we employed molecular biochemistry and cell biology approaches to
 90 study PMU and each of its isolated subunits aiming to get structural insights on the
 91 biological activities of this moonlighting protein.

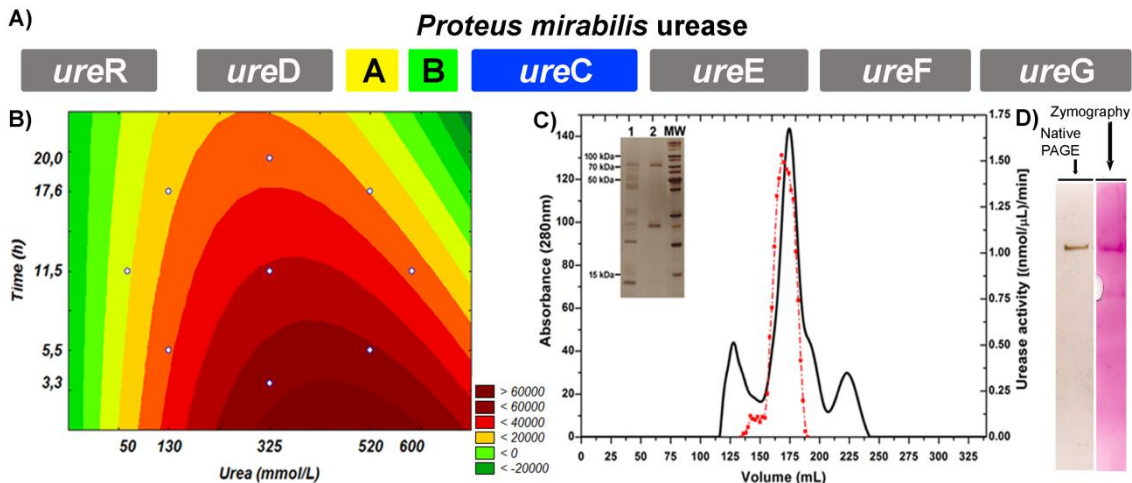
92

93 RESULTS

94 Purification of recombinant PMU

95 The recombinant PMU obtained by heterologous expression (Fig. 1A and B) had
 96 no tag to facilitate its isolation. The purified protein was obtained in three steps: two ion
 97 exchange chromatographies followed by a size exclusion column. The gel filtration
 98 chromatographic pattern is shown in Fig. 1C. Purified PMU was recovered with a
 99 purification factor of ~64 % and a yield of ~11 %.

100 The homogeneity of purified PMU was assessed by native-PAGE and western
 101 blots (Fig. 1D) and zymographies indicated an enzymatically active purified protein
 102 (Fig. 1D).



103 **Figure 1:** *Proteus mirabilis* urease **A)** PMU operon. The structural genes *ureA*, *ureB*
 104 and *ureC* are represented in yellow, green and blue, respectively; the regulatory gene
 105 *ureR* and the accessory genes (*ureD*, *ureE*, *ureF*, *ureG*) are shown in grey. **B)** Response
 106 surface curve of optimized PMU expression. Higher enzymatic activities correspond to
 107 warmer colors. **C)** PMU purification. Superdex S200 gel filtration profile in the last step
 108 purification; absorbance at 280 nm (black), ureolytic activity (red). Inset: SDS-PAGE of
 109 fraction previous to gel filtration (1); pool of active fractions (2). **D)** *Left:* Native-PAGE
 110 of PMU stained by silver nitrate. *Right:* Zymography of PMU.

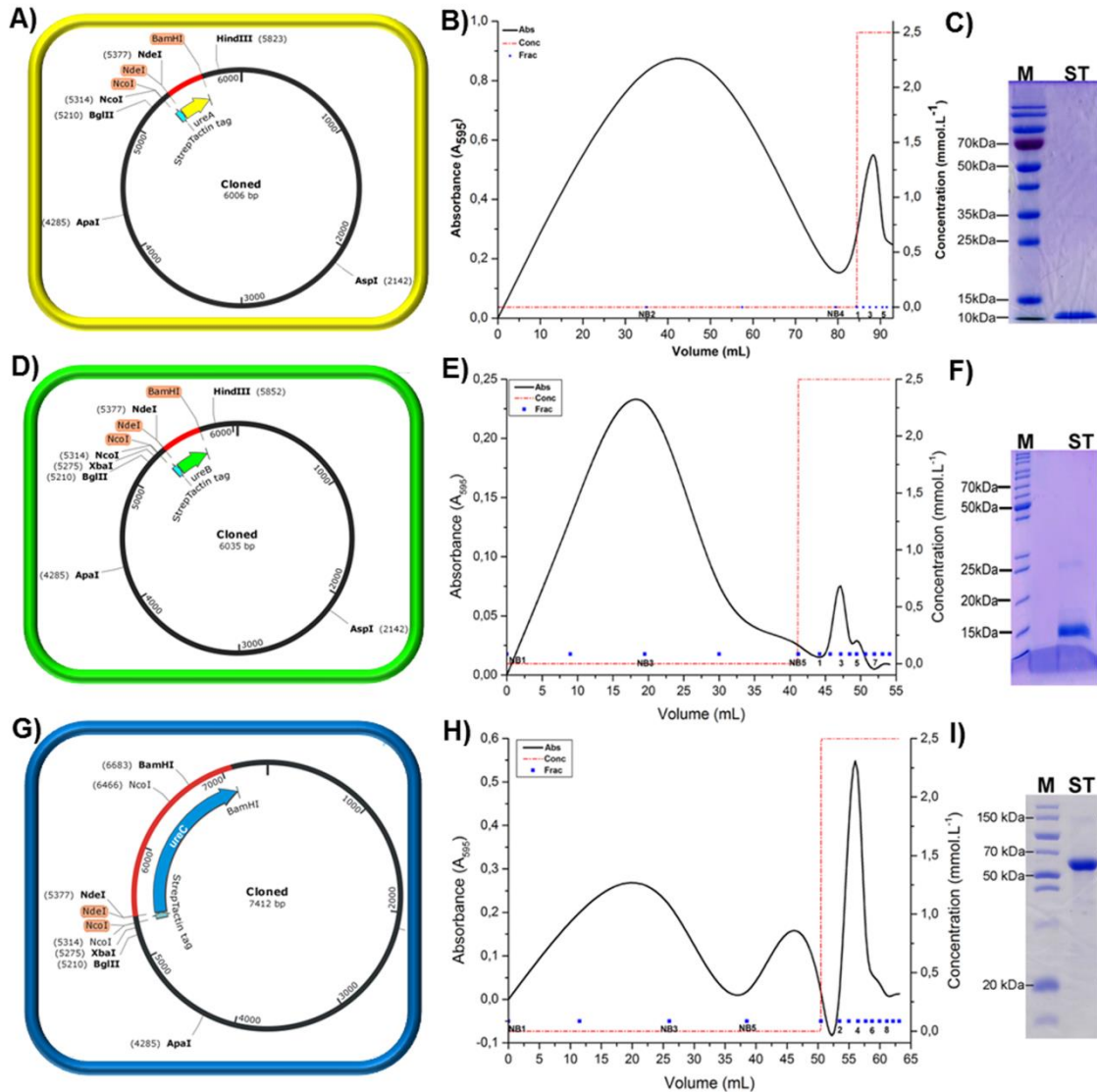
111

112

Recombinant PMU subunits: PmUrey, PmUreβ and PmUrea

113

114 Figure 2 (A, D and G) shows sketches of the pET15b plasmids encoding each of
115 the PMU's subunits. After expression and solubilization, the Strep-tagged subunits were
116 successfully purified by affinity chromatography (Fig. 2B, E and H) as revealed by
117 SDS-PAGE analyses (Fig. 2C, F and I).



118 **Figure 2:** Production of PMU recombinant subunits PmUrey, PmUreβ and PmUrea.
119 Strep-tagged recombinant PMU subunits were purified by affinity chromatography in
120 StrepTactin resin and elution was performed with 2.5 mM D-desthiobiotin added to the
121 eluent. **A)** Plasmid construct encoding PmUrey (PmUreA). **B)** StrepTag column profile
122 of PmUrey purification. **C)** SDS-PAGE of purified PmUrey. **D)** Plasmid construct
123 encoding PmUreβ (PmUreB). **E)** StrepTag column profile of PmUreβ purification. **F)**

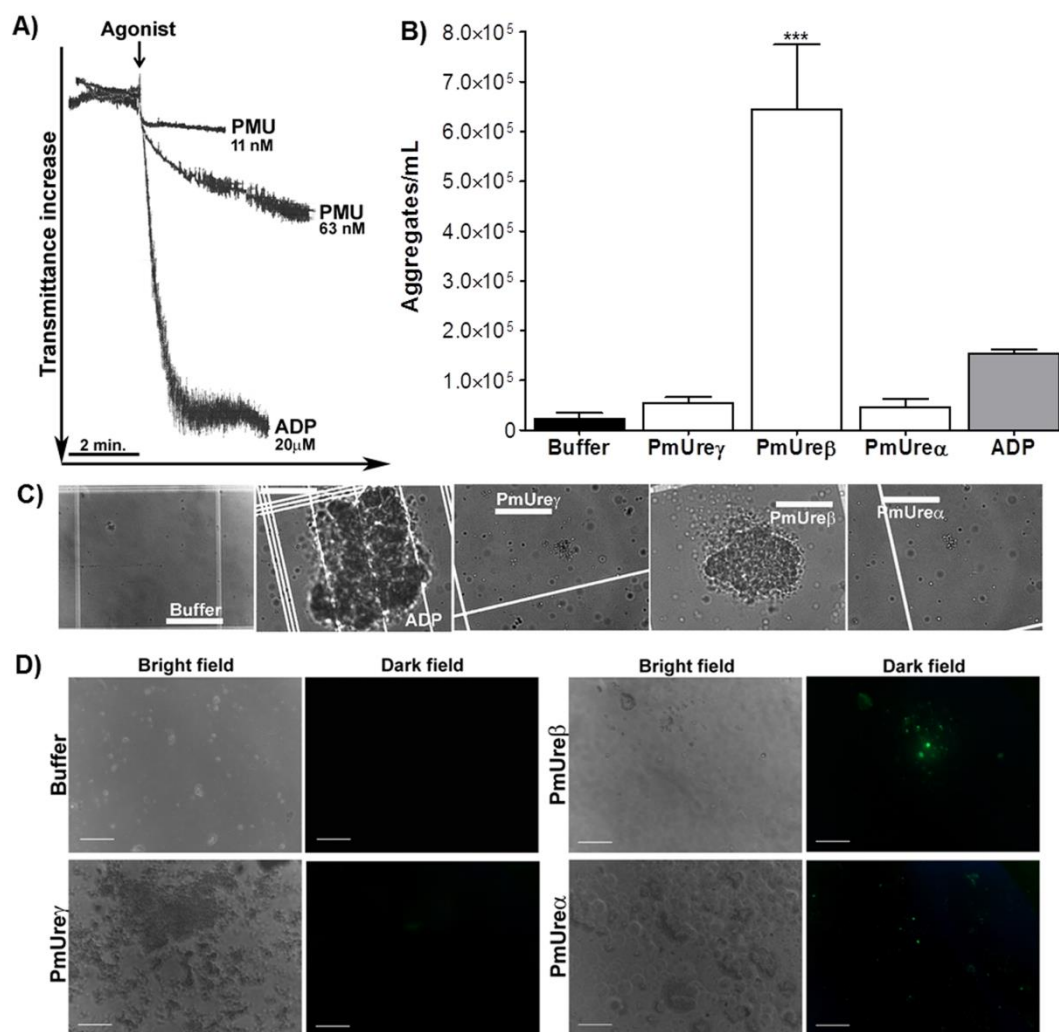
124 SDS-PAGE of purified PmUre β . **G**) Plasmid construct encoding PmUre α (PmUreC). **H**)
125 StrepTag column profile of PmUre α purification. **I**) SDS-PAGE of purified PmUre α .
126 The constructs were drawn using SnapGene version 3.3. (M) molecular mass markers;
127 (ST) purified PMU subunits (pooled fractions of the StrepTag columns).

128

129 **Platelet aggregation by PMU and its subunits**

130 We have shown that ureases from different sources are able to activate platelets,
131 inducing exocytosis of their dense granules (5). Here PMU was tested for human
132 platelet aggregating activity with a turbidimetric assay. Figure 3A shows that PMU (17
133 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 63 nM) induced a response of about 30% of that promoted by ADP (20 μM), a
134 physiological platelet agonist. PMU-induced aggregation had a slower rate when
135 compared to platelet's response to ADP.

136 We then tested PMU isolated subunits for their ability to aggregate human
137 platelets. Although no aggregation could be observed in turbidimetric assays, the
138 microscopic observation of platelets allowed visualization of aggregates formed in the
139 presence of PMU subunits. PmUre β produced significantly more and bigger platelet
140 aggregates than did PmUre γ or PmUre α (Fig. 3B and C). FITC-conjugated subunits
141 were used to visualize the platelets aggregates (Fig. 3D) and revealed a stronger labeling
142 of platelets with PmUre β (8.8 μM) followed by PmUre α (1.6 μM). No interaction was
143 detected for PmUre γ and human platelets.



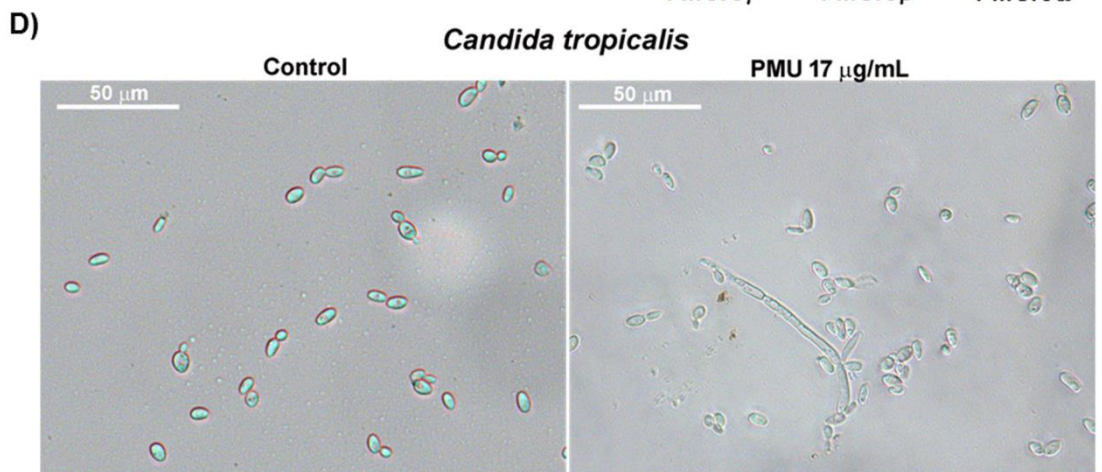
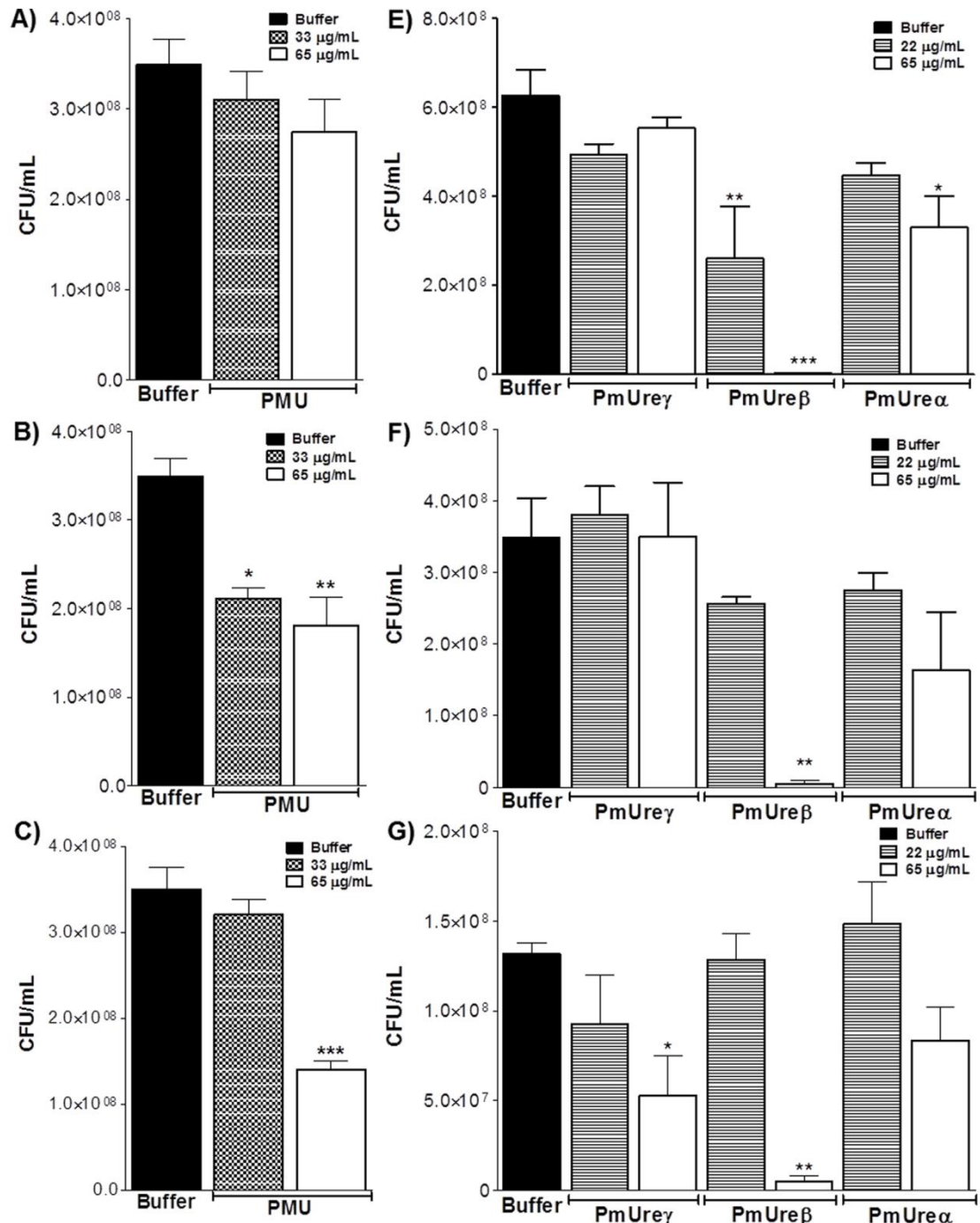
144 **Figure 3:** *Proteus mirabilis* urease and its subunits induce platelet aggregation. **A)** The
 145 agonists (PMU or ADP) were added to a platelet-rich plasma suspension and the
 146 aggregation response (shown as a decrease in light transmittance) was monitored for 5
 147 min. The figure shows superimposed tracings for PMU (11 and 63 nM) or 20 μ M ADP.
 148 Typical results. **B)** Platelets were incubated with PMU subunits ($108 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 1 h
 149 on a rocking platform, centrifuged, fixed with formaldehyde and the number of
 150 aggregates per mL was counted in a Neubauer chamber. Buffer: 50 mM Tris-HCl, pH
 151 7.5. PmUre γ (9.8 μ M), PmUre β (8.8 μ M) and PmUre α (1.6 μ M). Positive control: ADP
 152 20 μ M. **C)** Microscopic view of typical aggregates. An aggregate was defined as a
 153 cluster of 5 or more cells. Magnification: 200X, bar: 400 μ m. Results are mean \pm
 154 S.E.M, N=3, *** $p \leq 0.01$. **D)** Aggregation induced by vortexing platelets with FITC-
 155 labeled subunits of PMU ($108 \mu\text{g mL}^{-1}$) as agonist. Buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.5.
 156 PmUre γ (9.8 μ M), PmUre β (8.8 μ M) and PmUre α (1.6 μ M). Typical results
 157 (magnification of 50X, bars: 100 μ m).

158

159 **Toxicity of PMU and its isolated subunits against yeasts**

160 The antifungal activity of recombinant PMU was tested using three *Candida*
161 species. Incubation for 24 h with PMU led to a dose-dependent decrease of the
162 proliferation rates of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* (Fig. 4A, B and C). Moreover,
163 PMU (63 nM, 48 h) induced formation of pseudo-hyphae in *C. tropicalis*, a morphology
164 change indicative of stress in yeasts (Fig. 4D).

165 PMU isolated subunits were tested on *S. cerevisiae*, *C. albicans* and *C.*
166 *parapsilosis* (Fig. 4E, F and G). Proliferation rates of the three yeast species decreased
167 in the presence of 5.3 μM PmUre β (65 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Moreover, inhibition of *C. albicans*
168 was observed for PmUre α (1 μM) (Fig. 4E) whereas PmUre γ (6 μM) inhibited only *S.*
169 *cerevisiae*.



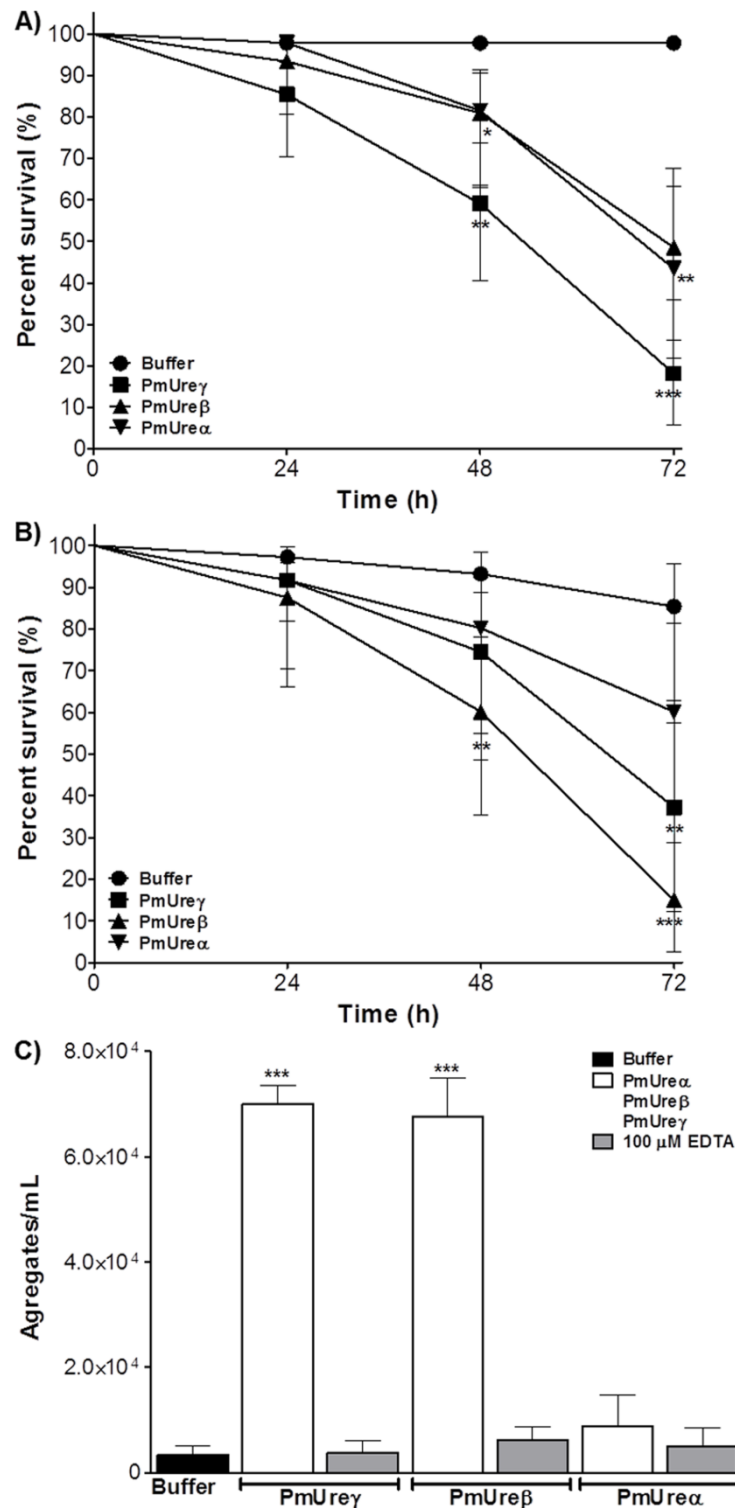
170 **Figure 4:** Antifungal effect of *Proteus mirabilis* urease and of its subunits on yeasts.
171 Recombinant PMU (33 and 65 $\mu\text{g mL}^{-1}$, corresponding to 120 and 240 nM,
172 respectively) was incubated for 24 h at 28 °C with the yeasts and then colony forming
173 units (CFU) were determined by the drop plate method. **A)** *Candida albicans*. **B)**
174 *Candida parapsilosis*. **C)** *Candida tropicalis*. **D)** left panel shows control yeasts and
175 right panel shows *C. tropicalis* cells treated with PMU (63 nM) for 24 h, under optic
176 microscopy (magnification 100 X, bars: 50 μm). Yeasts were incubated with PMU
177 subunits (22 and 65 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for 24 h at 28 °C, then colony forming units (CFU) were
178 determined by the drop plate method. Molar concentrations: PmUrey, 2 and 6 μM ;
179 PmUre β , 1.8 and 5 μM ; PmUre α : 0.3 and 1 μM . **E)** *Candida albicans*. **F)** *Candida*
180 *parapsilosis*. **G)** *Saccharomyces cerevisiae*. Buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Results
181 are mean \pm S.E.M, N=3, *, $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.02$; *** $p \leq 0.01$.

182

183 **Entomotoxicity of PMU isolated subunits**

184 As isolated urease's subunits have never been tested on insects before, to
185 investigate whether PMU subunits display insecticidal effect, 5 μL of 163 $\mu\text{g mL}^{-1}$
186 solutions of each subunits were injected into the hemocoel of *Dysdercus peruvianus*
187 (*ca.*27 ng protein mg^{-1} body weight). All PMU subunits were insecticidal upon
188 injection, and PmUrey promoted the highest mortality (*ca.* 80%) after 72 h as shown in
189 Fig. 5A. The subunits were also tested orally in *D. peruvianus*, indicating a dose- and
190 time-dependent lethal effect. PmUre β induced the highest lethality (90%) followed by
191 PmUrey (Fig. 5B). PmUre α was not lethal given orally to *D. peruvianus*.

192 The *in vitro* entomotoxicity of PMU's subunits was evaluated by testing their
193 ability to induce aggregation of insect hemocytes. For that, the hemolymph of *Rhodnius*
194 *prolixus* nymphs was incubated with the separated subunits at 2.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. PmUre β
195 (180 nM) and PmUrey (200 nM) were able to significantly aggregate hemocytes.
196 Inhibition by EDTA (100 μM) indicated a cation-dependent process (Fig. 5C). PmUre α
197 (33 nM) had no effect on *R. prolixus* hemocytes *in vitro*.



198 **Figure 5:** Entomotoxic activity of PMU isolated subunits. **A)** Survival rates of *D.*
 199 *peruvianus* after hemocoel injection of 5 μ L buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5; negative
 200 control) or of 5 μ L solutions containing doses of 0.27 ng of PMU subunits per mg of
 201 insect body weight. **B)** Survival rates of *D. peruvianus* fed on buffer (50 mM Tris-HCl
 202 pH 7.5) or on solutions of PMU subunits to give a dose of 0.27 ng of per mg of insect
 203 body weight. Results are mean \pm S.E.M, N=3. ** $p \leq 0.02$; *** $p \leq 0.01$. **C)** PMU

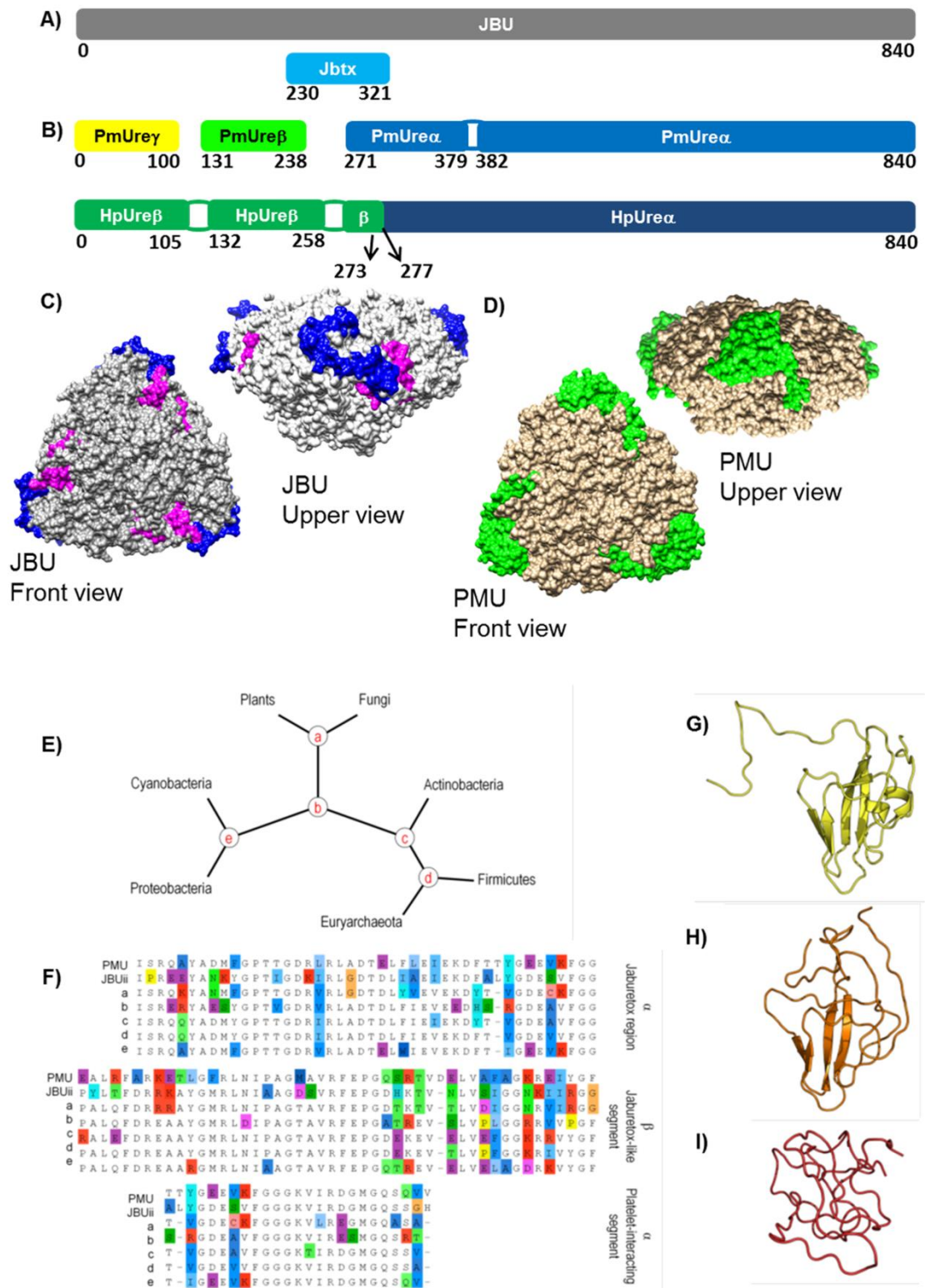
204 isolated subunits induce *in vitro* aggregation of *R. prolixus* hemocytes through a
205 calcium dependent process. White bars indicate the number of hemocytes aggregates
206 formed *in vitro* after incubation (1 hour) with PMU subunits at $2.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (PmUrey:
207 200 nM, PmUre β : 180 nM, PmUre α : 33 nM) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. Gray bars
208 show the number of aggregates formed when 100 μM EDTA was added to the PMU
209 subunits solutions. Control (black bar) hemocyte aggregation was carried out in buffer
210 alone (50 mM Tris-HCl pH 7.5).

211

212 **Gene or segment duplication in ureases**

213 PMU was inspected for internal sequence repeats, aiming to detect possible
214 duplications of functionally relevant regions. The amino acid sequence of PMU
215 subunits, PmUrey, PmUre β and PmUre α are collinear to segments 1-100, 131-238, and
216 271-840 of the JBU molecule, respectively (Fig. 6A and B). Two similar regions were
217 identified between the PmUre β and PmUre α subunits, when comparing PMU and the
218 prototypical urease JBU as reference. One similarity pair encompasses a “jaburetox-
219 like” segment in PmUre α (sequence 268-316 in JBU) and its homologous in PmUre β
220 (177-229 in JBU). Jaburetox itself corresponds to the sequence 230 to 321 in JBURE-II,
221 one of JBU’s isoforms in *C. ensiformis* (5). The second pair encompasses a region
222 including the last residues of the “jaburetox-like” segment in PmUre α (segment 307-331
223 in JBU) and its homologous in PmUre β (186-210 in JBU). These regions were aligned
224 to their putative ancestor sequences, revealing their evolutionary conservation (Fig. 6E
225 and F).

226 A molecular model for PMU was structurally validated, showing quality
227 equivalent to the template used. To inspect PmUre β for possible disordered behavior,
228 similar to what was observed for jaburetox (16), molecular dynamics simulations were
229 performed under two conditions (Fig. 6G). As depicted for jaburetox in JBU, PmUre β is
230 also well exposed at the surface of PMU (Fig. 6C and D). From simulations under
231 physiological conditions (310 K, 100 ns), loss of secondary structure was observed,
232 while preserving (or with a slight increase) the β -sheet content, with an overall 36% of
233 secondary structure elements in the protein (Fig. 6H). Simulations to evaluate structural
234 stability (498 K, 100 ns) indicated complete loss of secondary structure elements (16%
235 structure elements overall, 0% at the final frames of simulation) (Fig. 6I).



236 **Figure 6:** Comparisons of *P. mirabilis* urease. **A)** JBU single subunit is represented as
 237 gray bar and jaburetox in light blue. **B)** PMU subunits: PmUrey (yellow), PmUreβ
 238 (green) and PmUreα (blue). Below, HPU is represented with its UreA chain (HpUreβ)
 239 in dark green and its UreB chain (HpUreα) in dark blue. The numbers refer to the amino
 240 acid positions in JBU sequence. Additional information in Figures S2 and S3,

241 respectively. **C**); **D**) trimeric forms of JBU (PDB 3LA4) and PMU (modeled), in front
242 (left) and side (right) views. **C**) jaburetox's N-terminal half in blue and its C-terminal in
243 pink. **D**) PmUre β depicted in green. **E**; **F**) Comparison of duplicated segments among
244 ureases and their putative ancestors. **E**) "a"- "e" indicate ancestor urease sequences for
245 the nodes shown in the simplified phylogenetic tree. **F**) alignments of "jaburetox-like"
246 sequences in *C. ensiformis* JBURE-II urease (JBUii), PMU (*Proteus mirabilis* urease),
247 and the most likely ancestor sequences from the nodes of the phylogenetic tree. Colors
248 highlight differences from major rule consensus. **G**, **H**; **I**) Conformation of PmUre β and
249 molecular dynamics simulations. **G**) Native PmUre β (modeled); **H**); **I**) Isolated PmUre β
250 after 100 ns under normal conditions (H) and under protein disturbing conditions (I).

251

252 **DISCUSSION**

253 In this work, we aimed to investigate biological activities of PMU and of its
254 subunits. To obtain enough quantities of recombinant PMU for bioassays, RSM (17)
255 was applied to increase its production by *E. coli* cells. The urea concentration (500 mM)
256 set to achieve optimized expression levels of urease (Fig. 1B), matches that of normal
257 urine, which allows activation of *P. mirabilis* UreR in the urease operon and triggers
258 PMU expression (18). Conventional chromatographic steps were employed to obtain the
259 enzymatically active recombinant PMU (Fig. 1C). The isolated subunits of PMU were
260 successfully cloned and expressed in *E. coli* cells. While recombinant PmUre γ was
261 found in the *E. coli*'s soluble fraction, PmUre β and PmUre α were produced as inclusion
262 bodies. The three Strep-tagged PMU subunits were purified by affinity chromatography
263 (Fig. 2).

264 This is the first report of heterologous expression of the subunits of a tri-chained
265 microbial urease followed by testing of their insecticidal and fungitoxic properties. Our
266 previous work focused mainly the entomotoxic properties of single-chained plant
267 ureases (5). Nonetheless, we have reported that the insecticidal activity of
268 entomopathogenic *Photorhabdus* spp. bacteria correlates positively with their urease's
269 production (19). The insecticidal activity of *Yersinia pseudotuberculosis* urease to fleas
270 was also reported (20). Here we used *D. peruvianus* to demonstrate the insecticidal
271 effect of isolated PMU's subunits. PmUre γ was more toxic when injected, whereas
272 PmUre β administered orally had the highest toxicity (Fig. 5A and B). Canatoxin, an
273 isoform of JBU, was previously shown to have more than one insecticidal domain (21).
274 As part of the entomotoxic mode of action, JBU and Jaburetox interfere on the immune

275 system of *R. prolixus*, inducing hemocyte aggregation, detected both *in vivo* and *in*
276 *vitro*, rendering the insect more susceptible to bacterial infections (15, 22). Here similar
277 approaches were used to demonstrate that PmUre γ and PmUre β triggered a cation-
278 dependent hemocyte aggregation (Fig. 5C), similar to what was observed for JBU and
279 Jaburetox (15, 22).

280 Plant and bacterial ureases, regardless of their enzyme activity, promote platelet
281 activation in the nanomolar range (5). PMU induced human platelet aggregation in
282 nanomolar concentrations (Fig. 3A), causing a slower response than that provoked by
283 the platelet agonist ADP. A slower kinetics of HPU-induced aggregation of rabbit
284 platelets has also been observed (23), suggesting that this might be a trend of platelets'
285 response to microbial ureases. Testing of the isolated subunits demonstrated that only
286 PmUre β is able to induce aggregation of human platelets (Fig. 3B and C). However,
287 when using fluorescently labeled proteins, we could see that both PmUre β and PmUre α
288 bound to platelet membranes. The maximal molar concentration of PmUre α that could
289 be tested (Fig. 3B) was 5.5-fold lower than that of PmUre β , what may explain the less
290 intense labeling of platelets and lack of platelet aggregation-inducing activity. PmUre γ
291 did not interact with platelets. Altogether, these findings indicate that PMU activates
292 platelets (as do all other ureases we have tested so far) and this effect involves more
293 than one structural domain, one represented by PmUre β while the other is present in the
294 PmUre α subunit. Our data suggest that ureases somehow interact with the platelets
295 membrane acting as (or mimicking) an agonist, probably collagen, thereby activating
296 platelets and leading to aggregation. It has suggested that the amino acid sequence
297 IRRET present in the α subunit of PMU "mimics" the sequence LRREI found in
298 collagen XI of hyaline cartilage and that previous urinary infection with *P. mirabilis*
299 triggers the production of auto-antibodies in reumathoid arthritis patients (24). It is well
300 known that platelets can be activated by simple collagen-like peptides (25), such as
301 those with homologous sequences found in distinct domains of both PMU and HPU
302 (Fig. S3). Cross-reactivity of antibodies raised against the UreB subunit (HpUre α) of
303 HPU towards platelet's glycoprotein IIIa has been implicated in immune
304 thrombocytopenic purpura (13). Finally, the ability of ureases to insert themselves into
305 lipid membranes hence leading to formation of ion channels and alterations of
306 membrane's permeability (26, 27) could also underlie their platelet-activating
307 properties.

308 The fungitoxic effect of ureases was first reported in 2007, by testing JBU,
309 soybean urease, and HPU against filamentous phytopathogenic fungi (28). Later, the
310 non-enzymatic antifungal activity on yeasts of JBU in the micromolar range,
311 accompanied by membrane permeabilization, inhibition of glucose metabolism and
312 changes in morphology, was described (8). Here, micromolar doses of PMU were
313 shown to inhibit fungal cell proliferation and to cause morphological changes in yeasts.
314 Concerning the PMU subunits, PmUre β inhibited proliferation of all three tested yeast
315 species (Fig. 3E, F and G). PmUre α was fungitoxic only against *C. albicans* and
316 PmUre γ was deterrent only to *S. cerevisiae*. Our data confirmed the existence of more
317 than one fungitoxic domain in ureases, as previously suggested (8).

318 The fact that PmUre β subunit displayed all the biological activities demonstrated
319 here was somewhat surprising. Apart from the catalytic region in the α subunit, no other
320 functions were clearly ascribed to bacterial enzyme's subunits. The urease's β domain,
321 so far, has only been proposed to take part in the enzyme's activation process (29).
322 Since the PMU's non-enzymatic biological effects seen here overlap the toxicity
323 reported for Jaburetox (30, 31) similarities between them were inspected. Using a tool
324 able to detect intragenic duplications on three levels, a jaburetox-like fragment was
325 detected in the β domain of JBU, and its homologue is present in PmUre β . Considering
326 that, in contrast to Jaburetox, PmUre β also activates platelets, additional regions of
327 duplication between β and α domains were inspected, revealing a second similarity site
328 (Fig. 6E and 6F).

329 Jaburetox is an intrinsically disordered peptide (16), a feature that may underlie
330 its toxicity. By simulating the PmUre β subunit, a loss of secondary structure (with some
331 gain in β -sheets) could be seen, as previously reported in simulations of the jaburetox
332 peptide (32). Simulations under fold-disturbing conditions resulted in a total loss of
333 secondary structure, as observed for jaburetox in NMR studies (16). Thus, our
334 observations indicate that PmUre β displays a jaburetox-like behavior both in terms of
335 biological activities and physicochemical behavior (Fig. 6).

336 Ureases are unnecessarily large for the enzymatic function they perform (6). The
337 need for the additional subunits (considering the ancestral dihydroorotase) is unknown,
338 and acquisition of toxicity has been proposed as a trend (2). Our current observation of
339 duplications of "toxic" elements across urease subunits, added to the diverse insecticidal
340 and fungitoxic motifs found throughout the enzyme, give support to this proposition (2,
341 5). Considering the evolutionary age of ureases (6), and observing the evolutionary

342 conservation of a jaburetox-like region in the β domain of the proteins may even point
343 to its origins there, labeling the jaburetox moiety in single chained ureases as a true
344 copy of an “original” toxic segment in the β subunit.

345 It is interesting to point out that the duplicated segments detected here arose
346 prior to the fusion of the tri-chained ureases to form the single-chained proteins, in a
347 transition from prokaryotes to the eukaryotes enzymes, probably by horizontal gene
348 transfer (6), which have been conserved ever since. Confirmation that these enzymes
349 may be accumulating varied types of toxicities to become multifunctional toxins raises
350 the question: Was urease originally a toxin, later co-opted for enzymatic activity (5)?
351 While this question remains unanswered, PMU is clearly pointing towards toxicity as a
352 driving force in the evolution of these enzymes.

353

354 CONCLUSIONS

355 Our data showed that *Proteus mirabilis* recombinant urease activated human
356 platelets and inhibited yeast proliferation, reinforcing the moonlighting characteristics
357 of PMU as shared with other ureases. Apart from the enzymatic activity of PMU, which
358 is ascribed to PmUre α , our findings point to PmUre β as one of the biologically active
359 portions of PMU, responsible to a great extent for the moonlighting character of this
360 urease.

361

362 ACKNOWLEDGMENTS

363 The authors thank Daniel Sulis for technical assistance and Dr. Barbara Zambelli
364 for helping with plasmid construction of *P. mirabilis* structural subunits. VB thanks
365 Professor Stefano Ciurli for hosting her in his laboratory at the University of Bologna
366 and for the productive scientific support. This project was financed by the Brazilian
367 agencies CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
368 (Science Without Borders Program for Visiting Researcher – PVE 054/2012, grant , and
369 Edital Toxinologia – Nr. 63/2010) and CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento
370 Científico e Tecnológico, Edital Universal, grants 44.6052/2014-1 and 47.5908/2012-0).
371 VB received a split Ph.D. fellowship (PVE 054/2012) from CAPES, for studies at the
372 University of Bologna, Italy.

373

374 REFERENCES AND NOTES

375 1. C. J. Jeffery, Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 8–11 (1999).

- 376 2. R. Ligabue-Braun, C. R. Carlini, Moonlighting toxins: ureases and beyond, in
377 Plant Toxins (Springer Netherlands, Dordrecht, 2017), pp. 199–219;
378 http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6728-7_10-1), pp. 1–21.
- 379 3. S. D. Copley, Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic
380 promiscuity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 265–272 (2003).
- 381 4. B. Henderson, A. Martin, Bacterial virulence in the moonlight: Multitasking
382 bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect.*
383 *Immun.* **79**, 3476–3491 (2011).
- 384 5. C. R. Carlini, R. Ligabue-Braun, Ureases as multifunctional toxic proteins: A
385 review. *Toxicon.* **110**, 90–109 (2016).
- 386 6. R. Ligabue-Braun, F. C. Andreis, H. Verli, C. R. Carlini, 3-to-1: Unraveling
387 structural transitions in ureases. *Naturwissenschaften.* **100**, 459–467 (2013).
- 388 7. F. Mulinari *et al.*, Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an
389 isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides.* **28**, 2042–2050 (2007).
- 390 8. M. Postal *et al.*, Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and
391 derived peptides. *Peptides.* **38**, 22–32 (2012).
- 392 9. B. D. Jones, C. V. Lockatell, D. E. Johnson, J. W. Warren, H. L. T. Mobley,
393 Construction of a Urease- Negative Mutant of *Proteus mirabilis*: Analysis of virulence
394 in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* **58**, 1120–1123
395 (1990).
- 396 10. C. Coker, C. A. Poore, X. Li, H. L. T. T. Mobley, Pathogenesis of *Proteus*
397 *mirabilis* urinary tract infection. *Microbes Infect.* **2**, 1497–1505 (2000).
- 398 11. D. P. Griffith, D. M. Musher, C. Itin, Urease. The primary cause of infection-
399 induced urinary stones. *Invest. Urol.* **13**, 346–50 (1976).
- 400 12. J. Y. Zhang *et al.*, Induction of a th17 cell response by *Helicobacter pylori*
401 urease subunit b. *Immunobiology.* **216**, 803–810 (2011).
- 402 13. Y. Bai *et al.*, Cross-reaction of antibody against *Helicobacter pylori* urease B
403 with platelet glycoprotein IIIa and its significance in the pathogenesis of immune
404 thrombocytopenic purpura. *Int. J. Hematol.* **89**, 142–149 (2009).
- 405 14. J. H. Lee, S. H. Jun, J.-M. Kim, S. C. Baik, J. C. Lee, Morphological changes in
406 human gastric epithelial cells induced by nuclear targeting of *Helicobacter pylori* urease
407 subunit A. *J. Microbiol.* **53**, 406–414 (2015).

- 408 15. L. L. Fruttero *et al.*, Humoral and cellular immune responses induced by the
409 urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*. *Parasit.*
410 *Vectors*. **9**, 1–14 (2016).
- 411 16. F. C. Lopes *et al.*, Pliable natural biocide: Jaburetox is an intrinsically disordered
412 insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease. *FEBS J.* **282**,
413 1043–1064 (2015).
- 414 17. L. Beigi, H. R. Karbalaeei-Heidari, M. Kharrati-Kopaei, Optimization of an
415 extracellular zinc-metalloprotease (SVP2) expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3)
416 using response surface methodology. *Protein Expr. Purif.* **84**, 161–166 (2012).
- 417 18. S. M. Jacobsen, D. J. Stickler, H. L. T. Mobley, M. E. Shirtliff, Complicated
418 catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus*
419 *mirabilis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 26–59 (2008).
- 420 19. J. D. M. Salvadori *et al.*, Characterization of entomopathogenic nematodes and
421 symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and
422 contribution of bacterial urease to the insecticidal effect. *Biol. Control.* **63**, 253–263
423 (2012).
- 424 20. I. Chouikha, B. J. Hinnebusch, Silencing urease: A key evolutionary step that
425 facilitated the adaptation of *Yersinia pestis* to the flea-borne transmission route. *Proc.*
426 *Natl. Acad. Sci.* **111**, 18709–18714 (2014).
- 427 21. C. T. Ferreira-DaSilva, M. E. C. Gombarovits, H. Masuda, C. M. Oliveira, C. R.
428 Carlini, Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect Cathepsin-
429 like enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **44**, 162–171 (2000).
- 430 22. M. S. Defferrari, R. Da Silva, I. Orchard, C. R. Carlini, Jack bean (*Canavalia*
431 *ensiformis*) urease induces eicosanoid-modulated hemocyte aggregation in the Chagas’
432 disease vector *Rhodnius prolixus*. *Toxicon.* **82**, 18–25 (2014).
- 433 23. G. E. Wassermann, D. Olivera-Severo, A. F. Uberti, C. R. Carlini, *Helicobacter*
434 *pylori* urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. *J.*
435 *Cell. Mol. Med.* **14**, 2025–2034 (2010).
- 436 24. C. Wilson *et al.*, Shared amino acid sequences between major histocompatibility
437 complex class II glycoproteins, type XI collagen and *Proteus mirabilis* in rheumatoid
438 arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **54**, 216–220 (1995).
- 439 25. L. F. Morton, P. G. Hargreaves, R. W. Farndale, R. D. Young, M. J. Barnes,
440 Integrin $\alpha 2\beta 1$ -independent activation of platelets by simple collagen-like peptides:

441 Collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient
442 alone for $\alpha 2\beta 1$ -independent platelet reactivity. *Biochem. J.* **306**, 337–344 (1995).

443 26. A. R. Piovesan, A. H. S. Martinelli, R. Ligabue-Braun, J.-L. Schwartz, C. R.
444 Carlini, *Canavalia ensiformis* urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels
445 in planar lipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.* **547**, 6–17 (2014).

446 27. Y. M. S. Micheletto *et al.*, Interaction of jack bean (*Canavalia ensiformis*)
447 urease and a derived peptide with lipid vesicles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* **145**,
448 576–585 (2016).

449 28. A. B. Becker-Ritt *et al.*, Antifungal activity of plant and bacterial ureases.
450 *Toxicon.* **50**, 971–983 (2007).

451 29. S. Quiroz-Valenzuela, S. C. K. Sukuru, R. P. Hausinger, L. A. Kuhn, W. T.
452 Heller, The structure of urease activation complexes examined by flexibility analysis,
453 mutagenesis, and small-angle X-ray scattering. *Arch. Biochem. Biophys.* **480**, 51–57
454 (2008).

455 30. F. Stanisçuaski, C. R. Carlini, Plant ureases and related peptides: Understanding
456 their entomotoxic properties. *Toxins (Basel).* **4**, 55–67 (2012).

457 31. A. Ebringer, T. Rashid, C. Wilson, Rheumatoid arthritis, Proteus, anti-CCP
458 antibodies and Karl Popper. *Autoimmun. Rev.* **9**, 216–223 (2010).

459 32. A. H. S. Martinelli *et al.*, Structure–function studies on jaburetox, a recombinant
460 insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Biochim.*
461 *Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1840**, 935–944 (2014).

1 MATERIALS AND METHODS

3 Plasmid construction and bacterial strain

4 *Escherichia coli* HB101 carrying a pMID 1010 plasmid, was a kind gift from Dr.
5 Harry T. Mobley (Department of Microbiology and Immunology, University of
6 Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA). This plasmid contains the complete
7 operon for PMU (Fig. 1A) formed by eight genes in tandem: three structural genes
8 (*ureA*, *ureB* and *ureC*) and five genes encoding accessory and regulatory proteins
9 (*ureD*, *ureE*, *ureF*, *ureG* and *ureR*). That plasmid was used as template to express *ureA*,
10 *ureB* and *ureC*, which encode the structural subunits, separately.

11 The primers used to amplify *P. mirabilis ureA* 5-
12 CATATGGAATTAACACCAAGAGAA-3, 3-
13 AGATCTCCTACACAATAGGTGAGTGAATTG-5, *P. mirabilis ureB* 5-
14 CATATGTAATAACATGATCCCCGGTG-3, 3-
15 AGATCTTTTTTCTCACTCTCCAATTTACCC-5 and *P. mirabilis ureC* 5-
16 CATATGAAAATCTCACGTCAAGCTT-3, 3-
17 AGATCTCGCTGGTTAAAATAAGAAATAGCG-5 were designed based on *P.*
18 *mirabilis* HI4320 genome
19 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=proteus+mirabilis>). Each insert was
20 subcloned into the vector pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI, USA) and
21 transformed into *E. coli* XL10-Gold ultracompetent cells (Novagen, Madison, WI,
22 USA) to amplify and maintain the plasmid. Zyppy™ Plasmid Miniprep kit (Zymo
23 Research Corp, Irvine, CA, USA) was used for plasmid purification and to insert
24 cleavage sites for restriction enzymes (Promega, Madison, WI, USA) both performed as
25 indicated by the manufacturer. All inserts were cloned into a pET15-b in which a
26 Streptag II sequence was inserted (33). Finally, *P. mirabilis ureA* gene was transformed
27 into *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen, Madison, WI, USA), whereas *P. mirabilis*
28 *ureB* and *ureC* genes expression was achieved using *E. coli* Arctic Express (DE3)
29 (Novagen, Madison, WI, USA).

31 Response Surface Methodology (RSM)

32 To obtain better conditions for PMU production, a factorial design exploring two
33 variables (urea concentration and time of induction) was performed. A 2² factorial with
34 12 experiments, coded as superior and inferior limits, with a repetition of the central

35 point were performed. The results obtained were analyzed with the software
36 STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). The experiment quality was
37 expressed by R^2 , with a Confidence Index (CI) of 95 % and $p \leq 0.05$. The statistical
38 significance was determined by the Fischer's Test (F-test). The data obtained resulted in
39 a polynomial equation:

$$40 \quad Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22} \quad (\text{Eq. 1})$$

41 where Y_i is a predictive response, and X_1 and X_2 are the independent variables (urea
42 concentration and induction time, respectively), β_0 is the intersection value, whereas β_1
43 and β_2 are the model parameters. This equation allowed the comparison between the
44 predictive and observed values in a validation curve.

45

46 **Growth conditions**

47 *Proteus mirabilis* urease (PMU)

48 *Escherichia coli* HB101 cultures were performed in Luria Bertani broth (LB),
49 with $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and $1 \mu\text{M NiCl}_2$ at
50 37°C and constant agitation (185 rpm). The induction of urease expression was carried
51 out by addition of 500 mM urea for 3 hours, as soon as the culture reached OD_{600} of 0.7.
52 Activity screening was performed by urea segregation agar methodology (Fig. S1) (34).

53 PMU structural subunits

54 All cell cultures were carried out using LB medium in the presence of $100 \mu\text{g}$
55 mL^{-1} of ampicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For *ureA* plasmid, $36 \mu\text{g mL}^{-1}$
56 of chloramphenicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added, while for
57 *ureC*- and *ureB*-expressing cultures, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ of gentamycin were added. Cultures
58 were performed at 37°C , under constant agitation (180 rpm). Protein expression was
59 induced by addition of 0.5 mM IPTG when the cellular growth achieved an OD_{600} of
60 0.7. Cell cultures were then kept overnight at 27°C for *ureA* and 15°C for *ureB* and
61 *ureC*.

62

63 **Crude extract and purification**

64 The recombinant holoprotein encoded by the plasmid carrying the whole urease
65 operon was called PMU. The recombinant subunits were designated PmUrey, PmUrey β
66 and PmUrea encoded by the plasmids carrying *ureA*, *ureB* and *ureC* genes,
67 respectively.

68

69 Crude extract and purification of PMU

70 After bacterial growth, the culture was centrifuged at 5,800 x g for 15 min at 4
71 °C. The pellet was resuspended in PEB (20 mM sodium phosphate (NaPB) pH 7.5, 1
72 mM ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA), 5 mM β-mercaptoethanol) and
73 centrifuged. To remove the urea excess from the pellet, the process was repeated three
74 more times. Cells were disrupted using a Unique Ultrasonic Homogenizer (Hielscher
75 Ultrasonics, Teltwon, Germany), 10 pulses of 50 s, in ice bath and PEB buffer. After
76 lysis, the material was centrifuged at 23,000 x g for 60 min at 4 °C and the supernatant
77 was dialyzed to remove the urea excess that could still remain in the solution.

78 After dialysis, the crude extract was submitted to three sequential
79 chromatographic steps. The extract was applied into a HiTrapQ™ column (GE
80 Healthcare, Little Chalfont, UK), at 60 % of its protein binding capacity. The resin was
81 equilibrated with PEB pH 7.5 and the same buffer was used to wash the resin to remove
82 unbound proteins. PMU was eluted in PEB pH 7.5 containing 400 mM potassium
83 chloride (KCl). The urease enriched fractions were pooled and dialyzed against PEB pH
84 7.5 to remove KCl and then loaded into a Q-Sepharose™ column (GE Healthcare, Little
85 Chalfont, UK) mounted in an ÄKTA chromatography system (GE Healthcare, Little
86 Chalfont, UK), equilibrated in PEB pH 7.5. The Q-Sepharose chromatography was
87 performed with a linear gradient from 0 to 600 mM KCl. The active fractions were
88 pooled, concentrated using an Amicon device with a cut off of 30 kDa (Merk Millipore,
89 Darmstadt, Germany) and then further purified by size exclusion chromatography
90 (Superdex 200™ 26/60-pg), equilibrated in PEB buffer pH 7.0. The gel filtration
91 column was calibrated using Blue dextran (2,000 kDa), thyroglobulin (669 kDa),
92 ferritin (440 kDa), β-amylase (200 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), and
93 carbonic anhydrase (29 kDa).

94 Crude extract and purification of PMU subunits

95 After bacterial growth, the culture was centrifuged at 5,800 x g for 10 min at 4 °C.
96 The pellet was resuspended in buffer containing 100 mM tris(hydroxymetyl)
97 aminomethane hydrochloride (Tris-HCl) pH 8.0, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA. The
98 cells were disrupted by sonication in ice bath with 15 cycles of 1 min at 20 kHz.
99 Cellular debris were pelleted by centrifugation at 14,000 x g for 30 min. PmUrey was
100 found in the culture supernatant whereas the other two proteins were expressed as
101 inclusion bodies. To solubilize PmUreyβ and PmUreyα, the pellets containing cellular
102 debris were washed three times with the buffer described above, containing 3 % (v:v) of

103 Triton X-100, followed by three washes with the same solution but without Triton X-
104 100. After washing and centrifugation, the pellets were resuspended in buffer containing
105 6 M urea, and kept under constant agitation, overnight at 4 °C. After solubilizing the
106 proteins, urea was removed by dialysis and all precipitated material was removed by
107 centrifugation at 14,000 x g for 20 min. After the protein refolding procedure, crude
108 extracts of PmUre β and PmUre α were obtained.

109 The crude extracts of the recombinant PMU subunits were then subjected to an
110 affinity chromatography step using StrepTactin resin (GE Healthcare, Little Chalfont,
111 UK) equilibrated in 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and elution
112 was carried out by addition of 2.5 mM D-desthiobiotin to the eluant, as indicated by the
113 manufacturer.

114 Before each biological experiment, a gel filtration step in Superose 6 10/300
115 column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) was conducted to assert protein
116 homogeneity, while changing the solvent to 50 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer.

117

118 **Protein determination**

119 The protein contents were determined by the Bradford method , using bovine
120 serum albumin as standard.

121

122 **Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and western blot**

123 Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was
124 performed according to Laemmli, 1970 (35). The material was diluted in sample buffer,
125 heated to 95 °C for 5 minutes and applied in 12 or 15 % polyacrylamide gels. Native-
126 PAGE was performed in 7.5 % polyacrylamide gels, without SDS and reducing agents,
127 and samples were not boiled. The proteins were stained with colloidal Coomassie
128 Brilliant Blue or silver nitrate.

129 After purified PMU was subjected to native-PAGE, the protein bands were
130 electrotransferred to a 0.25 μ m nitrocellulose membrane using PowerPac HC (Bio-Rad,
131 Hercules, CA, USA). The membrane was incubated overnight with HpUre α rabbit
132 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA) followed by 2 h
133 incubation with the anti-rabbit Immunoglobulin G coupled with alkaline phosphatase,
134 diluted 1:5,000 and 1:10,000, respectively. The color reaction was developed in 20 mM
135 Tris-base in pH 9.2, 10 mM MgCl₂, containing 0.75 mM nitroblue tetrazolium (NBT)
136 and 30 mM of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl (BCIP).

137

138 **Urease assay and zymography**

139 Urease activity was determined in 96 well plates (Thermo Scientific, Waltham,
140 MA, USA) in the presence of 20 mM NaPB pH 7.5, 150 mM NaCl (PBS buffer), 100
141 mM urea and the sample of interest, in 100 μ L final reaction volume. The enzymatic
142 reaction proceeded for 30 min at 37 °C and the color reaction was developed with the
143 phenol-nitroprussiate method (36). Zymography in native-PAGE gels was carried out
144 by the nitroprusside-thiol reaction according to Sharma et al. (37).

145

146 **Platelet aggregation**

147 Peripheral human blood of healthy volunteers was obtained in presence of 0.313
148 % (w/v) sodium citrate. The blood samples were centrifuged at 400 x g for 10 minutes
149 at 25 °C to obtain a platelet-rich plasma (PRP). All procedures regarding blood
150 extraction and handling were conducted in strict accordance to Brazilian legislation
151 (Law no. 6.638/1979) and approved by the institutional Ethics Committee (UFRGS
152 process 721.217; PUCRS 14/00414).

153 Platelet aggregation by turbidimetry

154 PRP (300 μ L) was preincubated for two min at 37 °C under stirring, and then a
155 maximum of 30 μ L of agonist was added. Increase in turbidity was followed at 630 nm
156 in a Lumni-Aggregometer (Chrono-Log Corporation, Havertown, PA, USA) for 5 min.
157 Adenosine diphosphate (ADP) at 20 μ M was considered the positive control. Buffer
158 alone (20 mM NaPB pH 7.5) was employed as negative control. The aggregation assays
159 were performed using 11 and 63 nM of PMU, or 20 μ M ADP.

160 Platelet aggregation by microscopy

161 PMU subunits were incubated with PRP for 1 h at room temperature on a rocking
162 platform. After centrifugation, the pelleted cells were fixed with 4% v/v formaldehyde,
163 and the aggregates were counted in a Neubauer chamber using an optic microscope
164 (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA). A platelet aggregate was defined as
165 five or more cells clustered together.

166 Platelet interaction with fluorescently labeled PMU subunits was also assessed.
167 For that, the proteins were incubated for 1 h at room temperature with 48 μ g mL⁻¹ of
168 fluorescein isothiocyanate (FITC) dissolved in DMSO and the excess of fluorophore
169 was removed on a HiTrap desalting column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) in 50
170 mM Tris-HCl pH 7.5. The labeled subunits were mixed with 10⁷ platelets at room

171 temperature, vortexed for 5 min, fixed with 4% v/v formaldehyde and visualized using a
172 Zeiss Axiovert 200 inverted fluorescence microscope and photographed with an
173 Axiocam MRc camera (Carl Zeiss).

174

175 **Yeast Proliferation Assay**

176 *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. parapsilosis*
177 were grown for 48 h on petri dishes with Sabouraud agar (1 % peptone, 2 % glucose
178 and 1.7 % agar-agar) at 28 °C. After cellular growth, the cells were harvested with the
179 aid of a sowing handle, transferred to sterile saline (0.9 % NaCl) and homogenized.
180 Yeasts (10^6 cells) were placed on 96 wells U bottomed plates (Thermo Scientific,
181 Waltham, MA, USA), containing Sabouraud medium. Thereafter, the tested proteins
182 were added, incubated overnight at 28 °C and colony forming units (CFU) were
183 determined by the drop plate method in Agar-Sabouraud plates after 24 h of incubation
184 at 28 °C. Controls were run with the material obtained from non-transformed *E. coli*
185 HB101 (without the PMU plasmid) cells, subjected to the same purification protocol
186 used for PMU.

187 The cellular morphology of *Candida tropicalis* was analyzed by microscopy in
188 Axioskop 40 (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA) after an incubation period
189 of 48 h in presence of PMU.

190

191 **Assays on protein-insect interactions**

192 Fifth-instar nymphs of the kissing bug *Rhodnius prolixus* (a Chagas' disease
193 vector) were kindly provided by Dr. Denise Feder (Universidade Federal Fluminense,
194 RJ, Brazil). The colony maintenance was performed under light:dark cycle of 12 h each,
195 temperature (27 ± 1 °C) and relative humidity (60 %). The insects were fed every three
196 weeks on human blood offered in parafilm-covered acrylic plates maintained at 37 °C
197 on a warming table. A colony of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* was
198 maintained at 23 °C and 75 % of relative humidity, with light-dark cycle of 16 h:8 h,
199 and fed on cotton seeds .

200 *In vitro* hemocyte aggregation assay

201 Fifth-instar nymphs of *R. prolixus* were sterilized by immersion in ethanol 70 %,
202 and hemolymph was collected with a micropipette from a cut in one leg and pooled.
203 The hemolymph pool was mixed in a proportion of 1:1 (v/v) with *Rhodnius* saline as
204 reported by Lane *et al.* in 1975 (38). The hemolymph mixture was incubated with the

205 urease subunits (final concentrations of $2.2 \mu\text{g mL}^{-1}$) and incubated at room temperature
206 for 1 h with gentle agitation on a rocking platform. The aggregates were counted in a
207 Neubauer chamber in an optic microscope (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY,
208 USA). A hemocyte aggregate was defined as five or more cells clustered together. In
209 order to assess the relevance of divalent cations in the subunit-induced hemocyte
210 aggregation, additional experiments were performed in presence of $100 \mu\text{M}$ EDTA,
211 following the same protocol.

212 Lethality assay by injection into *D. peruvianus*

213 Solutions of the urease subunits were sterilized by passing through $0.22 \mu\text{m}$
214 syringe filters. *Dysdercus peruvianus* fifth-instar nymphs were anesthetized by cooling
215 at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ for 5 min, fixed in a plate and injected into the hemocoel with $5 \mu\text{L}$ of urease
216 subunits (in 50 mM Tris pH 7.5 at $163 \mu\text{g mL}^{-1}$, final dose of 27 ng of protein per mg of
217 insect body weight, with an average of 30 mg each) using a Microliter 900 series
218 syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). Controls received injections of buffer (50 mM
219 Tris-HCl pH 7.5). The experiments were repeated three times employing groups of 5
220 insects each. Mortality rates were recorded every 24 h for 3 days.

221 Lethality assay oral administration to *D. peruvianus*

222 Fifth-instar nymphs of *D. peruvianus* were immobilized on a flat surface and their
223 mouth apparatus were introduced into a glass capillary containing $5 \mu\text{L}$ of test solution
224 as described by Martinelli *et al.* (32). The experiments were performed in triplicates
225 using groups of 5 insects. The controls were fed with 50 mM Tris-HCl pH 7.5 and the
226 experimental groups were fed with the solutions ($163 \mu\text{g mL}^{-1}$) of PmUrey, PmUre β or
227 PmUre α subunits dissolved in the same Tris-HCl buffer, to give final doses of 27 ng of
228 protein per mg of insect body weight. Mortality rates were recorded every 24 h for 3
229 days.

230

231 **Protein sequence analyzes**

232 Protein sequences (for bacterial urease subunits, plant urease, and Jbtx) were
233 collected from NCBI - Protein database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) and
234 aligned using Clustal Omega algorithm (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). The
235 collagen peptide [GKO(GPO) $_{10}$ GKOG] (25), had its hydroxyproline amino acid
236 replaced for proline and aligned with *P. mirabilis* and *H. pylori* urease subunits using
237 ClustalW algorithm. Internal amino acid sequence repeats related to genetic duplication
238 were inspected with Swelke (39). Ancestral state reconstruction was carried out with

239 MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/>), using the previously published urease
240 phylogeny data (6) as reference.

241

242 **Molecular modeling and dynamics**

243 The molecular models for the PMU subunits were built with Modeller 9
244 (<https://salilab.org/modeller/>) using the *Sporosarcina pasteurii* urease structure (PDB
245 ID 4AC7) as template. Molecular dynamics simulations were carried out with the
246 Gromacs 4 suite (<http://www.gromacs.org/>), following protocols for native,
247 physiological conditions (40), and for structural stability assessment (41).

PMU EXPRESSION OPTIMIZATION BY RSM – SUPPLEMENTARY

OBSERVATIONS

After bacterial screening to select colonies of *E. coli* HB101 carrying pMID1010 and producing recombinant PMU (Fig. S1), RSM was performed in order to establish the best conditions for urease production (17). The experimental design applied in this study was 2^2 factorial, with four central point repetitions to determine the confidence intervals. Table S1 shows the factorial design and the results for each analyzed point. The data in Table S2 was used to conduct a variance analysis and determine the significance for this model. The coefficient of determination (R^2) was 0.968 indicating a high confidence level. To classify the experiment as predictive, the calculation of the F-value is required, and this number must be 3 times higher than the tabulated F-value. Our obtained F-value was 12 times higher than tabulated value, which classifies the experiment as predictive and significant. The regression equation obtained was a quadratic polynomial one, as seen in the equation (2), and the surface response generated is shown in Figure 1B.

$$Y_i = 6368.1 X_1 - 12013.6 X_{12} - 10744.4 X_2 - 5292.3 X_1 X_2 + 41390.0 \text{ (Eq. 2)}$$

Experiments were performed in order to validate this model, obtaining a difference between the experimental data and the predicted values of less than 20 % (Table S3), validating our model. RSM determined the best conditions for urease expression (Fig. 1B). Thus PMU production would be highest using 500 mM urea and 3 h as induction time.

270 **Table S1**

271

272 **Table S1:** Experimental design and urease activity for response surface curve
273 construction. Variables are presented with its mathematical value. U_{total} is the enzymatic
274 activity from each experiment and expressed as the enzyme concentration to release 1
275 nM of ammonium per minute of reaction.

276

Experiment	Urea (mM)	Time (h)	Urease activity
			U_{Total}
1	130	5.5	30198
2	130	17.6	15975
3	520	5.5	50462
4	520	17.6	15069
5	325	11.5	39562
6	325	11.5	42464
7	325	11.5	40966
8	325	11.5	45580
9	325	3.3	54121
10	325	20.0	28530
11	50	11.5	7818
12	600	11.5	30112

277

278 **Table S2**

279

280 **Table S2:** Variance analysis by ANOVA using Statistica 7.7 Software.

281

ANOVA – R² = 0.96824; Adj = 0.95009

Factor	SS	df	MS	F	p
(L) Urea (mM)	3.234 E+08	1	323453977	48.612	0.0060
(Q) Urea (mM)	9.530 E+08	1	953046699	143.234	0.0012
(L) Time (h)	9.208 E+08	1	920788992	138.386	0.0013
(L) Urea by (L) Time	1.120 E+08	1	112035609	16.840	0.0026
Lack of Fit	5.579 E+07	4	13947971	2.096	
Pure Error	1.996 E+07	3	6653786		
Total SS	2.385 E+09	11	40966		

282

283 **Table S3**

284

285 **Table S3:** Surface response methodology validation experiments. Difference % is the
 286 difference calculated between the enzymatic urease activity detected from the
 287 experimental procedure and the predicted values obtained from the polynomial curve
 288 (eq. 2).

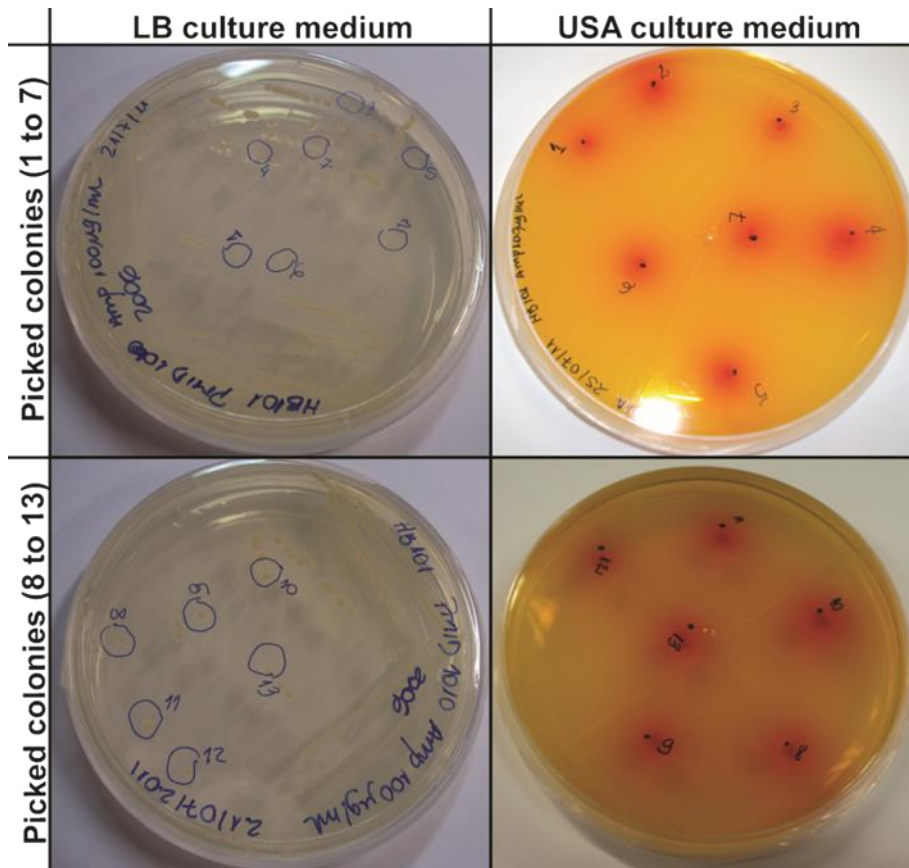
289

Validation			Experimental	Predicted	Difference (%)
	Urea (mM)	Time (h)	U _{Total}	U _{Total}	
	150	5	36800	32388	12
	500	3	67575	59256	12
	500	5	61440	54138	12
	100	20	12681	11611	8

290

291 **Fig. S1**

292



293

294

295 **Figure S1:** Bacterial culture screening to select colonies producing recombinant PMU.

296 On the left are presented the Petri dishes with LB medium and the cells were isolated by

297 streaking method. The isolated reddish colonies expressing urease are shown on the

298 right as revealed by using the Urea Segregation Agar (USA) medium.

299 **Fig. S2**

300

301 CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

302						
303	JBU	MKLSPREVEKLGHLNAGYLAQKRLARGVRLNYTEAVALIASQIMEYARDGEKTVAQIMCL	60			
304	Jbtx	-----	0			
305	PmUrea	-----	0			
306	HpUrea	-----	0			
307	PmUreβ	-----	0			
308	PmUrey	MELTPREKDKLLLF ¹ TAGLVAERRLAKGLKLNYPEAVALISCAIMEGAREGK-TVAQLMSE	59			
309	HpUreβ	MKLTPKELDKLMLHYAGELARKRKEKGIKLNYPEAVALISAHIMEEARAGKKTAAELMQE	60			
310						
311	JBU	GQHLLGRRQVLPAPVPHLLNAVQVEATFPDGT ² KLVTVDHPISRENGELQEALFGSLLPVPS	120			
312	Jbtx	-----	0			
313	PmUrea	-----	0			
314	HpUrea	-----	0			
315	PmUreβ	-----	0			
316	PmUrey	GRTVLTAEQVMEGVPEMIKDVQVECTFPDGT ³ KLVSIHSPIV	100			
317	HpUreβ	GRTLLKPDVMDGVASMIHEVGIAMFPDGT ⁴ KLVTVHTPIEANGK	105			
318						
319	JBU	LDKFAETKEDNRIPGEILCE--DECLTLNIGRKAVILKVTSKGDRIQVGS ⁵ SHYHFIEVNP	178			
320	Jbtx	-----	0			
321	PmUrea	-----	0			
322	HpUrea	-----	0			
323	PmUreβ	-----MIPGEIRVNAALGDIELNAGRETKTIQVANHGDRPVQVGS ⁶ SHYHFYEVNE	49			
324	PmUrey	-----	100			
325	HpUreβ	-----LVPGELFLK--NEDITINEGKKAVSVKKNVGD ⁷ RPVQIGSHFFFEVNR	152			
326						
327	JBU	YLTFDRRKAYGMLNIAAGTAVRFEPGDCKSVTLV ⁸ SIENKVI ⁹ RGGNAIADGPVNETNLE	238			
328	Jbtx	-----MGPVNEANCK	10			
329	PmUrea	-----	0			
330	HpUrea	-----	0			
331	PmUreβ	ALRFAREETLGFRLNIPAGMAVRFEPGQSR ¹⁰ TVELVAFAGKREIYGFHGV ¹¹ MGKLESEKK	108			
332	PmUrey	-----	100			
333	HpUreβ	YLD ¹² FDREKTEFGKRLDIASGTAVRFEPGEEKSV ¹³ ELIDIGNRRIFGFNALVDRQADNESKK	212			
334						
335	JBU	AAMHAVRSKGF ¹⁴ GHEEEKDASEGFTKEDPNC ¹⁵ PFNTFIHRKEYANKY ¹⁶ GPTTGDKIRLGD ¹⁷ TNL	298			
336	Jbtx	AAMEIVCRREFGHK ¹⁸ EEEDASEGVTGDPDC ¹⁹ PTKAI ²⁰ PREEYANKY ²¹ GPTIGDKIRLGD ²² TL	70			
337	PmUrea	-----MKTISRQAYADMFG ²³ P ²⁴ TGDR ²⁵ LRLAD ²⁶ TEL	28			
338	HpUrea	-----MISRKEYVSMY ²⁷ G ²⁸ PT ²⁹ TGDKVRLGD ³⁰ TDL	26			
339	PmUreβ	-----	108			
340	PmUrey	-----	100			
341	HpUreβ	I ³¹ ALHRAKERGFHGA ³² KSD ³³ DNY-----V ³⁴ KTI ³⁵ KE	238			
342						
343	JBU	LAEIEKDYALY ³⁶ GDEC ³⁷ VFGGK ³⁸ VIRDGMGQSCGHPPAISLDTVITNAVIIDY ³⁹ TGI ⁴⁰ IKADIG	358			
344	Jbtx	I ⁴¹ AIEKDFALY ⁴² GDES ⁴³ VFGGK ⁴⁴ VISHHHHHH	100			
345	PmUrea	FLEIEKDLTTY ⁴⁵ GEEV ⁴⁶ KFGGK ⁴⁷ VIRDGMGQSQ--V ⁴⁸ VSAECVDVLITNAI ⁴⁹ ILDY ⁵⁰ GWIVKADIG	87			
346	HpUrea	IAEVEHDY ⁵¹ TIYGEELK ⁵² FGGK ⁵³ TLREGMSQSN--N ⁵⁴ PSKEELD ⁵⁵ LIITNALIVD ⁵⁶ YTG ⁵⁷ IYKADIG	85			
347	PmUreβ	-----	108			
348	PmUrey	-----	100			
349	HpUreβ	-----	238			
350						
351	JBU	IKDGLIASIGKAGNP ⁵⁸ DIMNGVFSNMIIGANTEVIAGEGLIVTAGAIDCHVHYIC ⁵⁹ PQLVYE	418			
352	Jbtx	-----	100			
353	PmUrea	IKDGRIVGIGKAGNP ⁶⁰ DVQPNV--DIVIGPGTEVVAGEGKIVTAGGIDTHIH ⁶¹ FICPQQAQE	145			
354	HpUrea	IKDGKIAGIGKGNKDMQDGVKNNLSVGPATEALAGEGLIVTAGGIDTHIH ⁶² FISPPQIPT	145			
355	PmUreβ	-----	108			
356	PmUrey	-----	100			
357	HpUreβ	-----	238			
358						

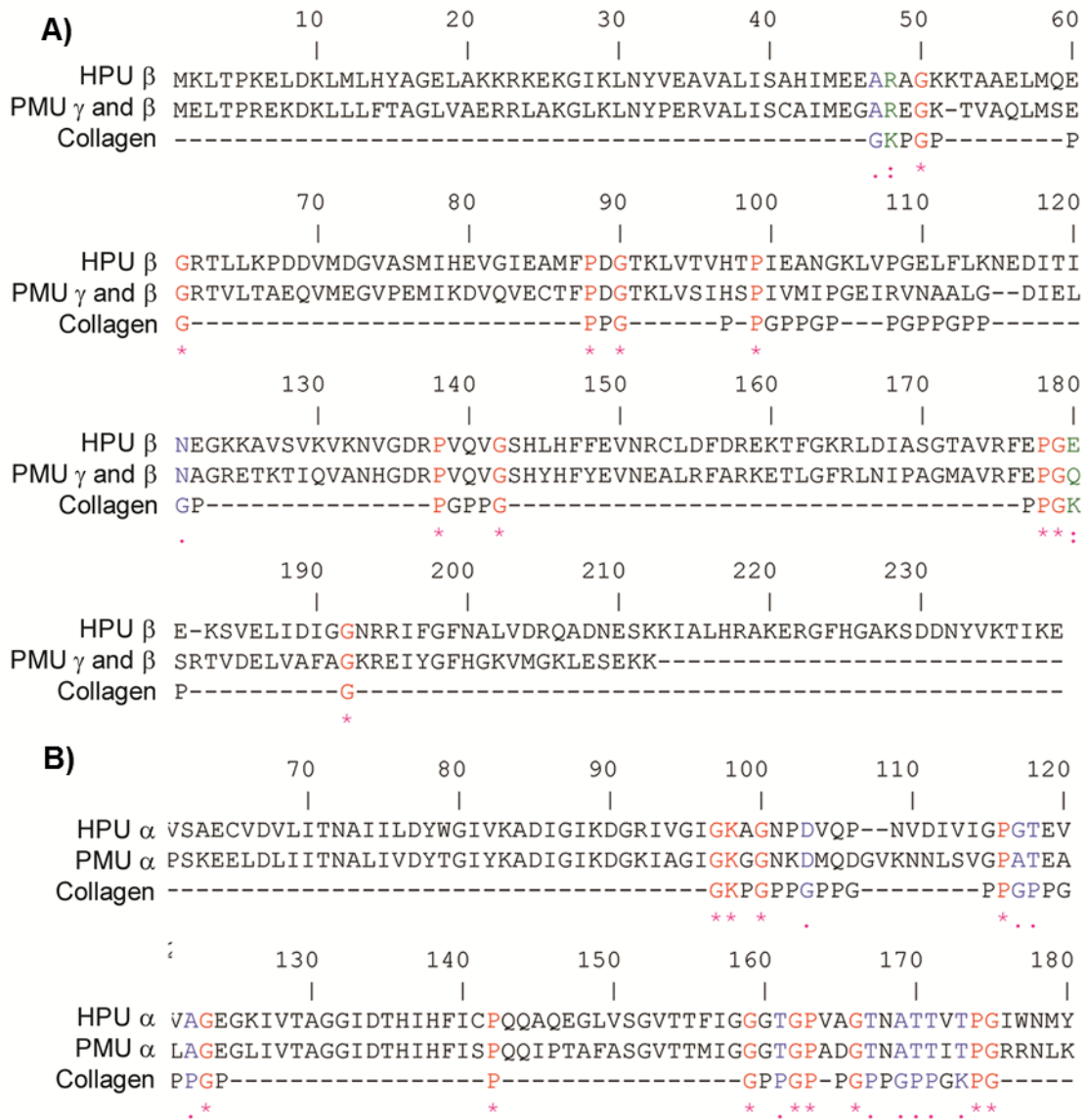
359	JBU	AISSGITTIVGGGTGPAAGTRATCTPSPTQMRLMLQSTDYLPNFGFTGKGSSSKPDEL	478
360	Jbtx	-----	100
361	PmUrea	GLVSGVTTFIGGGTGPVAGTNATTVTPGIWNMYRMLEAVDELPINVGFLFGKGCVSQPEAI	205
362	HpUrea	AFASGVTTMIGGGTGPADGTNATTITPGRRLKWLMLRAAEEYSMNLGFLAKGNTSNDASL	205
363	PmUreβ	-----	108
364	PmUrey	-----	100
365	HpUreβ	-----	238
366			
367	JBU	HEIIKAGAMGLKLHEDWGSTPAAIDNCLTIAEHHDIQINIHTDTLNEAGFVEHSIAAFKG	538
368	Jbtx	-----	100
369	PmUrea	REQITAGAIGLKIHEDWGATPMAIHNLNVADEMVDQVAIHSDTLNEGGFYEETVKAIAIG	265
370	HpUrea	ADQIEAGAIGFKIHEDWGTTPSAINHALDVADKYDVQVAIHTDTLNEAGCVEDTMAAIAIG	265
371	PmUreβ	-----	108
372	PmUrey	-----	100
373	HpUreβ	-----	238
374			
375	JBU	RTIHTYHSEGAGGGHAPDIIKVCGIKNVLPSSNTPTRPLTSNTIDEHLDMVMVCHHLDR	598
376	Jbtx	-----	100
377	PmUrea	RVIHFVHTEGAGGGHAPDVIKSVGEPNLPASTNPTMPYTTINTVDEHLDMVMVCHHLDR	325
378	HpUrea	RTMHTFHTEGAGGGHAPDIIKVAGEHNILPASTNPTIPFTVNTEAEHMDMLMVCHHLDR	325
379	PmUreβ	-----	108
380	PmUrey	-----	100
381	HpUrea	-----	238
382			
383	JBU	IPEDLAFAHSRIRKKTIAAEDVLNDIGAISIISSDSQAMGRVGEVISRWTQTADPMKAQT	658
384	Jbtx	-----	100
385	PmUrea	IPEDVAFAESRIRRETIAAEDILHDMGAI SVMSSDSQAMGRVGEVILRTWQCAHKMKLQR	385
386	HpUrea	IKEDVQFADSRIRPQTIAAEDTLHDMGIFSISSSDSQAMGRVGEVITRTWQTADKNKKEF	385
387	PmUreβ	-----	108
388	PmUrey	-----	100
389	HpUreβ	-----	238
390			
391	JBU	GPLKCDSSDNDNFRIRRYIAKYTINPAIANGFSQYVGSVEVGKGLADLVMWKPSFFGKPE	718
392	Jbtx	-----	100
393	PmUrea	GTLAGDSADNDNRIKRYIAKYTINPALAHGIAHTVGSIEKGLADIVLWDPAFFGVKPA	445
394	HpUrea	GRLKEEKGDNDNFRIRKRYLSKYTINPAIAHGI SEYVGSVEVGKVADLVLWSPAFFGVKPN	445
395	PmUreβ	-----	108
396	PmUrey	-----	100
397	HpUreβ	-----	238
398			
399	JBU	MVIKGMVAWADIGDPNASIPTPEPVKMRPMYGTLGKAGGALSIAFVSKAALDQRVNVLY	778
400	Jbtx	-----	100
401	PmUrea	LIKGMVAYAPMGDINAAPTPQPVHYRPMYACLGKAKYQTSMI FMSKAGIEAGVPEKL	505
402	HpUrea	MIIKGGFIALSQMGDANASIPTQPVVYREMFHGHGKAKYDANITFVSOAAYDKGIKEEL	505
403	PmUreβ	-----	108
404	PmUrey	-----	100
405	HpUreβ	-----	238
406			
407	JBU	GLNKRVEAVSNVRKLTKLDMKLNLDALPEITVDPESYTVKADGKLLCVSEATTVP LSRNYF	838
408	Jbtx	-----	100
409	PmUrea	GLKSLIGRVEGCRHITKASMIHNNYVPHIELDPQTYIVKADGVPLVCEPATELPMAQRYF	565
410	HpUrea	GLERQVLPVKNCRNITKKDMQFNDTTHAIEVNPETYHVFDGKEVTSKPKATKVS LAQLFS	565
411	PmUreβ	-----	108
412	PmUrey	-----	100
413	HpUreβ	-----	238
414			

415	JBU	LF	840
416	Jbtx	--	100
417	PmUrea	LF	567
418	HpUrea	LF	567
419	PmUreβ	--	108
420	PmUrey	--	100
421	HpUreβ	--	238
422			

423 **Figure S2:** Jaburetox and urease alignment. Jack bean urease (JBU - GenBank:
424 AAA83831.1) was used as the amino acid sequence reference. Light blue: jaburetox,
425 *Proteus mirabilis* urease (PMU): PmUrey in yellow (GenBank: KXC01632.1), PmUreβ
426 in green (GenBank: KXC01631.1) and PmUrea in blue (GenBank: KGA91697.1).
427 *Helicobacter pylori* urease (HPU): HpUreβ in dark green (GenBank: WP_058905136.1)
428 and HpUrea in dark blue (GenBank: AAU21200.1).
429

430 **Fig. S3**

431



432

433 **Figure S3:** Partial alignment of PMU subunits and collagen peptides responsible for
 434 interaction with platelet glycoprotein VI.

435 **REFERENCES AND NOTES**

- 436 33. M. Miraula, S. Ciurli, B. Zambelli, Intrinsic disorder and metal binding in UreG
437 proteins from *Archae hyperthermophiles*: GTPase enzymes involved in the activation of
438 Ni(II) dependent urease. *J. Biol. Inorg. Chem.* **20**, 739–755 (2015).
- 439 34. L. T. Hu, P. A. Foxall, R. Russell, H. L. T. Mobley, H L T, Purification of
440 recombinant *Helicobacter pylori* urease apoenzyme encoded by ureA and ureB.
441 *Infection and Immunity.* **60**, 2657-2666 (1992).
- 442 35. U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
443 bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685 (1970).
- 444 36. M. Weatherburn, Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia.
445 *Analytical Chemistry.* **39**, 971-974 (1967).
- 446 37. V. Sharma, R. Chaudhary, J. M. Khurana, K. Muralidhar, In-gel detection of urease
447 activity by nitroprusside-thiol reaction. *Phytochem. Anal.* **19**, 99–103 (2008).
- 448 38. N. J. Lane, R. Leslie, L. S. Wales, Insect peripheral nerves: accessibility of
449 neurohaemal regions to lanthanum. *Journal of cell science.* **18**, 179-197 (1975).
- 450 39. A. L. Abraham, E. P. C. Rocha, J. Pothier, Swelfe: a detector of internal repeats in
451 sequences and structures. *Bioinforma. Appl. NOTE.* **24**, 1536–153710 (2008).
- 452 40. R. Ligabue-Braun, L. G. Sachett, L. Pol-Fachin, H. V. Verli, The calcium goes
453 meow: Effects of ions and glycosylation on Fel d 1, the major cat allergen. *PLoS One.*
454 **10** (2015), doi:10.1371/journal.pone.0132311.
- 455 41. G. Settanni, A. R. Fersht, High temperature unfolding simulations of the TRPZ1
456 peptide. *Biophys. J.* **94**, 4444–53 (2008).

457

458

Capítulo 2

Capítulo 2: Structural analysis of the intrinsically disordered protein jaburetox and its interaction with membrane models

Title: Structural analysis of the interaction between Jaburetox, an intrinsically disordered protein, and membrane models

Author: Valquiria Broll, Anne Helene S. Martinelli, Fernanda C. Lopes, Leonardo L. Fruttero, Barbara Zambelli, Edoardo Salladini, Olena Dobrovolska, Stefano Ciurli, Celia R. Carlini

Publication: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

Publisher: Elsevier

Date: 1 November 2017

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Neste capítulo apresentamos o artigo publicado na revista *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Neste capítulo exploramos aspectos experimentais e estruturais do polipeptídeo entomotóxico jaburetox a fim de elucidar maiores informações a respeito de seu mecanismo de ação. Jbtx interage com o cordão nervoso de insetos assim como à parede celular de leveduras, esta interação se mantém mesmo após lise celular. A fim de entender este mecanismo foram construídas estruturas lipídicas que mimetizassem membrana celular e por experimentos de RMN e dicroísmo circular acompanhado o comportamento deste polipeptídeo. Os dados obtidos no presente trabalho evidenciam um possível mecanismo no qual o polipeptídeo interage com os lipídeos presentes na membrana celular de forma a facilitar uma ligação ainda mais específica com receptores presentes na membrana.



Research article

Structural analysis of the interaction between Jaburetox, an intrinsically disordered protein, and membrane models



Valquiria Broll^{a,1}, Anne Helene S. Martinelli^{b,1}, Fernanda C. Lopes^a,
Leonardo L. Fruttero^{a,c}, Barbara Zambelli^d, Edoardo Salladini^d, Olena Dobrovolska^d,
Stefano Ciurli^{d,*}, Celia R. Carlini^{a,c,**}

^a Graduate Program in Cellular and Molecular Biology – Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil

^b Department of Biophysics, Biosciences Institute (IB), UFRGS, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil

^c Brain Institute – BRAINS – InsCer, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6690, CEP 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^d Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Department of Pharmacy and Biotechnology, University of Bologna, Via Giuseppe Fanin 40, I-40127 Bologna, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 May 2017

Received in revised form 24 August 2017

Accepted 27 August 2017

Available online 30 August 2017

Keywords:

Jaburetox

Model membranes

Intrinsically disordered proteins

Nuclear magnetic resonance

Circular dichroism

Fluorescence microscopy

ABSTRACT

Jack bean urease is entomotoxic to insects with cathepsin-like digestive enzymes, and its toxicity is mainly caused by a polypeptide called Jaburetox (Jbtx), released by cathepsin-dependent hydrolysis of the enzyme. Jbtx is intrinsically disordered in aqueous solution, as shown by CD and NMR. Jbtx is able to alter the permeability of membranes, hinting to a role of Jbtx-membrane interaction as the basis for its toxicity. The present study addresses the structural aspects of this interaction by investigating the behaviour of Jbtx when in contact with membrane models, using nuclear magnetic resonance and circular dichroism spectroscopies in the absence or presence of micelles, large unilamellar vesicles, and bicelles. Fluorescence microscopy was also used to detect protein-insect membrane interaction. Significant differences were observed depending on the type of membrane model used. The interaction with negatively charged SDS micelles increases the secondary and tertiary structure content of the polypeptide, while, in the case of large unilamellar vesicles and bicelles, conformational changes were observed at the terminal regions, with no significant acquisition of secondary structure motifs. These results were interpreted as suggesting that the Jbtx-lipids interaction anchors the polypeptide to the cellular membrane through the terminal portions of the polypeptide and that, following this interaction, Jbtx undergoes conformational changes to achieve a more ordered structure that could facilitate its interaction with membrane-bound proteins. Consistently with this hypothesis, the presence of these membrane models decreases the ability of Jbtx to bind cellular membranes of insect nerve cord. The collected evidence from these studies implies that the biological activity of Jbtx is due to protein-phospholipid interactions.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Jaburetox (Jbtx) is an intrinsically disordered polypeptide (IDP) released from Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease (JBU) upon hydrolysis performed by cathepsin-like enzymes present in the

digestive system of some insects [1–5]. Both JBU and Jbtx feature potential as insecticides, but the activity of the polypeptide is greater than that of urease and it is effective over a broader spectrum of insect orders, because it does not require prior hydrolysis to be active [6,7].

In 2009, Stanisçuaski and co-workers proposed a model in which Jbtx exerts its entomotoxic role by interacting with receptors at *Rhodnius prolixus* Malpighi tubule's membranes, thus altering the eicosanoid signaling pathway, increasing cGMP levels, and disturbing trans-membrane potential, with consequent diuresis inhibition in this insect model [8]. Recently, the central nervous system of *Triatoma infestans* was demonstrated to be a Jbtx target, with the polypeptide interfering in enzymatic pathways of neuronal tissue, both in vivo and in vitro [9]. Later, Fruttero et al. reported that Jbtx

* Corresponding author at: Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Department of Pharmacy and Biotechnology, University of Bologna (UniBO), Via Giuseppe Fanin 40, 40127 Bologna, Italy.

** Corresponding author at: Brain Institute – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6690, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: stefano.ciurli@unibo.it (S. Ciurli), celia.carlini@pucrs.br (C.R. Carlini).

¹ The authors VB and AHSM contributed equally to this work.

affects the defence mechanisms in *R. prolixus* by affecting both the cellular and the humoral immune responses [10]. In addition to insects, the activity of Jbtx against yeasts and filamentous fungi has also been reported, with its fungicidal mechanism of action involving alteration of ions transport, changes in morphogenesis and permeabilization of fungal cells [11].

The biological activities of Jbtx appear to correlate with its ability to interact with cellular membranes, specifically through a protein-lipid interaction that causes the alteration of membrane structures with the possible formation of pores [12–15]. In 2009, Barros and co-workers showed that incubation with Jbtx leads to disruption of large unilamellar vesicles (LUVs) and release of a pre-loaded fluorescent dye [12]. Additionally, Martinelli and co-workers [15] reported that both the N- and the C-terminal half portions of Jbtx were able to interact with lipid vesicles and disrupt them in a similar way as observed for the entire polypeptide.

Recently, the secondary and tertiary structures of Jbtx were established using circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopies [5]. The CD spectrum is typical of an intrinsically disordered protein, a result confirmed by NMR, which further revealed the presence of regions with transient secondary structure, such as a short α -helical motif in the N-terminal region and two turn-like structures, one located in the central region and another near the C-terminal of the polypeptide [5].

Intrinsically disordered proteins (IDPs) are described as molecules with a wide range of folding possibilities. Typically, IDPs are composed of *foldons*, portions of a protein that can be folded independently, and *unfoldons*, regions of the protein that dynamically move from order-to-disorder to be biologically functional [16,17]. This behaviour is classified as (i) *binding-induced folding*, when the disorder-to-order path is absolutely needed to achieve the biological function, (ii) *binding-induced transient folding*, when IDPs are critically involved in signalling interactions, participating in on-off type systems, (iii) *binding-induced folding divergence*, characteristic of proteins with the ability to bind to different partners, (iv) *binding-induced under-folding*, applied to a system in which the connection to the partner generates a partial fold in the IDP, and as (v) *binding and non-folding*, when the interaction is dependent on the flexibility of the protein [17,18].

Many IDPs are known to interact with cellular membranes [19], whether natural or artificial. To mimic cellular membranes, ionic surfactants have been largely and successfully used in the determination of protein structure, mainly for proteins that are unstructured, such as IDPs [20]. Sodium dodecyl sulphate (SDS), when in concentrations above its critical micelle concentration (CMC), can be used as a mimetic membrane due to its ability to influence protein secondary structure similarly to what is observed for natural membranes [20,21].

Due to the remarkable resemblance of lipid bilayers to natural membranes, artificial lipid vesicles have been used as mimetic cellular membranes to provide structural and quantitative information regarding protein-membrane interactions [21,22]. In the past twenty years, bicelles have also emerged as a new class of membrane model for solid-state NMR that provides structural information of hydrophobic molecules in their native state [23,24]. Bicelles are composed of a mixture of phospholipids and detergent. The most used combination is the lipid dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC) with the detergent dihexanoyl-phosphatidylcholine (DHPC), which can be manipulated in order to control the size and its ability to orientate itself in a magnetic field by controlling the lipid/detergent concentration rate (q-ratio) [23,25]. Small bicelles have been used to evaluate protein structure as well as protein-membrane interaction [20,26].

In this work, we investigated the interaction of the intrinsically disordered Jbtx polypeptide with detergents and lipids (micelles, large unilamellar vesicles and bicelles) at the molecular

level, by using CD and NMR spectroscopy, as well as fluorescence microscopy.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and protein purification

The construct containing the Jbtx with a C-terminal His-tag sequence was introduced into a pET-23a vector as described in Postal et al. [11], and the corresponding protein sequence is composed of 100 amino acids (MGPVNEANCK-AAMEIVCRREFGHKKEEDASEGVTTGDPDCPFTKAIPREEYANKYGP-TIGDKIRLGDTDLIAEIEKDFALYGDSEVFGGGKVISHHHHHH), as reported in Lopes et al. [5]. This vector was used to transform *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen, Madison, WI, USA) by heat shock. The expression was performed using a previously described protocol [5]. ^{15}N labelled protein expression was performed by addition of $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in M9 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The purification followed the previously reported protocol [5] with some modifications. In detail, the cellular pellet was harvested by centrifugation (11,000g for 10 min at 4 °C) and resuspended in 30 mL of buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole). Cells were disrupted by three passages of the crude extract through a French pressure cell system (SLM, Aminco, Haverhill, MA, USA) at 20,000 psi. Following the removal of cell debris by centrifugation at 27,200g for 40 min at 4 °C, the supernatant was applied onto a Ni(II)-loaded 5 mL His-Trap HP column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) previously equilibrated in buffer A. The affinity resin was washed with 20 column volumes (CV) of buffer A. After this step, the imidazole concentration was increased up to 70 mM in order to remove weakly bound contaminants. The affinity column was then connected in tandem to a Superdex 75 16/60 column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) pre-equilibrated in 50 mM sodium phosphate buffer (NaPB) at pH 7.5, containing 1 mM EDTA and 1 mM TCEP. The two connected columns were eluted, first using 25 mL of buffer A containing 500 mM imidazole, and subsequently using 50 mM sodium phosphate buffer (NaPB) at pH 7.5, containing 1 mM EDTA and 1 mM TCEP (Fig. S1A). The fractions containing Jbtx were collected, concentrated using 3 kDa Amicon Ultra Centrifugal Filters (Merk Millipore, Darmstadt, Germany) and loaded onto a Superdex 75 10/300 column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), equilibrated with the same buffer at pH 6.5 (Fig. S1B); the final fractions were concentrated as above and stored at –80 °C.

Fractions of all purification steps were analyzed by SDS-PAGE using NuPAGE Novex 12% Bis-Tris gels (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) and staining with ProBlue Safe Stain (Giotto Biotech, Sesto Fiorentino, Italy). Protein quantification was performed by the Bradford assay [27] and by absorbance at 280 nm considering a molar extinction coefficient of $4595\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [28]. The final yield was ca. 30 mg of pure protein per liter of culture.

2.2. Preparation of model membranes

2.2.1. SDS micelles

SDS micelles were prepared starting from 300 mM SDS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) stock solutions. The critical micelle concentration (CMC) of SDS in 50 mM NaPB pH 6.5, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP and in MilliQ water (control) were estimated by measuring the conductivity at controlled temperature, as previously described [29].

2.2.2. Large Unilamellar Vesicles (LUVs)

Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared by the extrusion method [30,31], using lipids (10 mg/mL in *chloroform*) purchased from Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL,

USA). Lipid chloroform solutions were prepared using a mix of lipids in different molar ratios: phosphatidylglycerol (PG, 100%), phosphatidylcholine:phosphatidylglycerol (PC:PG, 50:50%), palmitoyl-oleoyl phosphatidyl cholin (POPC, 100%), palmitoyl-oleoyl phosphatidyl cholin:ergosterol (POPC:Erg, 70:30%) and phosphatidylethanolamine:phosphatidylcholine (PE:PC, 50:50%). A lipid film was formed by drying the chloroform under nitrogen flow, then rehydrated in the appropriate buffer and resuspended by vortexing. The lipid mixture was processed at least 20 times in a mini-extruder (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA) through a polycarbonate filter membrane with pores of 100 nm diameter, at room temperature. The result was a stock suspension of LUVs containing a total of 5 mM phospholipids in 50 mM NaPB at pH 6.5 (for CD spectroscopy) or 45 mM in 50 mM NaPB pH 6.5 containing 1 mM EDTA, 1 mM TCEP and 10% D₂O (for NMR spectroscopy).

2.2.3. Bicelles

The lipids 1,2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DHPC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DMPC), and 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol (DMPG) were purchased as dry powders from Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA). Bicelle samples were prepared by suspending the appropriate amount of DMPC, DHPC and DMPG in 50 mM NaPB at pH 6.5, to achieve a [DMPC/DHPC] or [(DMPC:DMPG)/DHPC] molar ratio (*q*) of 0.5, and a total concentration of 250 mM of lipid mix. DHPC and DMPC were combined at 66.6:33.4 molar ratio to prepare neutral bicelles, while a combination of DHPC:DMPC:DMPG at 66.6:16.7:16.7 ratio was used to formulate negatively charged bicelles. The procedure followed a published protocol [32,33] and involved 10 freeze-thaw cycles alternated with vortexing, resulting in a uniform transparent non-viscous emulsion in 50 mM NaPB. For NMR analysis, 1 mM EDTA and 1 mM of TCEP were added.

2.3. Fluorescence microscopy

2.3.1. Fluorescent labeling

Jbtx conjugation with fluorescein isothiocyanate (Jbtx-FITC) was carried out by incubating 50 mM jaburetox and 48 μg/mL of FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) prepared in DMSO at room temperature for 2.5 h [34] in 50 mM NaPB pH 6.5, containing 1 mM EDTA and 1 mM TCEP. The excess of FITC was removed from the sample using a HiTrap desalting 5 mL column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). The same procedure was repeated with bovine serum albumin (BSA), used as a non-specific interaction control (BSA-FITC). The FITC-labelled proteins were used in the interaction assays with cockroach nerve cord and *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3.2. Yeast interaction assay

S. cerevisiae was cultured in Sabouraud media overnight at 28 °C with constant agitation. The cell concentration was estimated by optical density (OD₆₀₀) and adjusted to 0.6. The incubations with Jbtx-FITC and BSA-FITC (23 μM) were performed for 3 h at 4 °C or for 1 h at 28 °C [35]. These preparations were analyzed using the EVOS FLoid cell Imaging Station fluorescence microscope (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and the Axioskop 40–Zeiss with AxioCam MRC (Carl Zeiss, Jena, Germany) fluorescence microscope, respectively.

Alternatively, yeast cells were lysed after incubation with the labelled proteins (3 h at 28 °C) using glass beads (200 nm) and vortex (four cycles of 1 min and 30 s of ice bath among cycles). The lysed cells were centrifuged at 10,000g for 10 min, the supernatant was removed, and the pellet was washed three times with 50 mM NaPB at pH 7.5, containing 1 mM EDTA and 1 mM TCEP. The pellets were

observed under UV light (Molecular Imager Gel Doc XR-Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

2.3.3. Nerve Cord (NC) interaction assay

Cockroaches (*Nauphoeta cinerea*) were maintained with free access to food and water, under controlled temperature between 22 and 25 °C and 12:12 h light:dark cycles. Adults were cooled at –20 °C for 5 min and immobilized ventral side up to have their body cavity opened. The nerve cord (NC), composed by pro, meso and metathoracic ganglia, was dissected, and removal of other tissues was done under constant bathing with 20 mM NaPB pH 6.5 containing single-use protease inhibitors cocktail (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The incubation of Jbtx-FITC and BSA-FITC with the NC was carried out by incubation with 23 μM solutions of either protein for 1 h at room temperature. Three washes were performed with buffer (30 min each) at room temperature. The NC were placed in Lab-Tek Chamber slides (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and analyzed using an inverted microscope Zeiss Axiovert 200 equipped with an AxioCam MRC (Carl Zeiss, Jena, Germany), with AxioVision Rel 4.8 as image acquisition software. Alternatively, homogenates of NC, after exposition to FITC-labelled proteins and washes, were prepared by using glass beads (200 nm) and vortex (4 cycles of 1 min and 30 s of ice bath among cycles). The lysed tissue was centrifuged at 10,000g, during 10 min, the supernatant removed and the pellet washed 3 times with 50 mM NaPB at pH 6.5, containing 1 mM EDTA and 1 mM TCEP. The pellet was observed under UV light (Molecular Imager Gel Doc XR-Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Fluorescence microscopy with NC and Jbtx-FITC was also performed in the presence of all the artificial membranes described in this work. The fluorescence was measured using a Spectramax M5 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), with the treated NC placed in 96-wells black plates (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). All fluorescence measurements were expressed as a ratio between fluorescence emission and NC mass (mg).

2.4. Circular Dichroism (CD) spectroscopy

Circular dichroism spectra of 25 μM Jbtx solutions in 50 mM NaPB at pH 6.5 were recorded in 0.1 cm path length cuvettes at 25 °C using a Jasco 810 spectropolarimeter (Jasco Inc., Easton, MD, USA) in the 190 – 260 nm range, as a function of different amounts of SDS micelles, LUVs or lipid bicelles. The fraction of α-helices of the protein was calculated from mean residue ellipticity at 222 nm as previously reported [36,37]. Care was taken to obtain signals below the maximum value of the high-tension (HT) voltage, as provided by the spectropolarimeter manufacturer (700 V).

2.5. Nuclear magnetic resonance (NMR)

Samples of ca. 0.5 mM ¹⁵N-labelled Jbtx in 50 mM NaPB at pH 6.5, containing 1 mM EDTA 1 mM TCEP and 10% (v:v) D₂O were used for NMR spectroscopy. Standard ¹H,¹⁵N-HSQC spectra were acquired on a Bruker Avance 700 Spectrometer (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) as previously reported [5] in the absence and presence of different amounts of SDS micelles, LUVs or lipid bicelles. All data were processed using iNMR v.5.4.5 (www.inmr.net) and standard processing parameters.

3. Results

3.1. Interaction of Jbtx with biological membranes

Fluorescence microscopy demonstrated the occurrence of an interaction between *S. cerevisiae* and Jbtx-FITC (Fig. 1). This interac-

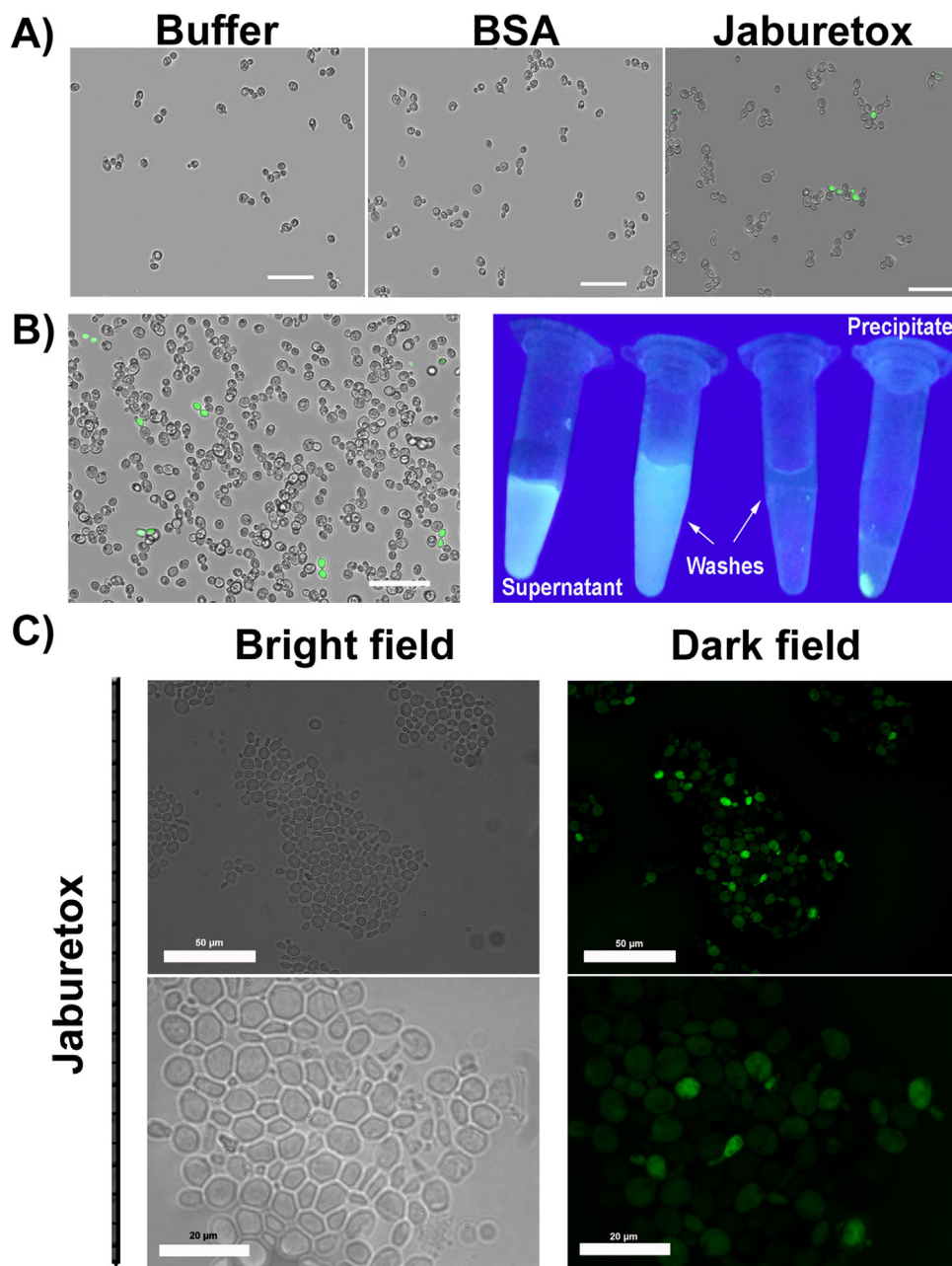


Fig. 1. Interaction of Jbtx-FITC with yeast cells as analyzed by fluorescence microscopy. **A)** *S. cerevisiae* cells after incubation with 23 μM Jbtx-FITC for 3 h at 4 $^{\circ}\text{C}$ (bar: 200 μm ; magnification 100 X; the pictures are merged (bright and dark fields)); the left and center panel show the same cells in buffer alone or containing BSA-FITC, while the right panel shows the cells in the presence of Jbtx-FITC. **B)** Left panel: *S. cerevisiae* cells after incubation with 23 μM Jbtx-FITC (3 h at 28 $^{\circ}\text{C}$), lysed using glass beads; right panel: supernatants and debris of lysed cells visualized under UV light (bar: 200 μm , magnification 200 X); **C)** *S. cerevisiae* cells after incubation with 23 μM Jbtx-FITC for 1 h of at 28 $^{\circ}\text{C}$; in the top and bottom panels the magnification is 400X (bar = 50 μm) and 1000X (bar = 20 μm), respectively; the left and right panels are distinguished by bright and dark field, respectively. In all cases, the excitation wavelength was 495 nm, and the emission was read at 519 nm.

tion was not observed using BSA-FITC (Fig. 1A), indicating a specific response to Jbtx. Similar experiments also revealed an interaction between the cockroach nerve cord (NC) and Jbtx-FITC, which appeared in greater intensity at the ganglia (Fig. 2). Experiments with a BSA-FITC conjugate performed in the same conditions indicated the absence of an interaction between the FITC moiety and lipids, supporting the specificity of the Jbtx interaction with NC (Fig. 2A). Fluorescence microscopy further proved that Jbtx-FITC interacts with the membrane debris obtained after cellular lysis of *S. cerevisiae* (Fig. 1B) and tissue homogenates of NC (Fig. 2B). In order to investigate the nature of this interaction, competition experiments were designed in which fluorescence microscopy, circular dichroism and NMR spectroscopy were used to monitor the influence of the presence of SDS micelles, LUVs and bicelles on the Jbtx

structure and function with respect to biological membranes. In particular, the results of exploratory experiments, shown in Fig. 4, revealed how increasing concentrations of SDS and different kinds of lipids affected the Jbtx-membranes interaction as probed using fluorescence microscopy, prompting more detailed experiments using a multiplicity of spectroscopic approaches aimed at the determination of the secondary and tertiary structure of the polypeptide in the different conditions.

3.2. Interaction of Jbtx with SDS Micelles

The critical micelle concentration (CMC) of SDS was determined by conductivity to be above 1.5 mM in 50 mM NaPB at pH 6.5, containing 1 mM EDTA and 1 mM TCEP (Fig. 3 A). When incubated

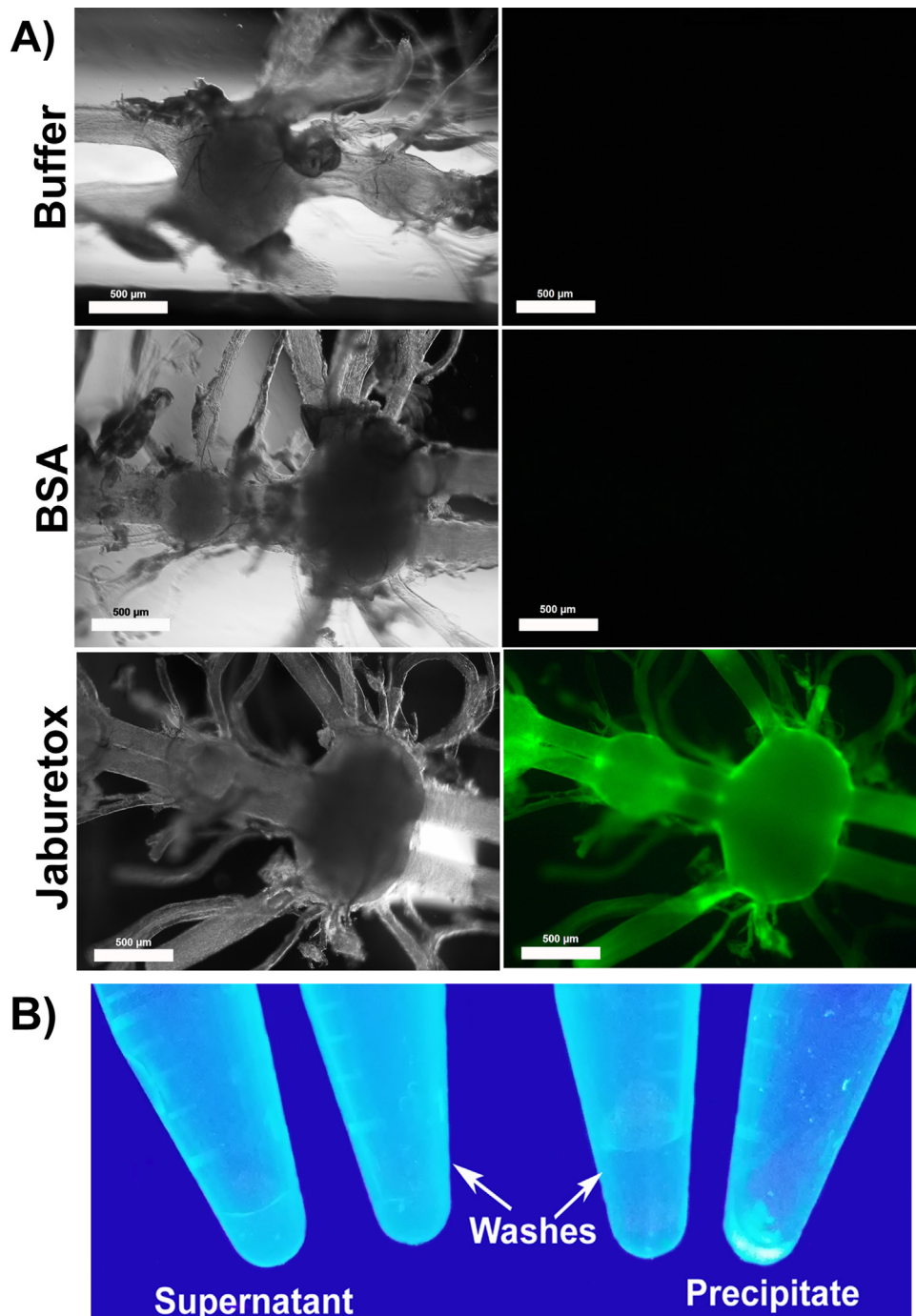


Fig. 2. Interaction of Jbtx-FITC with the nerve cord (NC) of the cockroach *N. cinerea* as analyzed by fluorescence microscopy. **A)** NC after incubation with 23 μM Jbtx-FITC for 1 h at room temperature in bright field (left panels) and dark field (right panels) in the presence of buffer only (top panels), BSA-FITC (middle panels) or Jbtx-FITC (bottom panels). Magnification of 50X, bars: 500 μm ; excitation wavelength at 495 nm, emission read at 519 nm. **B)** Homogenates of NC after incubation with Jbtx-FITC after cellular lysis. Supernatant and tissue debris visualized under a UV lamp.

at room temperature and analyzed by CD, the obtained micelles were able to induce modifications of the secondary structure of Jbtx (Fig. 3B). Indeed, while the CD spectrum of Jbtx in the absence of SDS presented a minimum centred at ca. 200 nm, characteristic of a random coil conformation, in the presence of 3–15 mM SDS this feature shifted to ~ 205 –210 nm, with the insurgence of a minimum at around 207 nm, typical of the presence of α -helices and β -sheets; consistently, the ellipticity increase around 195 nm suggests the acquisition of secondary structure by Jbtx in the presence of SDS micelles. A second minimum appeared at 222 nm, indicating the increase in the α -helical content from 5.8% to 13.6%, in the

absence and in the presence of SDS, respectively. The $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC NMR spectrum of Jbtx, recorded in the absence and presence of SDS below and above its CMC (0.25 and 10–15 mM, respectively, Fig. 3C) reveals that the protein does not change its structure in the presence of SDS below its CMC, while large chemical shifts modifications are observed in solutions containing SDS above the CMC, indicative of structural conformational changes. Attempts to specifically assign the NMR signals to the amino acid sequence of Jbtx in the presence of SDS above the CMC, using triple resonance experiments and the same approach used for Jbtx in aqueous solution [5] failed due to the lack of key through-bond connectivities, likely

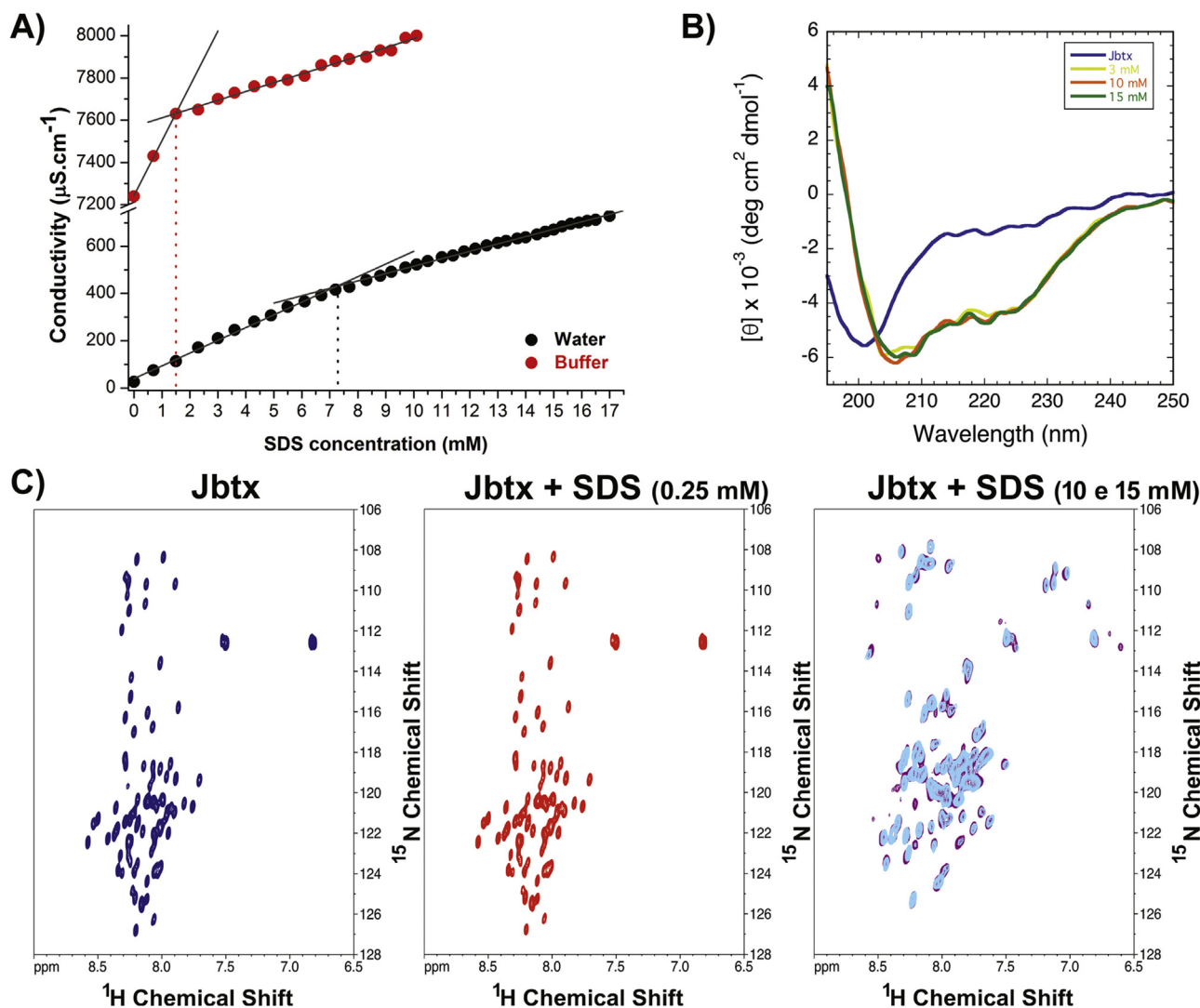


Fig. 3. Structural analysis of Jaburetox in the presence of SDS micelles. **A)** Determination of SDS critical micelle concentration (CMC) by conductivity measurements; red: 50 mM NaPB pH 6.5, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP (NaPB, pH 6.5); black: MilliQ water. **B)** Circular dichroism spectra of Jbtx in NaPB at pH 6.5 in the absence and presence of SDS in concentrations above its CMC (yellow: 3 mM SDS; orange: 10 mM SDS; green: 15 mM SDS). **C)** 700 MHz ^1H , ^{15}N -HSQC spectra of Jbtx (0.5 mM in NaPB pH 6.5) in the absence of SDS (left panel), with 0.25 mM SDS (center panel), and 10 mM or 15 mM SDS (right, violet or light blue). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

reflecting conformational changes in the intermediate time-scale regime. This observation, although qualitative, suggests that Jbtx decreases its mobility upon interaction with SDS micelles.

3.2.1. In vitro interaction of Jbtx-FITC with insect nerve cord in the presence of SDS micelles

Fluorescence microscopy experiments were performed to analyse the interaction of the protein with insect nervous tissues in presence of SDS. Jbtx-FITC and insect NC were incubated in the presence of micelles prepared with different concentrations of SDS. The interactions were estimated by fluorescence microscopy as well as by fluorimetry (Fig. 4A). In the presence of SDS below its CMC (0.1 mM), fluorescence intensity of Jbtx-FITC remained comparable to the control (Fig. 4A). On the other hand, a decrease in NC fluorescence was observed upon exposure of Jbtx-FITC to SDS concentrations above the CMC (10 mM). The binding of Jbtx-FITC to cockroach NC was reduced to ca. 25%, when either the labelled protein or the NC were pre-incubated in 10 mM SDS micelles solutions (Fig. 4A). These results indicate that SDS and insect NC compete for Jbtx interaction.

3.3. Interaction of Jbtx with Large Unilamellar Vesicles (LUVs)

In order to follow the modifications in the secondary structure of Jbtx, CD spectra were recorded as a function of different amounts of LUVs. No structural changes of Jbtx were detected in the presence of a mixture of PC and PG lipids in a proportion of 50:50 (w/w) (Fig. 5A) up to a final concentration of 1.0 mM. Negatively charged vesicles, containing only PG (Fig. 5B), produced a slight change in the CD spectrum at lipid concentrations above 1.0 mM. Although the NMR spectrum of Jbtx in the presence of 2 mM PG indicated no significant changes of the tertiary structure, some peaks related to amino acids at the N- and C-termini showed a decrease of intensity under this condition (Fig. 5C), indicative of changes in the peptide dynamics in these regions of the polypeptide.

Jbtx was also tested in the presence of other lipid components, such as PE:PC, POPC or a mixture of POPC and ergosterol in a proportion of 70:30 (w/w) (Fig. 6). In the presence of LUVs composed by PE:PC, a neutral lipid combination, Jbtx did not acquire any secondary structure (Fig. 6A). However, in the presence of POPC, a zwitterionic phospholipid, or POPC:Erg, the CD spectra of Jbtx

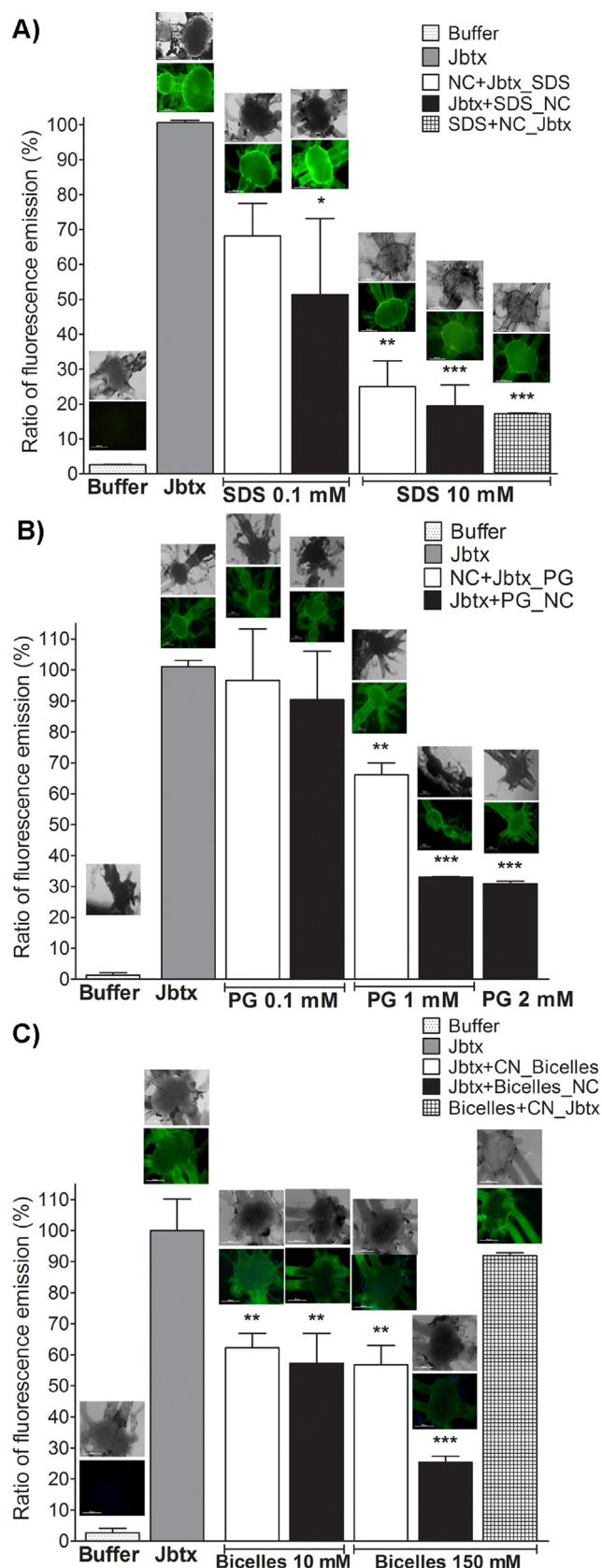


Fig. 4. Interaction of Jbtx-FITC with the nerve cord (NC) of the cockroach *N. cinerea* in the presence of micelles, LUVs and bicelles were analyzed by fluorescence microscopy. **A)** Fluorescence was recorded for NC after incubation with Jbtx-FITC in the absence or presence of 0.1 and 10 mM SDS concentrations. NC incubated with buffer alone (negative control, hatched bar), with Jbtx-FITC (positive control, gray bar), with Jbtx-FITC followed by a vigorous wash with buffer and then added with

showed a more pronounced in absence of ergosterol (compare Fig. 6B and C).

3.3.1. In vitro interaction of Jbtx-FITC with insect nerve cord in the presence of LUVs

Fluorescence microscopy experiments were performed to analyse the interaction of the protein with insect nervous tissues in presence of LUVs. The results of experiments conducted by incubating Jbtx-FITC and insect NC in the presence of LUVs (Fig. 4B) indicated that negatively charged LUVs (made with PG above 1 mM concentration) affected the interaction. In particular, preincubation of Jaburetox with 1 mM PG-based LUVs decreased the subsequent binding of the protein to NC to ca. 35% (Fig. 4B), while addition of LUVs to a preincubated Jbtx-FITC/NC mixture reduced the fluorescence intensity by only 25%. This suggests that changes in the structure of Jbtx and/or by sequestration of this polypeptide from solution occur upon addition of LUVs.

3.4. Interaction of Jbtx with Bicelles

Bicelles are currently considered the best model to study protein-membrane interactions [23,24,32]. Compared to the CD spectrum of free Jbtx, which showed a pronounced negative peak around 200 nm typical of random coil structures, the CD spectrum of Jbtx in the presence of negatively charged bicelles shows a reduced intensity in the random coil region, indicative of an increase in the polypeptide secondary structure content (Fig. 7A). In the presence of neutral bicelles, the differences in the CD spectrum are less noticeable (Fig. 7C). Superimposition of the NMR spectra of Jbtx in the absence and presence of bicelles revealed some changes in the chemical shift of a number of amino acids, even though the characteristic profile of an intrinsically disordered protein was maintained (Fig. 7B and D). The corresponding NMR spectra were similar in the two cases of neutral or negatively charged bicelles, with changes in secondary structure of Jbtx resulting more intense in the latter case (Fig. 7A and C). The analysis of the chemical shift perturbations along the peptide chain of Jbtx showed consistent changes localised at the N- and C-termini of the protein (Fig. 7E). The regions in the amino acid sequence of Jbtx that show more significant perturbations of chemical shifts in the presence of bicelles are shown in Fig. 7F.

3.4.1. In vitro interaction of Jbtx-FITC with insect nerve cord in the presence of bicelles

The experiments with Jbtx and insect NC in presence of negatively charged bicelles (Fig. 4C) gave results similar to those obtained for LUVs. As shown in Fig. 4C, the interaction between Jbtx-FITC and NC was decreased to about 60% after addition of bicelles prepared with 10 or 150 mM lipids. On the other hand,

different concentrations of SDS (white bars), with a solution of Jbtx preincubated with SDS (black bars) or with SDS followed by Jbtx (plaid bar). **B)** Fluorescence was recorded for NC after incubation with Jbtx-FITC in the absence or presence of LUVs made only of PG in different concentrations (0.1, 1.0 and 2.0 mM). NC incubated with buffer alone (negative control, with Jbtx-FITC (positive control, gray bar), with Jbtx-FITC followed by a vigorous wash with buffer and then added with different concentrations of PG LUVs (white bars), with a solution of Jbtx preincubated with PG LUVs (black bars). **C)** Fluorescence was recorded for NC after incubation with Jbtx-FITC in the absence or presence of 10 and 150 mM negatively charged bicelles made by a mixture of DHPC:DMPC:DMPG in a molar ratio of 66.6:16.7:16.7. NC incubated with buffer alone (negative control, hatched bar), with Jbtx-FITC (positive control, gray bar), with Jbtx-FITC followed by a vigorous wash with buffer and then added with different concentrations of bicelles (white bars), with a solution of Jbtx preincubated with bicelles (black bars) or with bicelles followed by Jbtx (plaid bar). The interaction was expressed as the percentage of the ratio of fluorescence emission and NC mass (mg), considering the value obtained for Jbtx-FITC alone as 100%. Data are mean \pm S.E.M. (**p < 0.05) and performed as a triplicate. In all cases, the concentration of Jbtx-FITC was 23 μ M (magnification 50X).

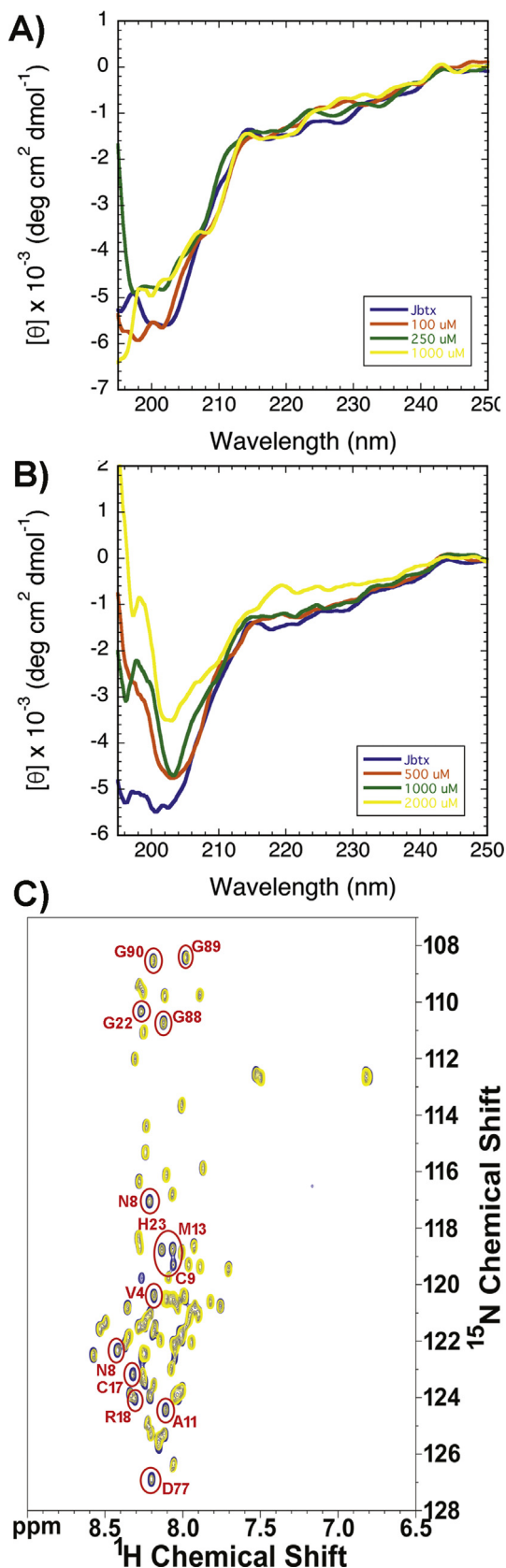


Fig. 5. Structural analysis of Jbtx in the presence of negatively charged LUVs. **A)** Circular dichroism spectrum in the presence of LUVs made using 50:50 (w/w) PC:PG. Blue, orange, green and yellow traces refer to Jbtx in the presence 0, 100, 250, and 1000 μM PC:PG LUVs, respectively. **B)** Circular dichroism spectrum of Jbtx in the presence of PG-LUVs. Blue, orange, green and yellow traces refer to Jbtx in the presence of 0, 500, 1000, and 2000 μM

pre-incubation of Jbtx-FITC with 150 mM lipid bicelles inhibited the binding of the polypeptide to NC to ca. 30% as indicated by fluorescence microscopy (Fig. 4C). This suggests, similarly to what observed for LUVs, that Jbtx is able to interact with the lipid bilayer of bicelles.

4. Discussion

The interaction of Jbtx with membrane lipids was postulated as the mechanism underlying the protein's insecticidal or antifungal effects, either by pore formation or by alteration of cell membrane properties, or a combination of both [3]. In the present work, we provide direct demonstration of the interaction of fluorescein-labelled Jbtx with yeast (Fig. 1) and with the cockroach nervous cord (Fig. 2). Jbtx-yeast interaction was demonstrated employing fluorescence microscopy. This interaction occurred either at 4 °C (Fig. 1A) or at 28 °C (Fig. 1B,C), the former a condition that inhibits endocytosis [38], suggesting that targets of Jbtx are present on the yeast external membrane. Here we showed that fluorescein-labelled Jbtx remains attached to cellular debris after yeast cell lysis (Fig. 1B), confirming the presence of Jbtx's ligands on the cell membranes fraction.

In order to gain information on the structure of Jbtx in the polypeptide-membrane complex, circular dichroism and NMR spectroscopy were used to monitor changes in the secondary and tertiary structure of Jbtx upon interaction with artificial membrane models. This approach was chosen, instead of using yeast or insect membranes, because the viscosity, heterogeneity, and large molecular sizes of the membrane fragments obtained after cellular lysis would hamper the structural analyses by CD or NMR.

The first model employed was made of micelles composed by SDS [21,39,40]. Although SDS micelles are a poor model for biological membranes [20], Jbtx promptly interacted with these vesicles justifying further studies on this interaction. Increasing the concentration of SDS above the CMC, an incremental modification of the secondary structure of Jbtx was observed using CD and NMR spectroscopies, and a final and stable conformation was attained (Fig. 3B and C). This observation indicates that Jbtx assumes a well-defined conformation in the presence of SDS micelles. Addition of SDS micelles disrupted the polypeptide-NC interaction (Fig. 4A), an effect that could be due either to a competitive effect of the micelles sequestering Jbtx and hindering its binding to the NC, or to the detergent effect of SDS extracting lipids from the membrane, and leading to protein denaturation. In either case, this experiment proved the existence of Jbtx-lipid interactions. SDS micelles have been classically used to mimic membranes. However, the strong curvature of these micelles, their small size, the low similarity of their composition as compared to the lipid composition of cell membranes does not make them an optimal model for protein-membrane interaction studies. Indeed, small peptides can be over-structured in the presence of detergents [20,41]. Therefore, we complemented the study of SDS micelles with the use of artificial membranes composed of phospholipids. LUVs made of different phospholipid contents produced slight changes in the protein CD spectra, likely reflecting a modification of secondary structure. Vesicles made of a negatively charged phospholipid (PG) or a zwitterionic phospholipid (POPC), lipids previously shown to somehow interact with Jbtx [12–15], had indeed the more pronounced visible effects (Figs. 4 B, 5 B and 6 B).

M PG-LUVs, respectively. **C)** 700 MHz ^1H , ^{15}N -HSQC spectra of Jbtx in the absence (blue) or presence (yellow) of 2 mM PG LUVs. Red circles highlight the amino acids with lower signal intensity in the NMR spectrum for Jbtx in the presence of PG LUVs. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

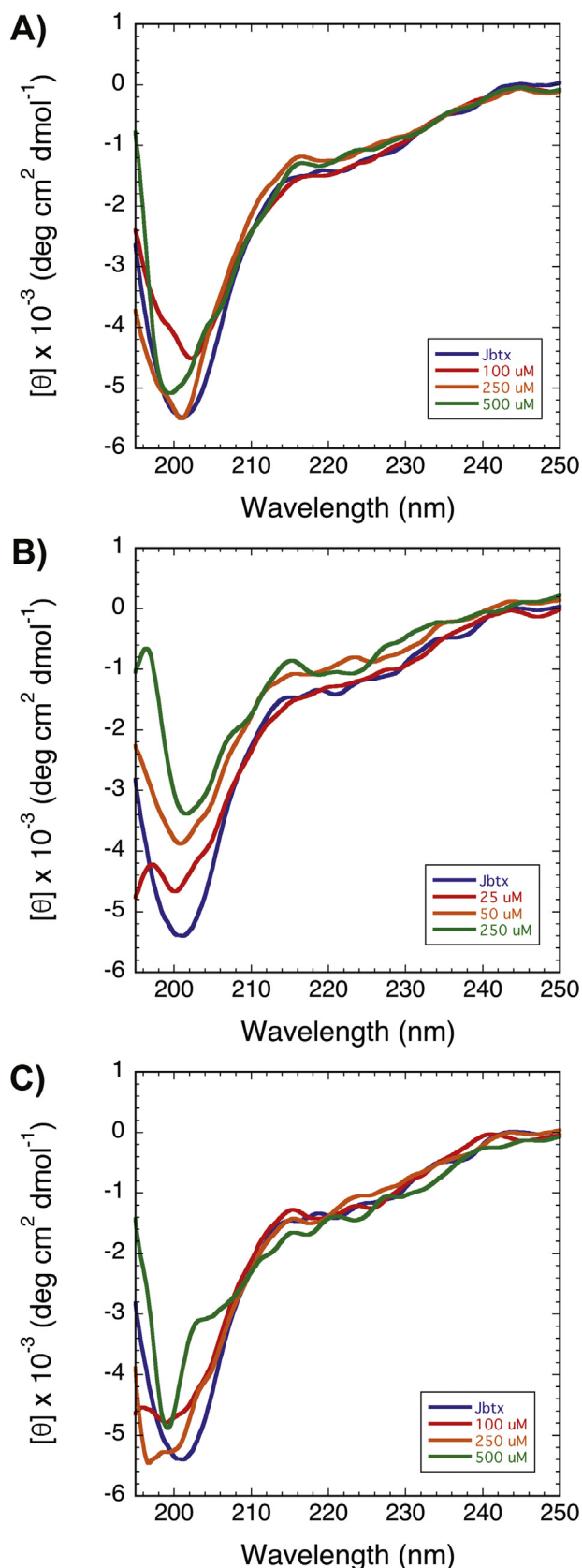


Fig. 6. Circular dichroism spectra of Jbtx in presence of LUVs of different lipid compositions. **A)** 0, 100, 250, and 500 μM PE:PC (blue, red, orange and green traces, respectively); **B)** 0, 25, 50, and 250 μM POPC (blue, red, orange and green traces, respectively); **C)** 0, 100, 250 and 500 μM 70:30 (w:w) POPC:Erg (blue, red, orange and green traces, respectively). All LUVs were prepared with buffer NaPB 50 mM

Jbtx binding to insect NC membranes was affected by the addition of LUVs and bicelles (Fig. 4B and C, respectively). When the polypeptide was pre-incubated with PG vesicles before addition to the NC, the fluorescence decreased to less than 50% of the initial values (Fig. 4B). A similar effect was observed when Jbtx was pre-incubated with bicelles, which caused a reduction in binding of more than 70% (Fig. 4C). This effect was seen only for Jbtx, not for bovine serum albumin, confirming the selectivity of the polypeptide interaction with lipids/phospholipids [12–15]. This result also indicated that PG vesicles competed with the insect NC membranes as a target for the binding of Jbtx. The structural changes in Jbtx seen upon its interaction with PG LUVs (Fig. 5C) were evident in the NMR analyses as decreased backbone intensity for some amino acids, consistent with a decrease in backbone mobility from a fast exchange to an intermediate exchange regime. These changes occurred in regions comprising amino acids 12–16 and 63–74, close to the N- and C-termini of the protein, previously shown by NMR to feature a transient α -helix (or single helix turn) and an α turn-like fold, respectively [5]. This observation suggests the increase of secondary structure propensity in these regions, with a local decrease of backbone mobility as compared to the peptide alone.

A third membrane model used in this study were bicelles, in which the membrane curvature further decreases as they are made of large and flat lipid bilayers. The phospholipid dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) organizes itself as a bilayer membrane stabilized by the addition of the detergent-like dihexanoylphosphatidylcholine (DHPC), with no aqueous portion inside the bicelle structure [24,32]. We applied CD to investigate the interaction of Jbtx with these bicelles. No significant changes in secondary structure upon exposition to electrically neutral bicelles was observed, contrasting to Jbtx's behaviour in the presence of negatively charged bicelles (Fig. 7A and C). In the latter case, the CD spectrum of Jbtx showed a decrease of ellipticity in the random coil region, likely indicating a gain of secondary structure by the protein. These changes in secondary structure did not lead to significant changes at the tertiary level, because the protein remained mostly disordered, as shown by NMR. On the other hand, either in the presence of neutral or negative bicelles, the backbone NMR chemical shifts were slightly modified, as shown in Fig. 7E. These shifts, assigned by simple inspection of the spectrum and using the criterion of signal proximity, are localised in the N- and C-terminal regions of the protein, in agreement with the modifications seen with LUVs (Fig. 5) as well as with previous results that demonstrated that these regions of Jbtx are able to cause leakage from lipid vesicles [15]. In addition, the region around residues 65–73 appears to be affected by the largest chemical shift perturbation. It is interesting to notice that this region corresponds to that for which molecular modeling studies suggested the existence of a β -hairpin motif [6,12], also observed in the crystallographic structure of JBU [44], leading to the hypothesis that it could be a factor for the membrane-disturbing activity of Jbtx [12,45]. However, later studies [14,15] appear to exclude this region as the biologically active portion of the molecule. It is possible that this region becomes important for the interaction of Jbtx with selective types of membranes.

5. Conclusions

Using biochemical and structural approaches we investigated the structural behaviour of Jbtx in the presence of natural membranes and membrane models, showing that, when incubated with negatively charged phospholipid vesicles, the protein undergoes changes in its secondary structure and final conformation. The

at pH 6.5. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

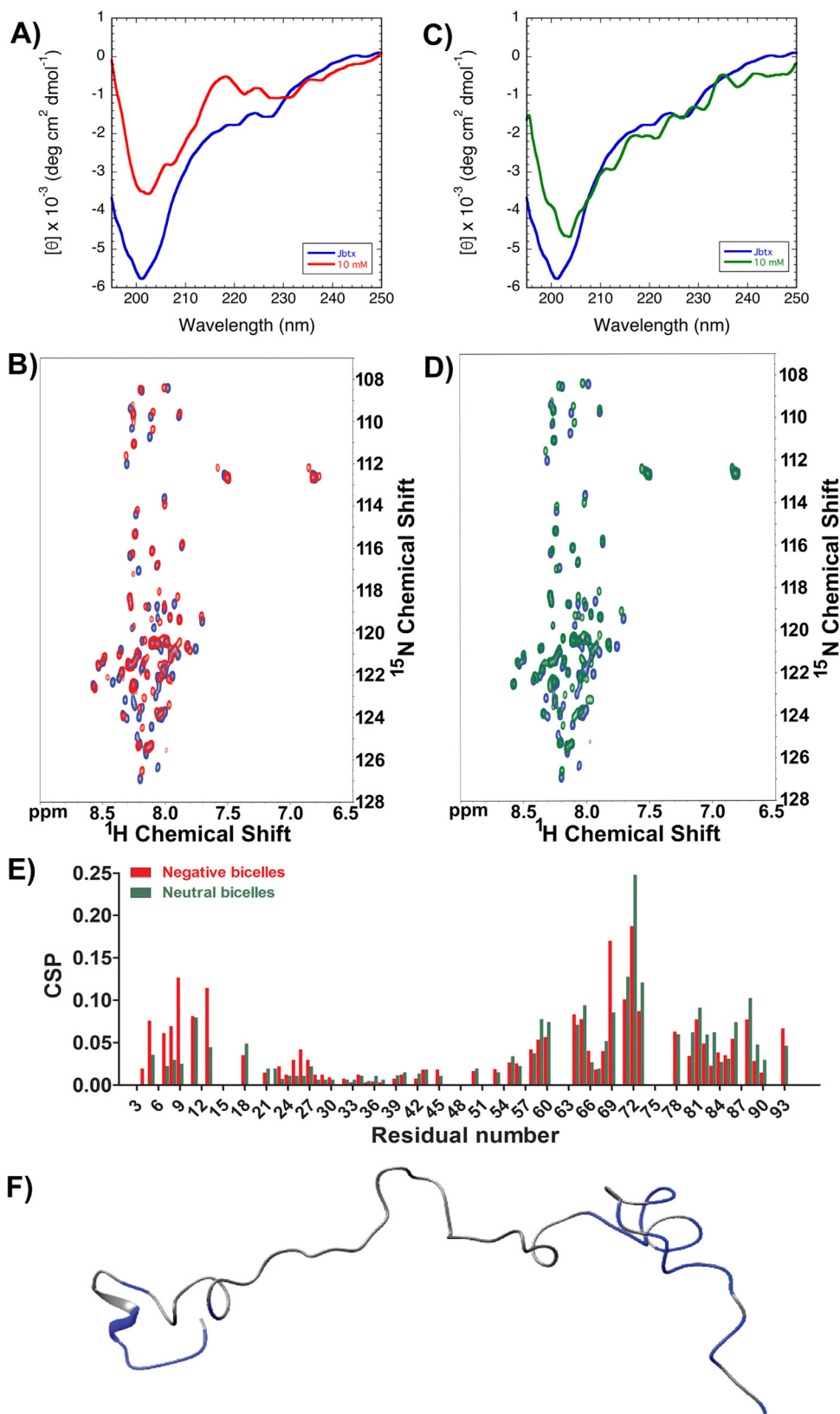


Fig. 7. Structural analysis of Jbtx in presence of bicelles. **A)** Circular dichroism spectra of Jbtx in the absence (blue) and presence (red) of 10 mM negatively charged bicelles; **B)** 700 MHz ¹H, ¹⁵N HSQC spectrum of Jbtx in the absence (blue) and presence (red) of 150 mM negatively charged bicelles; **C)** Circular dichroism spectra of Jbtx in the absence (blue) and presence (green) of 10 mM charge neutral bicelles; **D)** 700 MHz ¹H, ¹⁵N HSQC spectrum of Jbtx in the absence (blue) and presence (green) of 150 mM charge neutral bicelles; **E)** sequence-specific chemical shift perturbations (CSP) for Jbtx in presence of negatively charged (red) and charge neutral (green) bicelles. **F)** NMR structure of Jbtx (PDB code 2MM8). Amino acids highlighted in blue correspond to values of CSP > 0.025 ppm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

changes in the secondary structure of Jbtx in the presence of unilamellar vesicles and bicelles were less evident than in the presence of SDS micelles. An increase in the rigidity of the polypeptide backbone at its N- and C-termini segments was observed in the presence of phospholipid vesicles, and these same segments acquired secondary structure elements. Therefore, this study provides evidence supporting the hypothesis that Jbtx interacts with lipids/phospholipids, complementing previous biological assays with structural analysis of CD and NMR spectroscopic data. However, this interaction alone does not induce a complete transition of the polypeptide from an unfolded to a folded state. We speculate that Jbtx interacts with membrane phospholipids inducing small structural changes that could facilitate its binding to putative membrane receptors with acquisition of a fully folded state. Alternatively, phospholipid-bound Jbtx, although still non-structured, would insert further into the cell membrane, altering its physical properties [13] or forming ion-channel-like pores [14] that could affect cellular functions. Either or both these two mechanisms could serve as the basis for the protein toxic activities. Not all intrinsically disordered proteins become folded when meeting their binding partners. Some of them remain unfolded, even when biologically active [16,42,43]. Jbtx seems to be part of this class of IDPs, because the protein is disordered in aqueous solution and, despite its binding to lipids/phospholipids *in vivo*, it does not acquire a defined fold upon interaction with distinct types of phospholipid-based membrane models.

Author contributions

CRC and SC coordinated the project and wrote the manuscript. VB and AHSM designed the protocols, participated in all experiments and wrote the manuscript. FCL participated in the protein purification and fluorescence microscopy experiments, LLF participated in the fluorescence microscopy experiments, BZ assisted in the circular dichroism experiments, ES assisted with expression and protein purification, OD assisted with bicelles experiment design. All authors have approved the final article version.

Fundings

This work was supported by the Brazilian agency Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES), Projeto Pesquisador Visitante – PVE 054/2012, Science Without Borders and Edital Toxinologia – Nr. 63/2010; and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Edital Universal grant 446052/2014-1. CIRMMMP (Consorzio Interuniversitario di Risonanze Magnetiche di Metallo-Proteine) also supported the project by providing access to its NMR facility. VB received a split Ph.D. fellowship (PVE 054/2012) and AHSM, a Post-doctoral fellowship (BEX 8842/14-0), from CAPES, for studies at the University of Bologna, Italy.

Acknowledgments

The authors thank Massimo Lucci and Fabio Calogiuri for acquiring the NMR spectra at the Center for Magnetic Resonance (Sesto Fiorentino, Italy). The authors thank Dr. Rodrigo Ligabue-Braun for useful discussions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.053>.

References

- [1] C.R. Carlini, A.E.A. Oliveira, P. Azambuja, J. Xavier, M.A. Wells, J. Xavier-Filho, M.A. Wells, Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes, *J. Econ. Entomol.* 90 (1997) 340–348, <http://dx.doi.org/10.1093/jee/90.2.340>.
- [2] M.S. Defferrari, D.R. Demartini, T.B. Marcelino, P.M. Pinto, C.R. Carlini, Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* major urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41 (2011) 388–399, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.008>.
- [3] C.R. Carlini, R. Ligabue-Braun, Ureasas as multifunctional toxic proteins: a review, *Toxicon* 110 (2016) 90–109, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.020>.
- [4] C.T. Ferreira-DaSilva, M.E.C. Gombarovits, H. Masuda, C.M. Oliveira, C.R. Carlini, Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect Cathepsin-like enzymes, *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 44 (2000) 162–171, [http://dx.doi.org/10.1002/1520-6327\(200008\)44:4<162::aid-arch3>3.0.co;2-#](http://dx.doi.org/10.1002/1520-6327(200008)44:4<162::aid-arch3>3.0.co;2-#).
- [5] F.C. Lopes, O. Dobrovolska, R. Real-Guerra, V. Broll, B. Zambelli, F. Musiani, V.N. Uversky, C.R. Carlini, S. Ciurli, Pliable natural biocide: jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease, *FEBS J.* 282 (2015) 1043–1064, <http://dx.doi.org/10.1111/febs.13201>.
- [6] F. Mulinari, F. Stanisçuaski, L.R. Bertholdo-Vargas, M. Postal, O.B. Oliveira-Neto, D.J. Rigden, M.F. Grossi-de-Sá, C.R. Carlini, Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*, *Peptides* 28 (2007) 2042–2050, <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2007.08.009>.
- [7] G. Tomazetto, F. Mulinari, F. Stanisçuaski, B. Settembrini, C.R. Carlini, M. Antônio, Z. Ayub, Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity, *Enzyme Microb. Technol.* 41 (2007) 821–827, <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.07.006>.
- [8] F. Stanisçuaski, V. Te Brugge, C.R. Carlini, I. Orchard, In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules, *J. Insect Physiol.* 55 (2009) 255–263, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.12.002>.
- [9] G.L. Galvani, L.L. Fruttero, M.F. Coronel, S. Nowicki, D.R. Demartini, M.S. Defferrari, M. Postal, L.E. Canavoso, C.R. Carlini, B.P. Settembrini, Effect of the urease-derived peptide Jaburetox on the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: heteroptera), *BBA – Gen. Subj.* 2015 (1850) 255–262, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.008>.
- [10] L.L. Fruttero, N.R. Moyetta, A.F. Uberty, M.V. Coste Grahl, F.C. Lopes, V. Broll, D. Feder, C.R. Carlini, Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*, *Parasit. Vectors.* 9 (2016) 1–14, <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1710-3>.
- [11] M. Postal, A.H.S. Martinelli, A.B. Becker-Ritt, R. Ligabue-Braun, D.R. Demartini, S.F.F. Ribeiro, G. Pasquali, V.M. Gomes, C.R. Carlini, Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides, *Peptides* 38 (2012) 22–32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.010>.
- [12] P.R. Barros, H. Stassen, M.S. Freitas, C.R. Carlini, M.A.C. Nascimento, C. Follmer, Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases, *BBA – Proteins Proteomics* 2009 (1794) 1848–1854, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.09.001>.
- [13] Y.M.S. Micheletto, C.F. Moro, F.C. Lopes, R. Ligabue-Braun, A.H.S. Martinelli, C.M. Marques, A.P. Schroder, C.R. Carlini, N.P. da Silveira, Interaction of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease and a derived peptide with lipid vesicles, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 145 (2016) 576–585, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.063>.
- [14] A.R. Piovesan, A.H.S. Martinelli, R. Ligabue-Braun, J.-L. Schwartz, C.R. Carlini, *Canavalia ensiformis* *Canavalia ensiformis* urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers, *Arch. Biochem. Biophys.* 547 (2014) 6–17, <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.02.006>.
- [15] A.H.S. Martinelli, K. Kappaun, R. Ligabue-Braun, M.S. Defferrari, A.R. Piovesan, F. Stanisçuaski, D.R. Demartini, C.A. Dal Belo, C.G.M. Almeida, C. Follmer, H. Verli, C.R. Carlini, G. Pasquali, Structure–function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease, *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* 1840 (2014) 935–944, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.010>.
- [16] V.N. Uversky, Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins, *BBA – Proteins Proteomics.* 1834 (2013) 932–951, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.12.008>.
- [17] V.N. Uversky, Dancing protein clouds: the strange biology and chaotic physics of intrinsically disordered proteins, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 6681–6688, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R115.685859>.
- [18] P. Tompa, M. Fuxreiter, Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein–protein interactions, *Trends Biochem. Sci.* 33 (2008) 2–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2007.10.003>.
- [19] V.N. Uversky, Intrinsically disordered proteins and their environment: effects of strong denaturants, temperature, pH, counter ions, membranes, binding partners, osmolytes, and macromolecular crowding, *Protein J.* 28 (2009) 305–325, <http://dx.doi.org/10.1007/s10930-009-9201-4>.

- [20] L. Måler, Solution NMR studies of cell-penetrating peptides in model membrane systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 1002–1011, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.011>.
- [21] D. Otzen, Protein–surfactant interactions: a tale of many states, *BBA – Proteins Proteomics* 1814 (2011) 562–591, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.03.003>.
- [22] M. Baginski, B. Cybulska, W.I. Gruszecki, Chapter 9 – Interaction of polyene macrolide antibiotics with lipid model membranes, *Adv. Planar Lipid Bilayers Liposomes* 3 (2006) 269–329, [http://dx.doi.org/10.1016/S1554-4516\(05\)03009-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1554-4516(05)03009-7).
- [23] C.R. Sanders, R.S. Prosser, Bicycles: a model membrane system for all seasons? *Structure* 6 (1998) 1227–1234, [http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00123-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00123-3).
- [24] A. Diller, C. Loudet, F. Aussenac, G. Raffard, S. Fournier, M. Laguerre, A. Grélard, S.J. Opella, F.M. Marassi, E.J. Dufourc, Bicycles A natural molecular goniometer for structural, dynamical and topological studies of molecules in membranes, *Biochimie* 91 (2009) 744–751, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.02.003>.
- [25] C. Loudet, A. Diller, A. Grélard, R. Oda, E.J. Dufourc, Biphenyl phosphatidylcholine: a promoter of liposome deformation and bicelle collective orientation by magnetic fields, *Prog. Lipid Res.* 49 (2010) 289–297, <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2010.02.002>.
- [26] J.A. Whiles, K.J. Glover, R.R. Vold, E.A. Komives, Methods for studying transmembrane peptides in bicycles: consequences of hydrophobic mismatch and peptide sequence, *J. Magn. Reson.* 158 (2002) 149–156, [http://dx.doi.org/10.1016/S1090-7807\(02\)00068-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1090-7807(02)00068-X).
- [27] M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [28] J.A. Glasel, Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios, *Biotechniques* 18 (1995) 62–63 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7702855>.
- [29] T.S. Banipal, H. Kaur, P.K. Banipal, A.K. Sood, Effect of head groups, temperature, and polymer concentration on surfactant – Polymer interactions, *J. Surfactants Deterg.* 17 (2014) 1181–1191, <http://dx.doi.org/10.1007/s11743-014-1633-y>.
- [30] M. Hope, M. Bally, G. Webb, P. Cullis, Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential, *Biochim. Biophys. Acta.* 812 (1985) 55–65, [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90521-8](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736(85)90521-8).
- [31] B. Mui, L. Chow, M.J. Hope, Extrusion technique to generate liposomes of defined size, *Methods Enzymol.* 367 (2003) 3–14, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)67001-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(03)67001-1).
- [32] M. Beaugrand, A.A. Arnold, J. Me Hein, D.E. Warschawski, P.T.F. Williamson, I. Marcotte, Lipid concentration and molar ratio boundaries for the use of isotropic bicycles, *Langmuir ACS J. Surfaces Colloids.* 30 (2014) 6162–6170, <http://dx.doi.org/10.1021/la5004353>.
- [33] L. Måler, A. Gråslund, Artificial membrane models for the study of macromolecular delivery, *Methods Mol. Biol.* 480 (2009) 129–139, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-429-2_9.
- [34] G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 1996.
- [35] F. Sherman, Getting started with yeast, *Methods Enzymol.* 350 (2002) 3–41, [http://dx.doi.org/10.1016/S0261-3069\(97\)88930-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0261-3069(97)88930-3).
- [36] C.A. Rohl, R.L. Baldwin, Articles comparison of NH exchange and circular dichroism as Techniques for measuring the parameters of the helix-coil transition in peptidest, *Bai Englander.* 36 (1972) 8435–8442, <http://dx.doi.org/10.1021/bi9706677>.
- [37] E. Baraldi, E. Collier, L. Zoli, A. Cestaro, S.C.E. Tosatto, B. Zambelli, Unfoldome variation upon plant–pathogen interactions: strawberry infection by *Colletotrichum acutatum*, *Plant Mol. Biol.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-015-0353-7>.
- [38] R.E. Pagano, L. Huang, C. Wey, Interaction of phospholipid vesicles with cultured mammalian cells, *Nature* 252 (1974) 166–167, <http://dx.doi.org/10.1038/252166a0>.
- [39] R.M. Garavito, S. Ferguson-Miller, Detergents as tools in membrane biochemistry, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 32403–32406, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R100031200>.
- [40] V. Opatova, M.A. Arnedo, Spiders on a hot volcanic roof: colonisation pathways and phylogeography of the canary islands endemic trap-door spider *Titanidiops canariensis* (araneae, idiopidae), *PLoS One* 9 (2014), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103118>.
- [41] P. Damberg, J. Jarvet, A.J. Gråslund, Micellar systems as solvents in peptide and protein structure determination, *Methods Enzymol.* 339 (2001) 271–285, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)39318-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(01)39318-7).
- [42] V.N. Uversky, The multifaceted roles of intrinsic disorder in protein complexes, *FEBS Lett.* 589 (2015) 2498–2506, <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.004>.
- [43] E. Hazy, P. Tompa, Limitations of induced folding in molecular recognition by intrinsically disordered proteins, *Chemphyschem* 10 (2009) 1415–1419, <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.200900205>.
- [44] A. Balasubramanian, K. Ponnuraj, Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure, *J. Mol. Biol.* 400 (2010) 274–283, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.009>.
- [45] A. Balasubramanian, N. Balaji, N. Gautham, K. Ponnuraj, Molecular dynamics simulation and molecular modelling studies on the insecticidal domain from jack bean urease, *J. Mol. Biol.* 39 (2013) 357–366, <http://dx.doi.org/10.1080/08927022.2012.729271>.

Supplementary Data

Supplementary data - Protein purification

Jbtx was purified according to Lopes et al., 2015 (Lopes et al. 2015) with modifications as follows. The protein fraction eluted from the Ni-loaded affinity column was loaded into a Superdex 75 column in 25 mL of buffer A containing 500 mM imidazole and further separated by size exclusion chromatography. The in tandem chromatography in Figure S1A shows in a group of peaks at 50 to 100 mL retention volume. These fractions (2 mL each) were analyzed by electrophoresis (Figure S1A, inset on the left), which indicated the presence of Jbtx in fractions 14 to 27. These fractions were pooled and concentrated. The last purification step was a small-scale gel filtration on a Superdex 75 10/300 column (Figure S1B). All eluted fractions (0.2 mL each) were checked by SDS-PAGE (Figure S1B, inset on the left). Fractions containing Jbtx, 9 to 17, were pooled and concentrated up to 0.1 mM or 0.7 mM, and stored at -80°C to be used for CD and NMR experiments, respectively.

Supplementary data figure S1

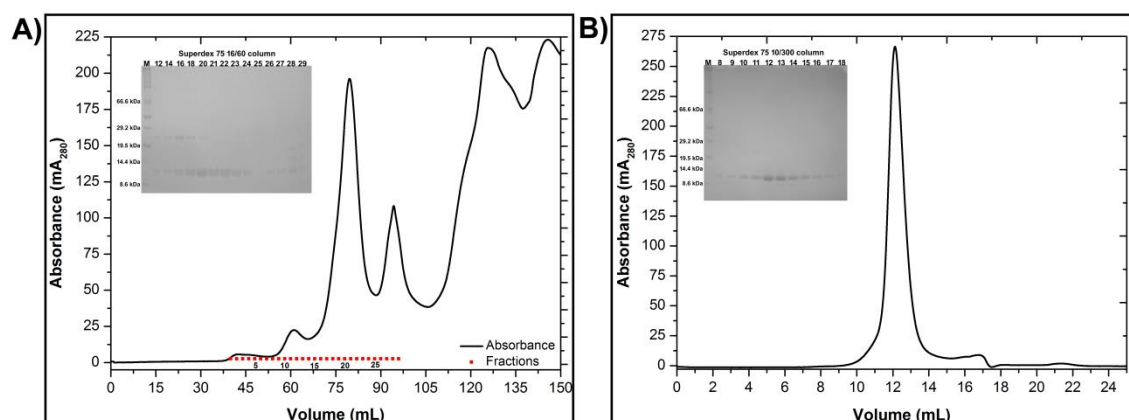


Figure S1: Purification of Jaburetox. A) Chromatogram of the in tandem affinity chromatography in Ni^{+2} -loaded His-Trap HP column connected to a Superdex 75 16/60 column. The inset on the left shows SDS-PAGE of the fractions collected. B) The pool of fractions obtained in panel A were submitted to a “polishing” gel filtration step on a Superdex 75 10/300 column, equilibrated in 50 mM of sodium phosphate buffer pH 6.5, containing 1 mM EDTA and 1 mM TCEP. The inset on the left shows the SDS-PAGE of the fractions collected in this chromatographic step.

3 DISCUSSÃO GERAL

O estudo da atividade biológica das ureases não relacionadas à sua atividade ureolítica vem sendo explorado já há alguns anos pelo nosso grupo. A urease de *Proteus mirabilis* possui, como mencionado anteriormente, três subunidades estruturais, e até o momento, o nosso grupo não havia estudado nem esta urease com profundidade, tampouco ureases com três subunidades.

Para expressão da PMU utilizamos um construto gentilmente cedido pelo Dr. Harry T. Mobley (Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade de Michigan Escola Médica, Ann Arbor, MI, EUA). Para expressão das proteínas estruturais PmUre α , PmUre β e PmUre γ , três plasmídeos recombinantes foram contruídos, cada um contendo os genes *ureC*, *ureB* e *ureA*, respectivamente.

PmUre γ foi purificada com apenas uma etapa cromatográfica, devido à adição da sequência StrepTagII à porção N-terminal da proteína. A cauda peptídica StrepTagII[®] foi também adicionada à porção N-terminal das proteínas PmUre β e PmUre α . Ambas proteínas após ressuspensão a partir de corpos de inclusão foram purificadas em apenas uma etapa cromatográfica.

Como pode ser visto na Tabela 1, nosso grupo investigou diferentes propriedades biológicas de ureases, utilizando ureases provenientes de plantas como fonte para estudos mais aprofundados (STANISÇUASKI & CARLINI, 2012; CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016; MARTINELLI *et al.*, 2016). Em 2012, nosso grupo verificou que não apenas urease de plantas apresentavam atividade entomotóxica mas também ureases bacterianas. No estudo feito por Salvadori e colaboradores, foi visto que a urease de *P. genus* apresentava atividade entomotóxica contra larvas de *Spodoptera frugiperda* após injeção na hemocele (SALVADORI *et al.*, 2012; CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016). Em outro estudo, Chouia e colaboradores decreveram que, após reativação da urease silenciada de *Yersinia pseudotuberculosis*, esta bactéria apresentava atividade entomotóxica contra moscas do tipo *Oropsylla montana* (CHOUKHA & HINNEBUSCH, 2014).

No presente trabalho, demonstramos que as subunidades estruturais da PMU apresentam atividade inseticida, semelhante àquela já descrita para outras ureases. PmUre γ

e PmUre β foram capazes de causar a morte de insetos *D. peruvianus* após injeção e ingestão, respectivamente, das proteínas (Figura 5A e 5B [Capítulo 1]).

A JBU e seu polipeptídeo derivado, Jbtx, são capazes de ativar o sistema imune de insetos, onde, após a ingestão ou injeção destas proteínas, foi verificada agregação de hemócitos, seja por administração *in vivo* ou *in vitro* (DEFFERRARI *et al.*, 2014; FRUTTERO *et al.*, 2016). Como pode ser visto na Figura 5C [Capítulo 1] ambas subunidades, PmUre γ e PmUre β mostraram-se capazes de ativar agregação de hemócitos. Estes dados concordam amplamente com os achados relativos aos experimentos com *D. peruvianus*. Determinamos também que a agregação de hemócitos promovida pelas subunidades da PMU ocorre de forma cátion dependente (Figura 5C [Capítulo 1]), assim como verificado para JBU e Jbtx (DEFFERRARI *et al.*, 2014; FRUTTERO *et al.*, 2016). A partir de análises de duplicação gênica foram detectadas a presença de duas porções semelhantes ao polipeptídeo em cada uma das subunidades alfa e beta da PMU.

Desde os anos 80 nosso grupo vem demonstrando que ureases são capazes de ativar agregação plaquetária (CARLINI *et al.*, 1985; GHAZALEH *et al.*, 1997; FOLLMER *et al.*, 2004; OLIVERA-SEVERO *et al.*, 2006; WASSERMANN *et al.*, 2010 ; MARTINELLI *et al.*, 2016), neste trabalho mostramos a habilidade de ativar agregação plaquetária da PMU (Figura 3A [Capítulo 1]) bem como a sua subunidade PmUre β , a qual é capaz de promover agregação plaquetária (Figura 3B e 3C [Capítulo 1]) interagindo com a membrana celular (Figura 3D [Capítulo 1]).

A agregação de plaquetas é uma resposta promovida pela exposição das mesmas a certos agonistas. Este evento se dá pelo reconhecimento do agonista por receptores de membrana contidos na superfície das plaquetas (CERLETTI *et al.*, 2012). Urease de *P. mirabilis* e as subunidades PmUre β e PmUre α agem como agonistas de receptores de plaquetas, a interação das proteínas com a membrana celular de plaquetas estimula a promoção do fenômeno de agregação plaquetária. Estudos de homologia entre as sequências de nucleotídeos sugerem que a ativação de plaquetas por parte das subunidades alfa e beta é devida a regiões de duplicação gênica entre a PmUre β e a PmUre α quando comparadas com as sequências nucleotídicas da PMU e JBU. Esta é uma região não detectada na sequência do Jbtx, o que reforça a hipótese de esta ser a região responsável

pela ativação de plaquetas visto que o polipeptídeo não age como agonista de plaquetas (dados não mostrados).

Jbtx é um polipeptídeo entomotóxico, com ação inseticida. Em 2009, nosso grupo verificou que este polipeptídeo era capaz de interagir com vesículas formadas por lipídios, perturbando sua estrutura e causando liberação do conteúdo interno de vesículas (BARROS *et al.*, 2009). Mais tarde, determinamos que a interação com lipídios seria devida à formação de poros na superfície destas membranas, poros gerados pelo polipeptídeo e também pela JBU (PIOVESAN *et al.*, 2014; MICHELETTO *et al.*, 2016;).

Atividade antifúngica de ureases foi pela primeira vez descrita em 2007, quando foram testadas JBU, SBU e HPU contra diversas linhagens de fungos filamentosos (BECKER-RITT *et al.*, 2007; BECKER-RITT & CARLINI, 2012). A JBU, SBU e Jbtx foram testadas e apresentaram capacidade de inibir a proliferação celular de leveduras de importância médica (POSTAL *et al.*, 2012; MARTINELLI *et al.*, 2016).

Neste trabalho mostramos que tanto a PMU quanto sua subunidade PmUre β apresentam atividade antifúngica, sendo a PMU capaz de causar alterações morfológicas em células de leveduras, concordando com os dados publicados em 2012 por Postal e colaboradores (POSTAL *et al.*, 2012) onde o polipeptídeo Jbtx e a JBU apresentaram atividade antifúngica e foram capazes de causar mudanças morfológicas nas células.

Acredita-se que as atividades entomotóxica e antifúngica do Jbtx sejam devidas à sua habilidade em causar distúrbio à estrutura lipídica presentes na membrana celular. Para verificar esta hipótese combinamos técnicas experimentais e estruturais a fim de avaliar este fenômeno.

Nas Figuras 1 e 2 [Capítulo 2] demonstramos a interação do Jbtx com a membrana celular de *S. cerevisiae* bem como com o cordão nervoso (CN) extraído do inseto *N. cinerea*. O Jbtx parece não ser internalizado pela levedura, visto que o fenômeno de interação é verificado seja a 4 ou a 28 °C (PAGANO *et al.*, 1974). A ausência de internalização do polipeptídeo é consistente com a permanência do mesmo junto com os *debris* celulares após a lise, mostrando que esta interação é persistente e ocorre com moléculas presentes na membrana celular dos organismos testados.

Assim como visto por Fruttero e colaboradores, Jbtx interage de forma bastante específica com o cordão nervoso de insetos (FRUTTERO *et al.*, 2017). Em Fruttero e

colaboradores, os autores utilizaram o sistema nervoso central de insetos *R. prolixus* e compararam com a interação detectada em glândulas salivares, verificando que a maior intensidade na interação com sistema nervoso central de insetos pode ser devido a sua composição lipídica, que é diferente daquela presente nas glândulas salivares de insetos, comprovando a preferência por fosfolipídios ácidos (BARROS *et al.*, 2009) e maior interação com membranas negativamente carregadas (PIOVESAN *et al.*, 2014).

Testes preliminares realizados com membrana celular de insetos e leveduras a fim de analisar interação do polipeptídeo com estruturas lipídicas, revelaram que o material biológico não poderia ser utilizado para experimentos de RMN nem mesmo para dicroísmo circular, portanto optamos por utilizar estruturas compostas de detergentes e/ou lipídios para mimetizar membranas celulares.

Três modelos de membranas miméticas foram utilizados. O primeiro destes são micelas compostas por SDS, utilizando concentrações abaixo e acima da concentração crítica para formação de micelas (CMC) (Figura 3A [Capítulo 2]) para experimentos de dicroísmo circular (Figura 3B [Capítulo 2]) e RMN (Figura 3C [Capítulo 2]). A utilização de concentrações de SDS abaixo da CMC não interfere na estrutura do polipeptídeo, enquanto que concentrações de SDS de 3, 10 e 15 mM, quantidades suficientes para formação de micelas, são capazes de alterar a estrutura do polipeptídeo.

Estes dados foram corroborados por experimentos de interação entre o polipeptídeo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), CN e as micelas, mostrando que em presença de micelas de SDS a interação do Jbtx com o CN é comprometida. A interação do polipeptídeo com as micelas pode ocorrer fortemente, de forma a competir com o CN, ou ainda devido a uma possível remoção dos lipídios presentes no CN pelo SDS, mas em ambos os casos a interação do Jbtx com lipídios é confirmada.

Espectros de RMN foram processados com a finalidade de assinalar os aminoácidos do Jbtx em presença de micelas de SDS (10 mM). Porém, poucos aminoácidos foram passíveis de identificação. Acreditamos que a detecção de poucos sinais seja devido à diminuição da mobilidade da proteína quando esta interage com as micelas, reforçando novamente a hipótese da interação entre lipídios e Jbtx.

Visando melhorar o nosso modelo de membrana, utilizamos vesículas compostas por lipídios (LUVs). Jbtx apresenta uma maior interação com lipídios carregados negativamente (Figura 5^a e 5B [Capítulo 2] e Figura 6 [Capítulo 2]) mesmo que não tenha sido possível detectar uma aquisição de estrutura por parte do polipeptídeo, podemos verificar uma redução na mobilidade do mesmo por uma redução no sinal de alguns aminoácidos, fato que pode ser visto no experimento de RMN mostrado na Figura 5C [Capítulo 2]. Esta mudança de intensidade do sinal detectado se concentra em regiões entre os aminoácidos 13-16 e 63-74, regiões muito próximas à porção N e C-terminal do polipeptídeo, respectivamente. Estas são as mesmas regiões determinadas por Lopes e colaboradores como as únicas porções com estrutura secundária definida, sendo a primeira relativa a uma α -hélice a segunda um *turn-like* (LOPES *et al.*, 2015).

Utilizando LUVs compostas por lipídios mimetizando membranas de insetos ou leveduras não foram identificadas aquisição de estrutura tridimensional por parte do peptídeo (Figura 6 [Capítulo 2]).

Conforme visto na Figura 4B [Capítulo 2], a interação do Jbtx com o CN é reduzida quando em presença de LUVs compostas por lipídios carregados negativamente, chegando a uma interação residual menor que 40 %.

O último modelo de membrana celular utilizado neste trabalho foram bicelas. Este modelo apresenta características fundamentais para a sua escolha. Devido à sua capacidade de orientar-se quando submetida a um campo magnético (SANDERS *et al.*, 1998) e também com relação a sua forma, de disco achatado, como resultado de uma mistura de detergentes e lipídios - majoritariamente usados dihexanoyl-phosphatidylcholine (DHPC) e dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC) (SANDERS *et al.*, 1998; LOUDET *et al.*, 2010) - o que facilita a sua interação com proteínas mostrando-se um modelo adequado para este estudo.

Resultados de dicroísmo circular foram muito similares àqueles obtidos com LUVs, sendo o Jbtx propenso a interagir com maior afinidade a lipídios negativamente carregados. Tanto por CD quanto RMN verificamos que ocorre interação entre Jbtx e as bicelas; porém, esta interação não é capaz de causar um ganho em estrutura por parte do polipeptídeo. Dando maior atenção às regiões do polipeptídeo que sofrem alterações, vemos que são concentradas nas porções N e C-terminal, conforme identificados no caso de

LUVs, sendo as mesmas porções identificadas por Lopes e colaboradores como as porções com tendência a estruturar-se (LOPES *et al.*, 2015). Martinelli e colaboradores haviam apontado estas regiões como as possíveis responsáveis pela interação com estruturas lipídicas (MARTINELLI *et al.*, 2014).

A interação do Jbtx com o CN é claramente perturbada pela presença de bicelas conforme pode ser verificado na figura 4C (Capítulo 2), onde vemos uma clara interação do polipeptídeo com as bicelas, interação que parece não ser perturbada mesmo após adição ao CN.

Com os dados estruturais mostrados para Jbtx, em presença de membranas miméticas, vimos que ocorre a interação do polipeptídeo com lipídios de membrana, porém esta interação não parece ser suficiente para que o mesmo adquira uma estrutura tridimensional. Acreditamos que o mecanismo de ação deste esteja ligado a sua interação com lipídios de membrana de modo a facilitar o reconhecimento de receptores alvo de membrana.

Em Galvani e colaboradores, foi identificada a presença da proteína de membrana UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP) em homogenato de sistema nervoso central dos insetos *T. infestans* após injeção do Jbtx. Em 2017, Fruttero e colaboradores detectaram que, *in vivo* e *in vitro*, após a injeção do Jbtx, a expressão da UAP é alterada não só no sistema nervoso central como também em glândulas salivares do inseto *R. prolixus* (FRUTTERO *et al.*, 2017). Estes dados fortalecem a hipótese da interação do polipeptídeo com lipídios de forma a facilitar ação específica do mesmo frente a receptores específicos presentes na membrana plasmática de insetos.

Esta atividade inseticida, bem como antifúngica é compartilhada entre o polipeptídeo e a JBU, a região do polipeptídeo presente na JBU pode ser a responsável pela interação da mesma com lipídios de membrana, de modo a facilitar a interação com receptores, ou proteínas-alvo presentes na membrana. Este mecanismo não poderia funcionar no caso de ureases de origem bacteriana, visto que a sequência do Jbtx não está completamente presente, como pode ser visualizado na Figura 6A (Capítulo 1). As evidências de duplicação gênica auxiliam a esclarecer quais porções seriam responsáveis pelas atividades identificadas, criando novas perspectivas para futura identificação e confirmação das mesmas. A partir de experimentos de dinâmica molecular vimos que a

PmUre β perde sua estrutura tridimensional quando em solução, o mesmo foi descrito anteriormente para o Jbtx, tanto em análises de dinâmica molecular (MARTINELLI *et al.*, 2014) quanto por experimentos de RMN (LOPES *et al.*, 2015). Seja pela presença de uma pequena porção de aminoácidos compartilhada entre o Jbtx e o C-terminal da PmUre β , que pela existência de duplicações gênicas entre estas duas proteínas e o fato de ambas se comportarem como IDPs, demonstramos, com este trabalho, que mais de uma região presente na urease é responsável por sua atividade biológica independente da atividade ureolítica (POSTAL *et al.*, 2012).

4 CONCLUSÕES GERAIS

Com este trabalho verificamos que o polipeptídeo Jbtx se mantém desordenado mesmo após interagir com estruturas mimetizando membranas celulares. Jbtx apresenta uma maior afinidade a estruturas lipídicas carregadas negativamente, causando pequenas alterações na sua estrutura secundária. Acreditamos que a interação Jbtx-lipídio serve como um facilitador para a interação do mesmo com proteínas ou receptores específicos presentes na membrana plasmática. Neste trabalho estudamos também as subunidades estruturais da urease de *P. mirabilis* a fim de determinar os fatores responsáveis pela ação *moonlighting* das ureases. A subunidade β da PMU mostrou ação antifúngica contra leveduras. A PmUre β foi capaz de agregar hemócitos provenientes de *R. prolixus* com ação dependente de cátions, e mostrou-se entomotóxica a insetos causando morte em *D. peruvianus* após injeção intraperitoneal, sendo ainda mais intensa a sua ação quando ingerida pelo inseto em questão. Estas características de toxicidade foram anteriormente descritas para o Jbtx fato que pode ser devido à duplicação gênica do Jbtx na sequência de nucleotídeos referente à subunidade β da PMU. Experimentos de dinâmica molecular evidenciaram que a PmUre β perde sua estrutura tridimensional quando em solução, o que pode contribuir fortemente para sua toxicidade. Foram também identificadas duplicações gênicas na PmUre β de porções equivalentes à subunidade α da PMU presentes na JBU, identificando esta como responsável pela ativação de agregação plaquetária promovida pela PmUre β .

5 REFERÊNCIAS

ARMBRUSTER, C. E., & MOBLEY, H. L. T. (2012). Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), 743–754.

BAHASHWAN, S. A., & SHAFEY, H. M. El. (2013). Antimicrobial resistance patterns of *Proteus* isolates from clinical specimens. *European Scientific Journal* (Vol. 9). European Scientific Institute.

BAIK, S.C., KANG, H.L., SEO, J.H., PARK, E.S., RHEE, K.H., & CHO, M.J. (2005). *Helicobacter pylori* urease induces mouse death. *Journal of Bacteriology and Virology*, 35(3).

BALASUBRAMANIAN, A., & PONNURAJ, K. (2010). Crystal structure of the first plant urease from jackbean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. *Journal of Molecular Biology*, 400, 274–283.

BARJA-FIDALGO, C., GUIMARAES, J. A., & CARLINI, C. R. (1991). Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon*, 29, 453–459.

BARROS, P. R., STASSEN, H., FREITAS, M. S., CARLINI, C. R., NASCIMENTO, M. A. C., & FOLLMER, C. (2009). Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: Implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases. *BBA - Proteins and Proteomics*, 1794, 1848–1854.

BECKER-RITT, A. B., & CARLINI, C. R. (2012). Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides. *Biopolymers*, 98, 367–384.

BECKER-RITT, A. B., MARTINELLI, A. H. S., MITIDIERI, S., Feder, V., WASSERMANN, G. E., Santi, L., CARLINI, C. R. (2007). Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon*, 50(7), 971–983.

BENINI, S., CIANCI, M., MAZZEI, L., & CIURLI, S. (2014). Fluoride inhibition of *Sporosarcina pasteurii* urease: structure and thermodynamics. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 19(8), 1243–1261.

BLAKELEY, R. L., HINDS, J. A., KUNZE, H. E., WEBB, E. C., & ZERNER, B. (1969). Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Demonstration of a carbamoyl-transfer reaction and inhibition by hydroxamic acids. *Biochemistry*, 8(5), 1991–2000.

CARLINI, C. R., BARCELLOS, G. B. S., BAETANEVES, A. D. V., & GUIMARAES, J. A. (1988). Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin-A among proteins of leguminous seeds. *Phytochemistry*, 27, 25–30.

CARLINI, C. R., & GUIMARÃES, J. A. (1981). Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon*, 19(5), 667–675.

CARLINI, C. R., & LIGABUE-BRAUN, R. (2016). Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. *Toxicon*, 110, 90–109.

CARLINI, C. R., OLIVEIRA, A. E. A., AZAMBUJA, P., XAVIER, J., WELLS, M. A., XAVIER-FILHO, J., & WELLS, M. A. (1997). Biological effects of canatoxin in different insect models: Evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *Journal of Economic Entomology*, 90(2), 340–348.

CARLINI, C. R. R., GUIMARAES, J. A. A., & RIBEIRO, J. M. C. M. C. (1985). Platelet-release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein - evidence for the involvement of the platelet lipooxygenase pathway. *British Journal of Pharmacology*, 84, 551–560.

CERLETTI, C., TAMBURRELLI, C., Izzi, B., GIANFAGNA, F., & de GAETANO, G. (2012). Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thrombosis Research*, 129, 263–266.

CHOUIKHA, I., & HINNEBUSCH, B. J. (2014). Silencing urease: A key evolutionary step that facilitated the adaptation of *Yersinia pestis* to the flea-borne transmission route. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(52), 18709–18714.

CHOW, A. W., TAYLOR, P. R., YOSHIKAWA, T. T., & GUZE, L. B. (1979). Nosocomial outbreak of infections due to multiply resistant *Proteus mirabilis* – Role of intestinal colonization as a major reservoir. *Journal of Infectious Diseases*, 139, 621–627.

COKER, C., POORE, C. A., LI, X., & MOBLEY, H. L. T. T. (2000). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes and Infection*, 2(12), 1497–1505.

COPLEY, S. D. (2003). Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7, 265–272.

COPLEY, S. D. (2012). Moonlighting is mainstream: Paradigm adjustment required. *BioEssays*, 34(7), 578–588.

DATTELBAUM, J. D., LOCKATELL, C. V., JOHNSON, D. E., & MOBLEY, H. L. T. (2003). UreR, the transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster, is required for urease activity and virulence in experimental urinary tract infections. *Infection and Immunity*, 71(2), 1026–1030.

DEFFERRARI, M. S., DA SILVA, R., Orchard, I., & CARLINI, C. R. (2014). Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease induces eicosanoid-modulated hemocyte aggregation in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Toxicon*, 82, 18–25.

DEFFERRARI, M. S., DEMARTINI, D. R., MARCELINO, T. B., PINTO, P. M., & CARLINI, C. R. (2011). Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* major urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 388–399.

DEFORTE, S., & UVERSKY, V. N. (2016). Order, disorder, and everything in between. *Molecules* (Basel, Switzerland), 21(8), 1090.

FERREIRA-DA-SILVA, C. T., GOMBAROVITS, M. E. C., MASUDA, H., OLIVEIRA, C. M., & CARLINI, C. R. (2000). Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect Cathepsin-like enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44, 162–171.

FOLLMER, C. (2008). Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*, 69(1), 18–28.

FOLLMER, C. (2010). Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. *J Clin Pathol*, 63(5), 424–430.

FOLLMER, C., BARCELLOS, G. B. S., ZINGALI, R. B., MACHADO, O. L. T., ALVES, E. W., BARJA-FIDALGO, C., CARLINI, C. R. (2001). Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochemical Journal*, 360, 217–224.

FOLLMER, C., & CARLINI, C. R. (2005). Effect of chemical modification of histidines on the copper-induced oligomerization of jack bean urease (EC 3.5.1.5). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 435, 15–20.

FOLLMER, C., REAL-GUERRA, R., WASSERMAN, G. E., OLIVERA-SEVERO, D., & CARLINI, C. R. (2004). Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases - Biological effects unrelated to ureolytic activity. *European Journal of Biochemistry*, 271, 1357–1363.

FOLLMER, C., WASSERMANN, G. E., & CARLINI, C. R. (2004). Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Science*, 167(2), 241–246.

FREEDMAN, R. (1978). Moonlighting molecules (pp. 560–562). *New Science*

FRUTTERO, L. L., MOYETTA, N. R., KRUG, M. S., BROLL, V., COSTE GRAHL, M. V., REAL-GUERRA, R., STANISÇUASKI, F., CARLINI, C. R. (2017). Jaburetox affects gene expression and enzyme activities in *Rhodnius prolixus*, a Chagas' disease vector. *Acta Tropica*, 168(168), 54–63.

FRUTTERO, L. L., MOYETTA, N. R., UBERTI, A. F., COSTE GRAHL, M. V., LOPES, F. C., BROLL, V., CARLINI, C. R. (2016). Humoral and cellular immune

responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*. *Parasites & Vectors*, 9, 1–14.

GALVANI, G. L., FRUTTERO, L. L., CORONEL, M. F., NOWICKI, S., DEMARTINI, D. R., DEFFERRARI, M. S., SETTEMBRINI, B. P. (2015). Effect of the urease-derived peptide Jaburetox on the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera). *BBA - General Subjects*, 1850, 255–262.

GHAZALEH, F. A., FRANCISCHETTI, I. M. B., GOMBAROVITS, M. E. C., & CARLINI, C. R. (1997). Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin: methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339(2), 362–367.

GIBBS, K. A., & GREENBERG, E. P. (2011). Territoriality in *Proteus*: Advertisement and Aggression. *Chemical Reviews*, 111, 188–194.

CARLINI, C. & GROSSI-DE-SÁ, M. F. (2002). Review plant toxic proteins with insecticidal properties . A review on their potential as bioinsecticides . *Toxin Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their*. *Toxicon*, 40, 1515–1539.

HA, N.-C. C., OH, S. T., SUNG, J. Y., CHA, K. A., LEE, M. H., & OH, B.-H. H. (2001). Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature Structural Biology*, 8(6), 505–509.

HAUSINGER, R. P. (1987). Nickel utilization by microorganisms. *Microbiological Reviews*, 51(1), 22–42.

HEIMER, S. R., & MOBLEY, H. L. T. (2001). Interaction of *Proteus mirabilis* urease apoenzyme and accessory proteins identified with yeast two-hybrid technology. *Journal of Bacteriology*, 183, 1423–1433.

HENDERSON, B., & MARTIN, A. (2011). Bacterial virulence in the moonlight: Multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infection and Immunity*, 79(9), 3476–3491.

HENDERSON, B., & MARTIN, A. (2013). Bacterial moonlighting proteins and bacterial virulence. *Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 358). Springer Berlin Heidelberg.

IRWIN, N. J., MCCOY, C. P., JONES, D. S., & GORMAN, S. P. (2013). Infection-responsive drug delivery from urinary biomaterials Controlled by a Novel kinetic and thermodynamic approach. *Pharmaceutical Research*, 30, 857–865.

JACOBSEN, S. M., STICKLER, D. J., MOBLEY, H. L. T., & SHIRTLIFF, M. E. (2008). Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(1), 26–59.

JAROCKI, V. M., TACCHI, J. L., & DJORDJEVIC, S. P. (2015). Non-proteolytic functions of microbial proteases increase pathological complexity. *Proteomics*, 15(5–6), 1075–1088.

JEFFERY, C. J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(1), 8–11.

JEFFERY, C. J. (2003). Moonlighting proteins: Old proteins learning new tricks. *Trends in Genetics*, 19(8), 415–417.

JEFFERY, C. J. (2015). Why study moonlighting proteins?, 6.

JIRGENSONS, B. (1966). Classification of proteins according to conformation. *Die Makromolekulare Chemie*, 91(1), 74–86.

JOHNSON, D. E., RUSSELL, R. G., LOCKATELL, C. V., ZULTY, J. C., WARREN, J. W., & MOBLEY, H. L. T. (1993). Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistence, urolithiasis, and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 61, 2748–2754.

JONES, B. D., & MOBLEY, H. L. T. (1987). Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 55(9), 2198–2203.

JONES, B. D., & MOBLEY, H. L. T. (1989). *Proteus mirabilis* urease: Nucleotide sequence determination and comparison with jack bean urease. *Journal of Bacteriology*, 171(12), 6414–6422.

KUNIN, C. M. (1997). Care of the urinary catheter. In *urinary tract infections: detection, prevention and management* (5th ed.). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

LIGABUE-BRAUN, R., & CARLINI, C. R. (2015). Moonlighting Toxins: Ureases and Beyond. *Plant Toxins* (pp. 1–21). Dordrecht: Springer Netherlands.

LOPES, F. C., DOBROVOLSKA, O., REAL-GUERRA, R., BROLL, V., ZAMBELLI, B., MUSIANI, F., CIURLI, S. (2015). Pliable natural biocide: Jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease. *FEBS Journal*, 282(6), 1043–1064.

LOUDET, C., DILLER, A., GRÉLARD, A., ODA, R., & DUFOURC, E. J. (2010). Biphenyl phosphatidylcholine: A promoter of liposome deformation and bicelle collective orientation by magnetic fields. *Progress in Lipid Research*, 49(3), 289–297.

MAGLIANO, E., GRAZIOLI, V., DEFLORIO, L., LEUCI, A. I., MATTINA, R., ROMANO, P., & COCUZZA, C. E. (2012). Gender and Age-Dependent Etiology of Community-Acquired Urinary Tract Infections. *Scientific World Journal*.

MANOS, J., & BELAS, R. (2006). The genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Prokaryotes*, 6, 245–269.

MARONEY, M. J., & CIURLI, S. (2014). Nonredox Nickel Enzymes. *Chemical Reviews*, 114(8), 4206–4228.

MARTINELLI, A. H. S., KAPPAUN, K., LIGABUE-BRAUN, R., DEFFERRARI, M. S., PIOVESAN, A. R., STANISÇUASKI, F., DEMARTINI, D. R., DAL BELO, C. A., ALMEIDA, C. G. M., FOLLMER, C., VERLI, H., CARLINI, C. R., PASQUALI, G. (2014). Structure–function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(3), 935–944.

MARTINELLI, A. H. S., LOPES, F. C., BROLL, V., DEFFERRARI, M. S., LIGABUE-BRAUN, R., KAPPAUN, K., TICHOTA, D. M., FRUTTERO, L. L., MOYETTA, N. R., DEMARTINI, D. R., POSTAL, M., MEDEIROS-SILVA, M., BECKER-RITT, A. B., PASQUALI, G., CARLINI, C. R. (2016). Soybean ubiquitous urease with purification facilitator: An addition to the moonlighting studies toolbox. *Process Biochemistry*, 53, 245–258.

MICHELETTO, Y. M. S., MORO, C. F., LOPES, F. C., LIGABUE-BRAUN, R., MARTINELLI, A. H. S., MARQUES, C. M., SCHRODER, A. P., CARLINI, C. R., da SILVEIRA, N. P. (2016). Interaction of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease and a derived peptide with lipid vesicles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 576–585.

MOBLEY, H. L., & HAUSINGER, R. P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews*, 53(1), 85–108.

MOBLEY, H. L. T., ISLAND, M. D., & HAUSINGER, R. P. (1995). Molecular Biology of Microbial Ureases. *Microbiological Reviews*, 59(3), 451–480.

MULINARI, F., STANISÇUASKI, F., BERTHOLDO-VARGAS, L. R., POSTAL, M., OLIVEIRA-NETO, O. B., Rigden, D. J., Carlini, C. R. (2007). Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides*, 28(10), 2042–2050.

OLIVERA-SEVERO, D., WASSERMANN, G. E., & CARLINI, C. R. (2006). *Bacillus pasteurii* urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 452(2), 149–155.

PAGANO, R. E., HUANG, L., & WEY, C. (1974). Interaction of phospholipid vesicles with cultured mammalian cells. *Nature*, 252(5479), 166–167.

PIATIGORSKY, J. (1998). Multifunctional lens crystallins and corneal enzymes. More than meets the eye. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 842, 7–15.

PIATIGORSKY, J. (2007). Book Review Gene Sharing and Evolution. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA;

PIOVESAN, A. R., MARTINELLI, A. H. S., LIGABUE-BRAUN, R., SCHWARTZ, J.-L., & CARLINI, C. R. (2014). *Canavalia ensiformis* urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 547, 6–17.

PIOVESAN, A. R., STANISÇUASKI, F., MARCO-SALVADORI, J., REAL-GUERRA, R., DEFFERRARI, M. S., & CARLINI, C. R. (2008). Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: Role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(11), 1023–1032.

POLACCO, J. C. & HAVIR, E. A. (1979). Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture. *J Biol Chem*, 254(5), 1707–1715.

POLACCO, J. C., & HOLLAND, M. A. (1993). Roles of urease in plant- S. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol 145, 145, 65–103.

POLACCO, J. C., MAZZAFERA, P., & TEZOTTO, T. (2013). Opinion - Nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps. *Plant Science*, 199–200, 79–90.

POLACCO, J. C., & WINKLER, R. G. (1984). Soybean Leaf Urease: A Seed Enzyme?'. *Plant Physiol*, 74, 800–803.

POORE, C. A., & MOBLEY, H. L. T. (2003). Differential regulation of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster by UreR and H-NS. *Microbiology-Sgm*, 149, 3383–3394.

POSTAL, M., MARTINELLI, A. H. S., BECKER-RITT, A. B., LIGABUE-BRAUN, R., DEMARTINI, D. R., RIBEIRO, S. F. F., CARLINI, C. R. (2012). Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. *Peptides*, 38(1), 22–32.

RÓZALSKI, A., SIDORCZYK, Z., KOTELKO, K., (1997). Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, 61(1), 65–89.

SALVADORI, J. D. M., DEFFERRARI, M. S., LIGABUE-BRAUN, R., YAMAZAKI Lau, E., SALVADORI, J. R., & CARLINI, C. R. (2012). Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect. *Biological Control*, 63(3), 253–263.

SANDERS, C. R., PROSSER, R. S. (1998). Bicelles: a model membrane system for all seasons? *Structure*, 6(10), 1227–1234.

SIRKO, A., & BRODZIK, R. (2000). Plant ureases: Roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica*, 47, 1189–1195.

SRIWANTHANA, B., ISLAND, M. D., & MOBLEY, H. L. T. (1993). Sequence of the *Proteus mirabilis* urease accessory gene ureG. *Gene*, 129, 103–106. Retrieved from

STANISÇUASKI, F., & CARLINI, C. R. (2012). Plant ureases and related peptides: Understanding their entomotoxic properties. *Toxins*, 4(2), 55–67.

STANISÇUASKI, F., FERREIRA-DA-SILVA, C. T., Mulinari, F., Pires-Alves, M., Carlini, C. R., Staniscuaski, F., ... Carlini, C. R. (2005). Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon*, 45(6), 753–760.

STANISÇUASKI, F., TE BRUGGE, V., CARLINI, C. R., & ORCHARD, I. (2009). In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. *Journal of Insect Physiology*, 55(3), 255–263.

STANISÇUASKI, F., TE BRUGGE, V., CARLINI, C. R., & ORCHARD, I. (2010). Jack bean urease alters serotonin-induced effects on *Rhodnius prolixus* anterior midgut. *Journal of Insect Physiology*, 56(9), 1078–1086.

STICKLER, D. J., & MORGAN, S. D. (2006). Modulation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilm development on urinary catheters. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 489–494.

SUMNER, J. B. (1926). The isolation and crystallization of the enzyme urease: preliminary paper. *J. Biol. Chem.*, 69, 435–441.

TOMAZETTO, G., MULINARI, F., STANISÇUASKI, F., SETTEMBRINI, B., CARLINI, C. R., AYUB, M. A. Z. (2007). Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 821–827.

TOMPA, P., SZÁSZ, C., & BUDAY, L. (2005). Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(9), 484–489.

TORISKY, R. S., GRIFFIN, J. D., YENOFKY, R. L., & POLACCO, J. C. (1994). A single gene (Eu4) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. *Mol Gen Genet*, 242, 404–414.

UBERTI, A. F., OLIVERA-SEVERO, D., WASSERMANN, G. E., SCOPEL-GUERRA, A., MORAES, J. A., BARCELLOS-DE-SOUZA, P., BARJA-FIDALGO, C., CARLINI, C. R. (2013). Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease. *Toxicon*, 69, 240–249.

UVERSKY, V. N. (2014). Introduction to intrinsically disordered proteins (IDPs). *Chemical Reviews*, 114(13), 6557–6560.

UVERSKY, V. N. (2016). Dancing protein clouds: The strange biology and chaotic physics of intrinsically disordered proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 291(13), 6681–6688.

WIEBKE-STROHM, B., LIGABUE-BRAUN, R., RECHENMACHER, C., De OLIVEIRA-BUSATTO, L.A., CARLINI, C.R., BODANESE-ZANETTINI, M.H. (2016) Structural and transcriptional characterization of a novel member of the soybean urease gene family, *Plant Physiol. Biochem.* 101, 96–104.

WASSERMANN, G. E., OLIVERA-SEVERO, D., UBERTI, A. F., & CARLINI, C. R. (2010). *Helicobacter pylori* urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14, 2025–2034.

ZAMBELLI, B., MUSIANI, F., BENINI, S., & CIURLI, S. (2011). Chemistry of Ni²⁺ in Urease: Sensing, Trafficking, and Catalysis. *Accounts of Chemical Research*, 44(7), 520–530.

Apêndice

Análise de proteínas/peptídeos intrinsecamente desordenados

A sequência de aminoácidos presente na cadeia polipeptídica de uma proteína é o elemento responsável pela rigidez da proteína à qual faz parte (ANFINSEN *et al.*, 1961; DUNKER *et al.*, 1998, 2001; UVERSKY *et al.*, 2000; UVERSKY, 2002). Proteínas intrinsecamente desordenadas não são capazes de obter uma estrutura tridimensional definida em condições fisiológicas devido a sua composição de aminoácidos. Os aminoácidos ácido glutâmico, lisina, arginina, glicina, glutamina, serina, prolina e alanina são denominados aminoácidos promotores de desordem devido a sua presença de forma acentuada em IDPs, este fenômeno é devido a sua característica hidrofóbica e concentração de grupos carregados gerando uma alta carga residual em pH neutro (UVERSKY, 2002).

A estrutura tridimensional de uma proteína globular é formada devido a interações não covalentes entre os aminoácidos presentes na sequência polipeptídica da mesma. A capacidade de estabelecer estas interações se reflete na criação de quatro subgrupos utilizados para descrever os diferentes estados termodinâmicos caracterizados para uma proteína globular:

- A) Nativa / Ordenada
- B) *Molten* globular
- C) Pré-*molten* globular
- D) Desordenada

A criação de um acurado banco de dados de proteínas intrinsecamente desordenadas (DisProt) foi crucial para o desenvolvimento de diversos *softwares* e algoritmos para identificação e caracterização de IDPs. Atualmente o DisProt (<http://www.disprot.org/>) conta com uma coleção de mais de 800 proteínas em seu banco de dados.

Um importante algoritmo criado para predição do nível de ordem/desordem de uma proteína foi o Preditor de Regiões Naturalmente Desordenadas - PONDR (<http://www.pondr.com/>). PONDR é composto por muitos algoritmos diferentes em constante modificação e atualização, onde todos fazem uso do banco de dados de IDPs disponível no DisProt para identificar a tendência de cada um dos resíduos contidos na sequência de uma proteína quanto à ordem/desordem (HE *et al.*, 2009; UVERSKY, 2002).

Quatro dos preditores mais utilizados são (Figura 1A):

- PONDR VL-XT é utilizado com o intuito de identificar possíveis motivos de interação molecular
- PONDR VSL2B avalia de forma precisa pequenas e grandes regiões de desordem contidas na sequência protéica em estudo
- PONDR VL3 utilizada apenas para predição de longas porções de desordem
- PONDR-FIT é o mais completo dos preditores, é uma combinação de seis diferentes PONDR preditores

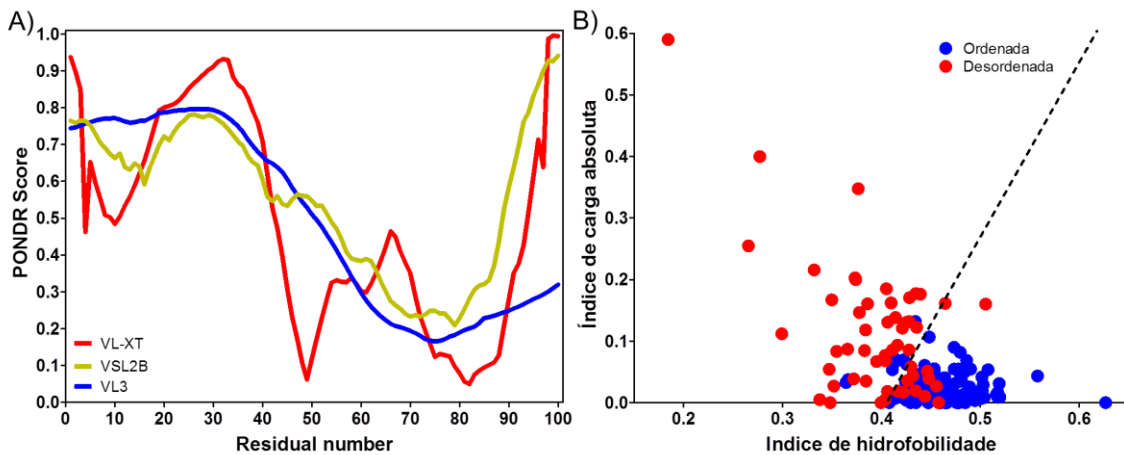


Figura 1: Típico resultado proveniente da análise de IDPs utilizando o algoritmo PONDR (<http://www.pondr.com/>). **A)** Análise de um aminoácido quanto à sua tendência ordem/desordem. Os algoritmos utilizados foram VL-ST, tracejado em vermelho, VSL2B em verde e em azul mostramos a análise utilizando VL3. **B)** Relação entre carga absoluta e hidrofobicidade de proteínas ordenadas (em azul) e desordenadas (em vermelho) utilizada para comparação com proteínas a serem analisadas utilizando PONDR.

Fazendo uso da sequência de aminoácidos pode-se calcular o grau de hidrofobicidade de uma proteína através do software PONDR, localizando-a em um gráfico de carga-hidrofobicidade com relação a proteínas previamente descritas como desordenadas e ordenadas (Figura 1B).

Outros tantos preditores foram e estão sendo criados. GlobPlot, criado em 2003 por Linding e colaboradores, faz uso de uma escala que leva em consideração a probabilidade de um aminoácido fazer parte de uma estrutura secundária ou apresentar-se na forma desordenada em uma proteína (LINDING *et al.*, 2003).

Além dos algoritmos mencionados acima, ferramentas computacionais que levam em consideração o fato de que IDPs tendem a estruturar-se quando em contato com seu

analisado através de uma combinação de experimentos complementares. A predição de regiões ou estruturas desordenadas pode ser determinada e validada através do uso de diversos métodos biofísicos de análise. Abaixo listamos uma série de técnicas utilizadas para análise de IDPs.

- RMN
- Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)
- Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)
- Espectroscopia por Raman
- Dicroísmo Circular
- Infra-vermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)
- Espectroscopia de Fluorescência, *Single-Molecule-FRET*, *Single-Molecule Force Spectroscopy*
- Espalhamento de luz dinâmico e estático (SLS e DLS)
- Cromatografia de exclusão molecular
- Espectrometria de massas

Para análise de estrutura secundária e terciária de proteínas, em presença ou ausência de seus ligantes, são majoritariamente utilizadas dicroísmo circular ou FT-IR combinadas com RMN (WRIGHT & DYSON, 2009). De forma mais aprofundada serão tratadas as técnicas de dicroísmo circular e RMN, por serem as mais utilizadas na busca de informações a respeito de IDPs, devido a sua grande contribuição na construção do DisProt e pelo fato da técnica de RMN ser tida como a mais apropriada técnica para análise de estrutura secundária e terciária de proteínas (UVERSKY & LONGHI, 2010; TOMPA, 2012).

1 DICROÍSMO CIRCULAR

O dicróismo celular (CD) é uma técnica bastante utilizada para obtenção de informações quanto à estrutura secundária de proteínas, geralmente utilizada em combinação com outras técnicas como a cristalografia de raio-X, infravermelho ou RMN. Dicróismo circular quando executado em condições fisiológicas é tido como uma ferramenta ideal para investigar interação entre moléculas, inserção de moléculas em bicamadas lipídicas ou até mesmo para monitorar a integridade do material em estudo (LIMA *et al.*, 2014).

Para análise de CD é utilizada luz circularmente polarizada, sendo esta composta por uma onda vertical e outra horizontalmente polarizadas, ambas de mesma amplitude. Ao incidir um raio de luz circularmente polarizado sobre uma solução, as moléculas presentes absorvem energia, e a diferença entre a luz remanescente da onda proveniente da componente à direita e da esquerda dá origem ao espectro de CD, conforme a equação abaixo, onde CD representa os dados usados para criação do espectro adquirido em uma variação de 180 a 260 nm, as variáveis AD e AE dizem respeito à absorção ocorrida nas componentes à direita e esquerda, respectivamente (WOODY, 2010; LIMA *et al.*, 2014).

$$CD = AD - AE$$

Aplicada à análise de proteínas, em um espectro de CD podem ser vistas as transições eletrônicas provenientes das ligações peptídicas de uma proteína. Em 220 nm encontram-se os sinais respectivos às transições $n \rightarrow \pi^*$ enquanto que em 190 nm vemos as transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ que no caso do aminoácido prolina se verifica a 200 nm.

Com o uso de polipeptídeos modelo, apresentando estrutura secundária conhecida foi possível criar espectros padrão para cada uma das três estruturas secundária conhecidas. Na Figura 4 vemos os espectros obtidos para o polipeptídeo quando estruturado como uma α -hélice, β -folhas e na forma desordenada, como *random coil*.

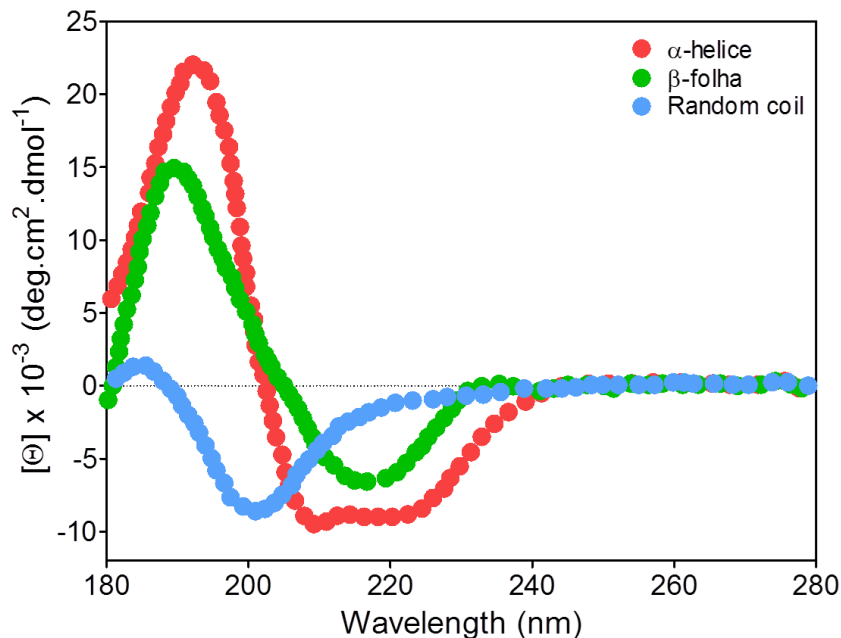


Figura 4: Espectros padrão para estruturas ordenadas na forma de α -hélice (traçado vermelho), β -folhas (traçado verde) e *random coil* (traçado azul). Figura adaptada a partir do livro de Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular (LIMA *et al.*, 2014).

A presença de α -hélices se verifica pela presença de três bandas bastante fortes dos grupos amida presentes, das quais, duas negativas situadas em 208 e 222 nm e a uma banda positiva em 190 nm. O sinal verificado a 222 nm é resultado da transição $n \rightarrow \pi^*$ enquanto que os sinais a 190 e 208 nm dizem respeito às transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Além dos sinais provenientes dos grupos amida, a estrutura helicoidal gera através de sua interação entre os momentos dipolares outras três bandas de absorbância, sendo uma a 280 nm polarizada paralelamente ao eixo da hélice e negativa, e duas outras bandas a 190 nm, neste caso, ambas polarizadas de modo perpendicular ao eixo da hélice e positivas.

O espectro para estruturas β -folha apresenta uma banda negativa de máxima absorção a 217 nm e outra positiva na região entre 195 e 200 nm, e a razão entre estes picos cresce à medida que o grau de torção da folha aumenta, sendo maior para folhas paralelas. Estruturas desordenadas (*random coil*) possuem uma forte banda negativa à 200 nm.

1.1 ANÁLISE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE IDPS

Proteínas desordenadas são facilmente reconhecidas por CD e qualquer pequena alteração neste espectro é passível de identificação devido à presença de uma banda característica em 200 nm.

Conforme mostrado na Figura 5A, o espectro de CD para uma proteína desordenada é muito similar ao espectro modelo para polipeptídeos desordenados (Figura 4), enquanto que o espectro de uma proteína globular, com uma estrutura secundária definida, apresenta um espectro como a soma das estruturas presentes na mesma (Figura 5B).

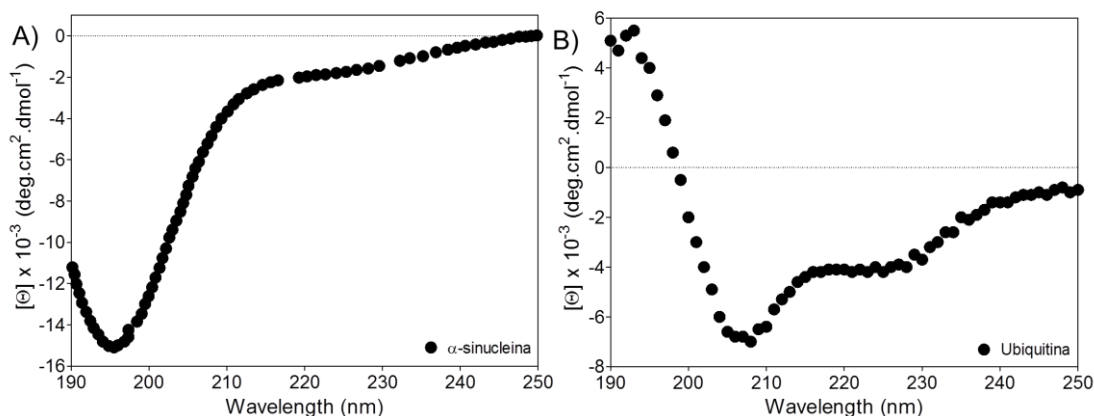


Figura 5: **A)** Espectro de dicroísmo circular da proteína intrinsecamente desordenada α -sinucleína adaptado de (WOODY, 2010). **B)** Espectro de dicroísmo circular da proteína ubiquitina construído a partir dos dados contidos no *Protein Circular Dichroism Data Bank* (<http://pcddb.cryst.bbk.ac.uk/home.php>).

Aquisição de estrutura secundária por parte de IDPs quando complexadas com seu ligante em condições fisiológicas leva a mudanças conformacionais detectáveis por CD devido à alteração no perfil do espectro da proteína (WRIGHT & DYSON, 1999, 2009). A aquisição de estrutura secundária a partir da interação proteína-ligante, em geral, ocorre devido às regiões anfífilicas internas à proteína. Proteínas não completamente desordenada, mas com algumas regiões desordenadas são mais difíceis de acompanhar mudanças estruturais (LIMA *et al.*, 2014).

Conforme o exemplo mostrado na Figura 6, para determinar alterações de estrutura secundária de uma proteína é necessário adquirir o espectro de CD para cada um dos componentes testados. O espectro final deve ser composto pela subtração do espectro

do ligante ao espectro composto pelo complexo, conforme exemplificado na equação abaixo.

$$CD = CD_{proteína-ligante} - CD_{ligante}$$

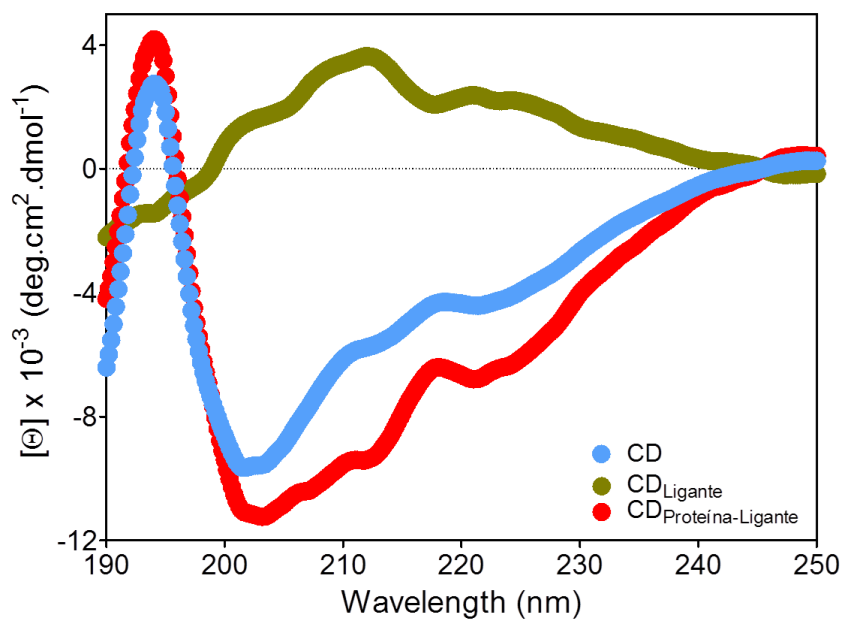


Figura 6: Representação geral da análise de CD de uma interação proteína-ligante. Em verde é representado o CD do ligante mantido em solução idêntica à solução que contém o complexo proteína-ligante (representado em vermelho). O espectro de dicroísmo circular resultante da subtração entre os espectros do ligante ao espectro do complexo é representado em azul.

2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) APLICADA A IDPs

Aminoácidos interagem através de ligações peptídicas a fim de formar estruturas estáveis em condições fisiológicas. Estas macromoléculas são estruturas altamente flexíveis, e esta flexibilidade possibilita que a proteína adquira diversas conformações muitas vezes correlacionadas às tantas funções exercidas pela mesma, como pode ser visto na Figura 7, ao analisar a superfície do potencial energético de uma proteína globular e compará-la com o potencial energético para uma proteína intrinsecamente desordenada vemos que proteínas globulares apresentam um mínimo muito bem definido enquanto que IDPs apresentam diversas posições de mínimo energético (BURGER *et al.*, 2014; ALMEIDA, 2014).

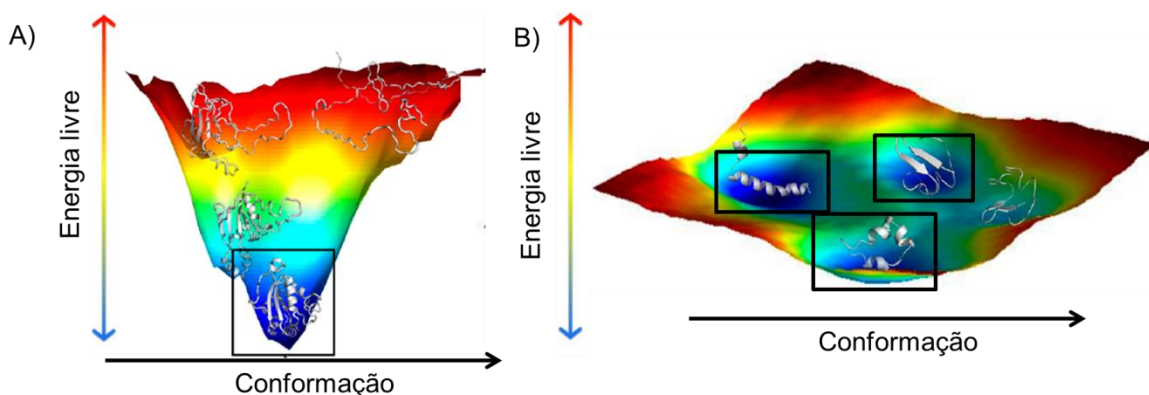


Figura 7: A) Esquema do potencial energético de uma proteína globular, ordenada. B) e de uma proteína intrinsecamente desordenada. Figura adaptada de (BURGER; GURRY; STULTZ, 2014).

Proteínas globulares apresentam um mínimo energético, e este mínimo corresponde a sua forma mais estável, a sua forma nativa quando em solução fisiológica (Figura 7A). Em contrapartida, IDPs apresentam múltiplos mínimos energéticos (Figura 7B) e a barreira energética entre estes mínimos tende a ser muito baixa possibilitando uma transição rápida e frequente entre os mínimos energéticos (BURGER *et al.*, 2014).

Para determinação da estrutura de uma macromolécula é fundamental a utilização de uma técnica que possibilite captar os diferentes comportamentos de uma proteína de modo dinâmico, e neste caso RMN se aplica perfeitamente por ser uma técnica que revela informações dinâmicas dos diferentes estados conformacionais de uma proteína bem como interações desta com outras moléculas.

O passo inicial para analisar uma proteína por RNM é o assinalamento dos picos de ressonância a cada um dos aminoácidos presentes na sequência da proteína. Através de uma série de combinações de espectros bi e tridimensionais selecionados, sendo cada experimento capaz de dar informações específicas e diversas. Dentre os espectros executados temos: NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) e TOCSY (*Total Correlated Spectroscopy*) que são essenciais e geralmente combinados com os espectros de correlação heteronucleares como HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) ou HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*).

Para assinalamento de cada um dos aminoácidos presentes em uma proteína usamos uma combinação de espectros (conforme listado abaixo), dos quais devem ser todos processados usando *softwares* específicos. Um dos *softwares* utilizados para tratamento de dados é o *NMRPipe* (<https://spin.niddk.nih.gov/bax/NMRPipe/>), que pode ser utilizado gratuitamente pela comunidade científica e está em constante aprimoramento.

- Para assinalamento da cadeia principal (*Backbone*):

HNCA e HN(CO)CA

HNCACB e HN(CO)CACB

HNCO e HN(CA)CO

- Para assinalamento da cadeia lateral:

HC(CO)NH-TOCSY

HBHA(CO)NH

hCCH-TOCSY

2.1 *TOCSY*

A transferência de magnetização ocorre entre prótons e carbonos via acoplamento escalar detectada em até quatro ligações, por esse motivo, as interações detectadas por TOCSY são aquelas pertinentes ao aminoácido analisado – *i* – (Figura 8A), sem levar em consideração seus vizinhos. Cada pico de correlação indica a interação entre dois prótons via acoplamento escalar (Figura 8B).

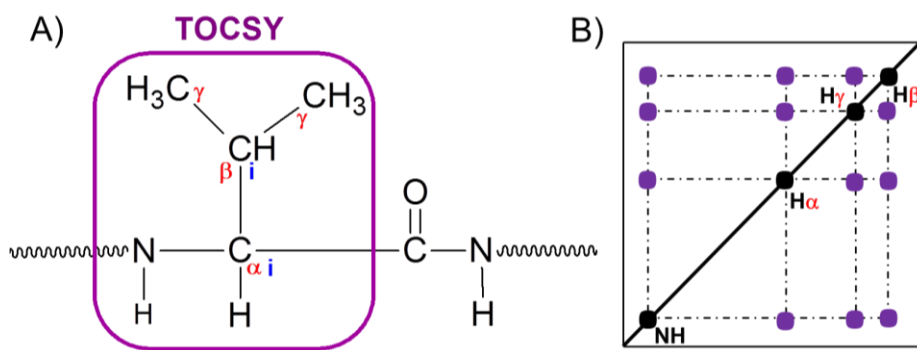


Figura 8: A) Ilustração dos prótons envolvidos em uma análise ^1H -TOCSY. B) Desenho esquemático das interações identificadas em um espectro bidimensional ^1H -TOCSY. Os círculos em roxo mostram as interações entre os pares de prótons correspondentes. Os círculos identificados em preto correspondem ao sinal de ressonância de cada próton presente no aminoácido analisado.

2.2 NOESY

NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) mostram a interação entre átomos vizinhos, não necessariamente ligados de forma covalente, mas com uma distância máxima de 5 Å (Figura 9A). Este espectro depende da transferência de magnetização entre os átomos via acoplamento dipolar, ou seja, quanto menor a distância entre os átomos maior a intensidade dos picos no espectro e este dado é crucial para construção do modelo tridimensional de uma proteína. Na Figura 9B vemos esquematicamente a disposição dos picos nas regiões típicas em que são detectados.

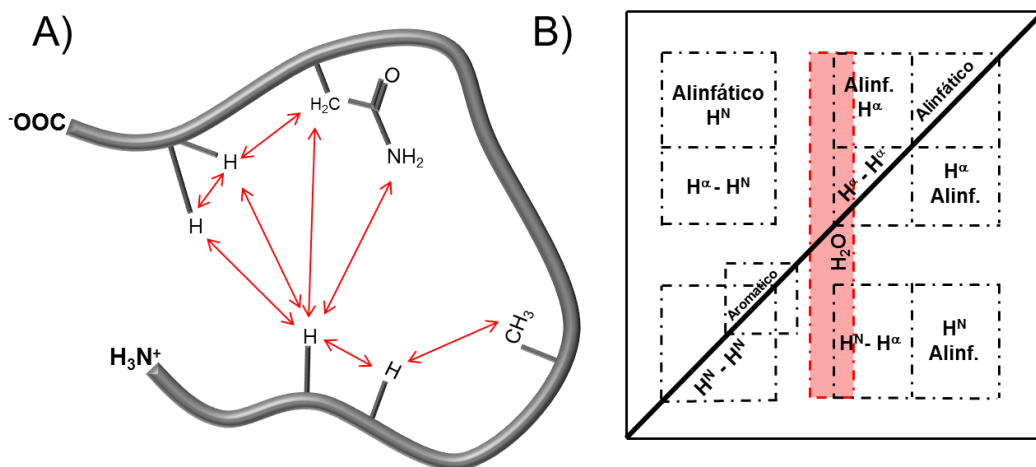


Figura 9: A) Representação esquemática dos átomos envolvidos em uma análise de espectros bidimensionais NOESY. B) Esquema mostrando as diversas regiões de interação identificadas em um espectro NOESY.

2.3 HSQC

HSQC são espectros heteronucleares bidimensionais onde a transferência de magnetização ocorre entre um próton e outro núcleo atômico através de apenas uma ligação química. Os átomos utilizados são geralmente ^{13}C e ^{15}N , porém muitos outros podem ser utilizados, conforme vistos na Tabela 1.

Tabela 1: Átomos observáveis por RMN, com momento magnético nuclear de *spin*.

Átomo	Prótons	Nêutrons	<i>Spin total</i> (Prótons)	<i>Spin total</i> (Neutron)	<i>Spin total</i> (I)
^1H	1	0	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$
^{13}C	6	7	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
^{15}N	7	8	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$
^{19}F	9	10	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$
^{31}P	15	16	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$

Os sinais obtidos são respectivos à interação entre os prótons e outro núcleo atômico presentes na proteína a ser estudada. Na Figura 10 podemos ver dois exemplos de $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC, os sinais obtidos correspondem ao próton amídico ($^1\text{H}^{\text{N}}$) ligado covalentemente a um átomo de nitrogênio (^{15}N) envolvido em uma ligação peptídica, parte da cadeia principal do peptídeo (*backbone* da proteína). HSQC é o primeiro espectro a ser executado quando se tem como objetivo determinar a estrutura de uma proteína, estes espectros são importantes para caracterização da conformação geral da proteína, bem como para acompanhar mudanças conformacionais e estabilidade da amostra.

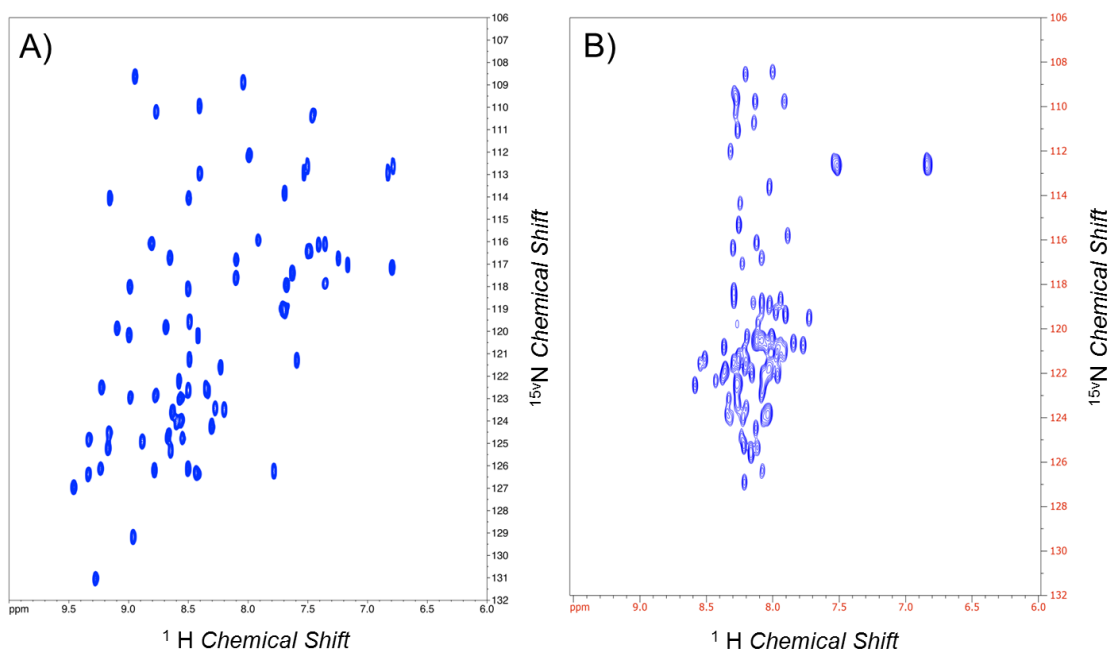


Figura 10: A) Espectro $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC de uma proteína que apresenta estrutura tridimensional definida B) Espectro $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC de uma proteína intrinsecamente desordenada.

Conforme visto na Figura 10A, o espectro de uma proteína globular apresenta-se em uma ampla faixa de deslocamento químico com sinais definidos e bastante intensos. Espectros de proteínas desordenadas apresentam picos de intensidade reduzida, com dispersão reduzida dos picos quanto ao deslocamento químico correspondente ao ^1H . Na Figura 10B apresentamos um espectro $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC de uma IDP onde podemos verificar a presença de picos colapsados na dimensão da componente ^1H e a concentração dos picos em uma região reduzida quando comparada a espectros de proteínas globulares.

A combinação de espectros heteronucleares HSQC com TOCSY ou NOESY são fundamentais para identificação da cadeia lateral dos aminoácidos em questão e determinação dos ângulos diedros da cadeia principal, respectivamente. Em ambos casos é fundamental o conhecimento da sequência de aminoácidos presente na proteína em estudo. Na Figura 11 estão representados esquematicamente os espectros hCCH-TOCSY e um exemplo prático do mesmo, bem como o espectro tridimensional, e interação entre $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-NOESY.

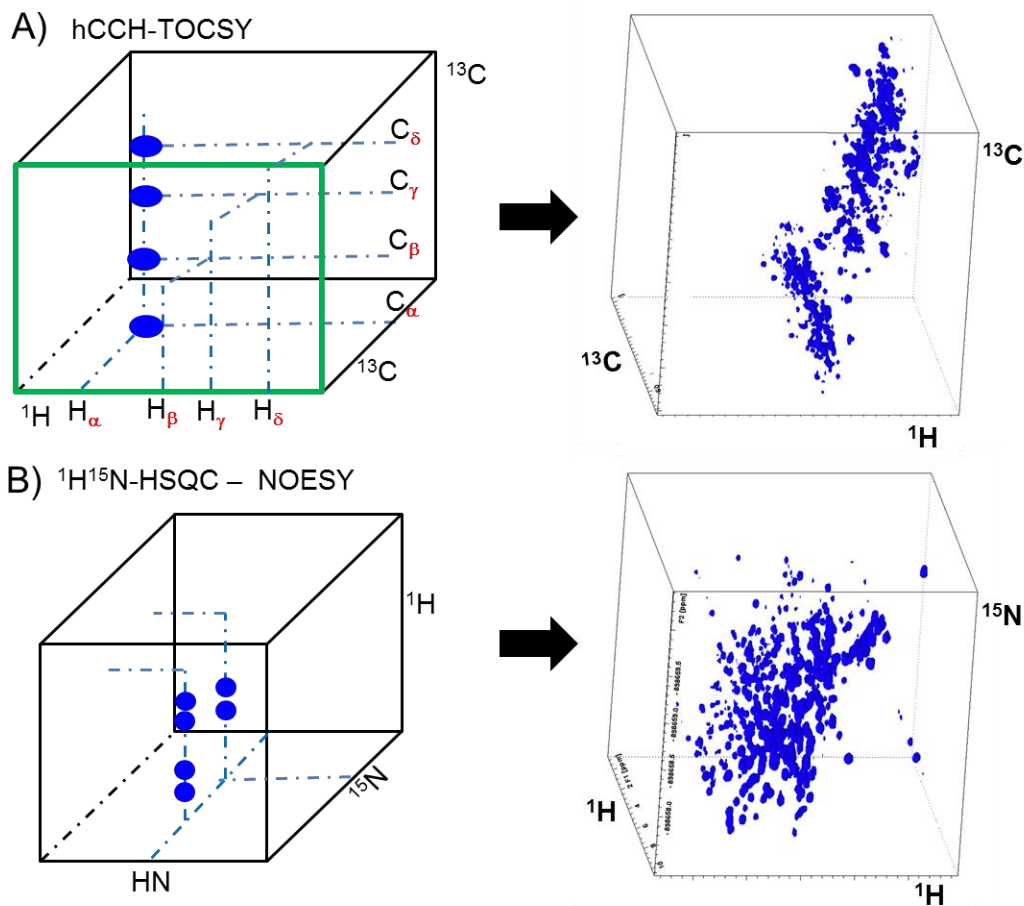


Figura 11: Exemplificação dos espectros tridimensionais heteronucleares hCCH-TOCSY (A) e $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC – NOESY (B). À esquerda temos uma representação esquemática para cada um dos espectros enquanto que à direita mostramos um espectro modelo.

2.4 *Espectros de tripla ressonância*

Para assinalamento de uma proteína é necessário executar um longo *set* de experimentos de tripla ressonância, conforme listado abaixo:

- HNCA e HN(CO)CA, HNCACB e HN(CO)CACB, HNCO e HN(CA)CO, HBHA(CO)NH e HBHA(CBCA)NH

Espectros tridimensionais heteronucleares são baseados em experimentos eletr nucleares bidimensionais, como HSQC expandido na terceira dimensão, conforme ilustrado na Figura 12. O assinalamento dos aminoácidos de uma proteína é geralmente feito considerando o plano bidimensional obtido em um $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC onde é sobreposto

um espectro tridimensional de modo a possibilitar a associação de cada um dos picos presentes no plano $^1\text{H}^{15}\text{N}$ com aqueles identificados na dimensão do ^{13}C .

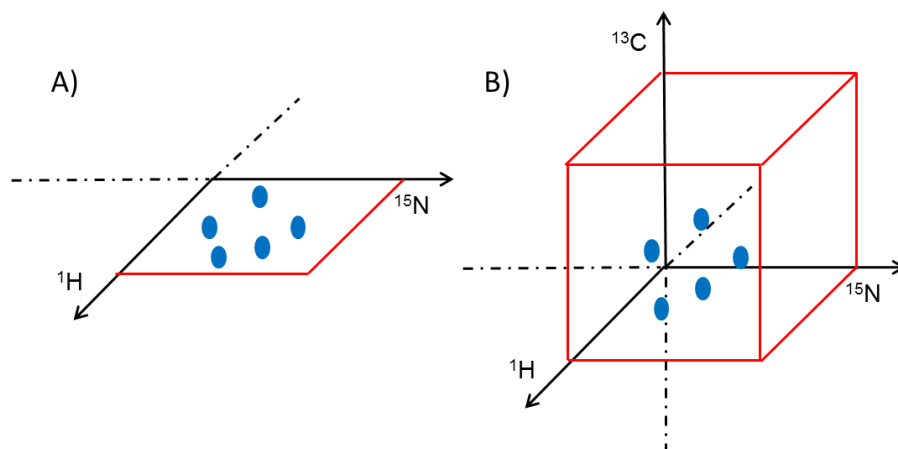


Figura 12: Representação esquemática de espectros bi e tridimensionais. **A)** Espectro bidimensional heteronuclear, onde em uma dimensão temos a componente ^1H e na segunda dimensão a componente ^{15}N . Neste caso, o grupo NH identificado corresponde ao aminoácido analisado e não seu vizinho. **B)** Representação esquemática de um espectro tridimensional heteronuclear, sendo os eixos ^1H e ^{15}N os mesmos apresentados em A correlacionados ao plano dos átomos de carbono (^{13}C).

HNCACB e HN(CO)CACB

Em um experimento HNCACB o grupo NH do aminoácido selecionado (i) é correlacionado ao carbono alfa do mesmo aminoácido bem como com seu aminoácido precedente (C_α e $\text{C}_{\alpha-1}$) e do mesmo modo o carbono beta (C_β e $\text{C}_{\beta-1}$). Ou seja, para cada sinal presente no plano $^1\text{H}^{15}\text{N}$ encontramos quatro sinais na dimensão do ^{13}C com diferentes intensidades, os sinais correspondentes ao aminoácido i são de maior intensidade que aqueles correspondentes ao carbono i-1.

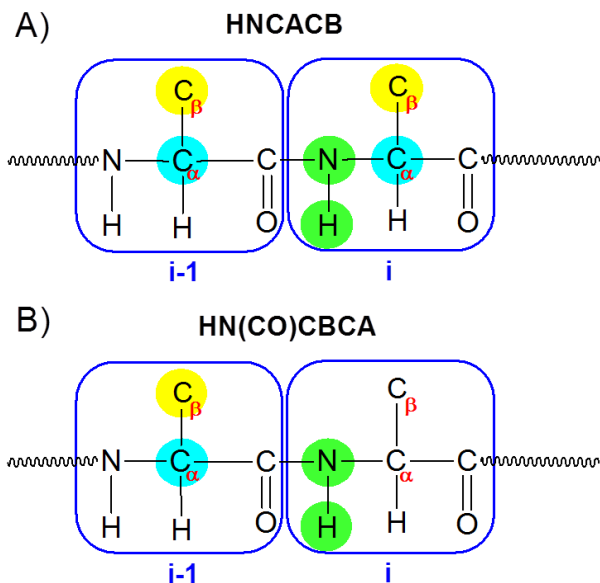


Figura 13: Sequência de impulsos para aquisição dos espectros HNCACB (A) e HNcoCBCA (B). Os resíduos i e $i-1$ de uma cadeia polipeptídica são mostrados esquematicamente. Os átomos evidenciados dizem respeito àqueles excitados, sendo os átomos de carbono alfa e carbono beta mostrados em azul e amarelo, respectivamente. Os átomos N e H do aminoácido i são mostrados em verde.

Na Figura 13 vemos a correlação entre o experimento descrito acima, HNCACB e o HN(CO)CACB. Estes experimentos são feitos em conjunto, sendo que o primeiro nos dá informação dos dois pares de carbonos (C_α e $C_{\alpha-1}$, C_β e $C_{\beta-1}$) enquanto que o segundo nos informa apenas o par $C_{\alpha-1}$ e $C_{\beta-1}$. Estes são experimentos bastante semelhantes, e utilizando a informação de ambos é possível correlacionar o grupo NH com seu respectivo vizinho a partir dos dados obtidos na dimensão do carbono.

Os valores do *chemical shift* de um C_α ou C_β depende do tipo de aminoácido ao qual pertence. Conforme pode ser verificado na Figura 14, alguns aminoácidos apresentam um *chemical shift* característico, o que facilita a sua identificação. Como no caso da glicina, com um *chemical shift* para o C_α mais baixo que a média e ausência de C_β .

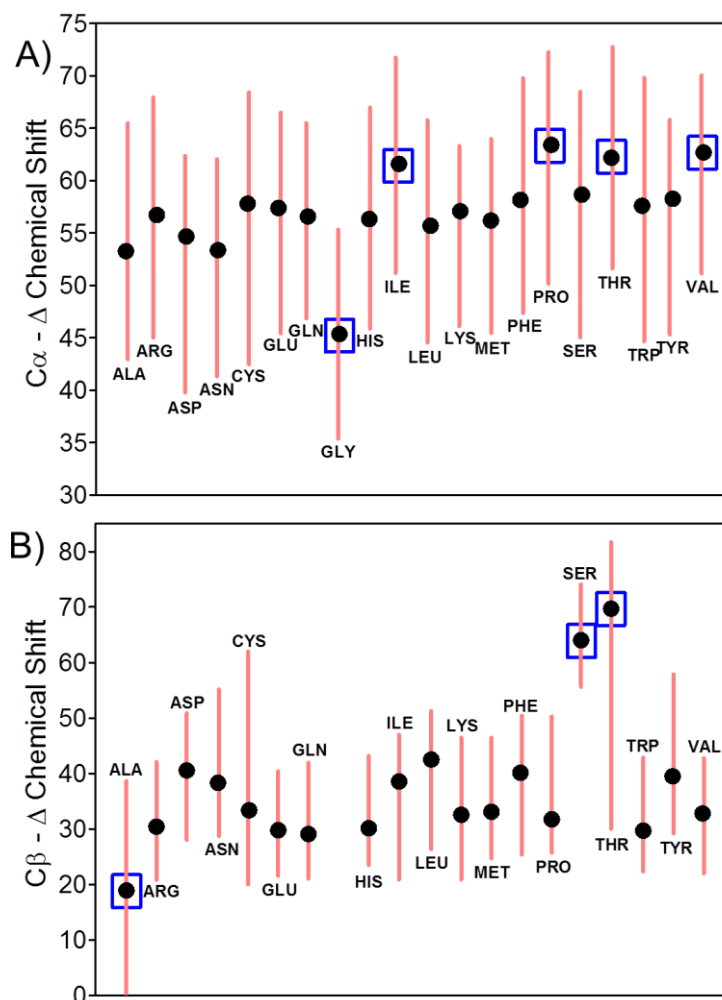


Figura 14: *Chemical shift* relativos aos carbonos alfa e beta (C_{α} e C_{β}) dos aminoácidos contidos na sequência de uma proteína.

Os aminoácidos valina, prolina, isoleucina e treonina apresentam valores mais altos de C_{α} que a média. Alanina é um aminoácido de fácil reconhecimento por apresentar um *chemical shift* do C_{β} mais baixo que esperado para a maioria dos aminoácidos enquanto que serinas e treoninas apresentam um *chemical shift* do C_{β} mais alto que a média.

HNCA e HN(CO)CA

Espectros do tipo HNCA identificam a interação entre os átomos H e N presentes na ligação peptídica com os carbonos alfa do aminoácido em questão (i) bem como o carbono alfa do aminoácido vizinho (i-1), no caso, C_{α} e $C_{\alpha-1}$, sendo possível verificar apenas dois sinais na dimensão do carbono, um sinal mais fraco relativo ao carbono

proveniente do aminoácido $i-1$ e um mais intenso referente ao C_α do aminoácido i , conforme ilustrado na Figura 15.

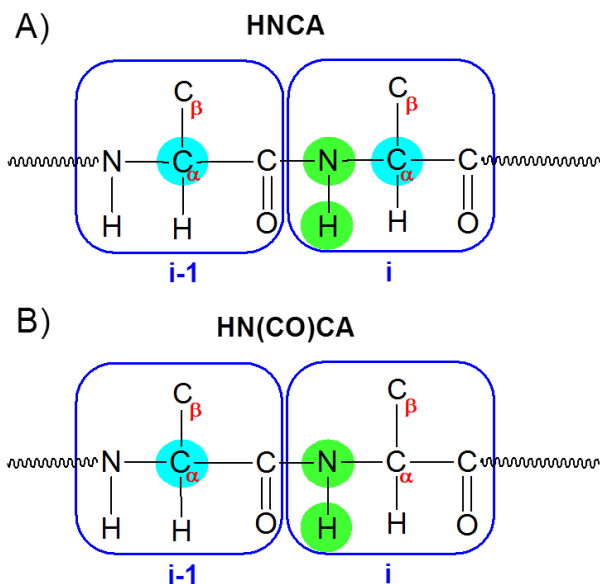


Figura 15: Sequência de impulsos para aquisição dos espectros HNCA (A) e HNcoCA (B). Os resíduos i e $i-1$ de uma cadeia polipeptídica são mostrados esquematicamente. Os átomos evidenciados dizem respeito àqueles excitados, sendo os átomos de carbono alfa mostrados em azul. Os átomos N e H do aminoácido i são mostrados em verde.

O espectro HN(CO)CA é complementar ao HNCA, identificando apenas o C_α do resíduo $i-1$. Em contrapartida ao par de espectros citados anteriormente, esta combinação de espectros apresenta uma relação entre sinal e ruído muito menor, sendo muito útil para complementar as informações que podem ser perdidas nos espectros HNCACB e HN(CO)CACB.

HNCO e HN(CA)CO

Outro importante par de espectros é o HNCO e H(CA)CO o qual correlaciona os átomos de H e N com o carbono carbonílico, todos envolvidos em ligações peptídicas (Figura 16). Espectros HN(CA)CO detectam interações entre o grupo NH do resíduo aminoácido i com o carbono carbonílico do mesmo grupo (C_i) e de seu antecessor (C_{i-1}). Este espectro é sempre acompanhado de seu par, HNCO, no qual verifica-se apenas interação entre o grupo NH com o carbono de seu aminoácido precedente (C_{i-1}). HNCO é

um experimento muito sensível, dando informações muito úteis quanto à estrutura de uma proteína.

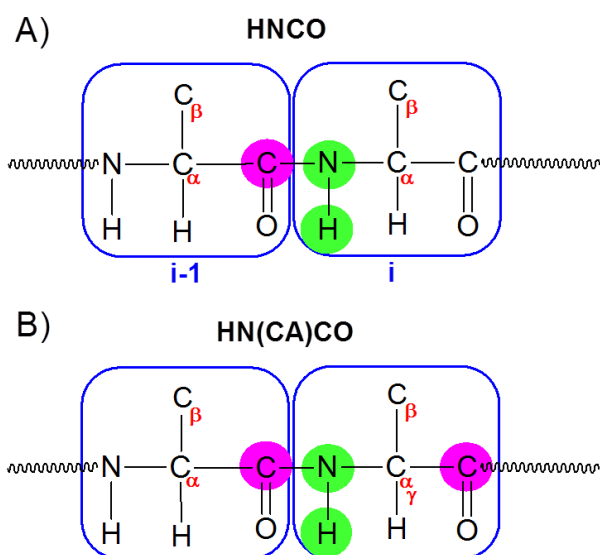


Figura 16: Sequência de impulsos para aquisição dos espectros HNCO (A) e HNcaCO (B). Os resíduos i e i-1 de uma cadeia polipeptídica são mostrados esquematicamente. Os átomos evidenciados dizem respeito àqueles excitados. Os átomos de carbono carbonílico são mostrados em rosa, enquanto que os átomos N e H do aminoácido i são mostrados em verde.

HBHANH e HBHA(CO)NH

HBHANH e HBHA(CO)NH são experimentos de ressonância nos quais é possível efetuar o assinalamento dos átomos de hidrogênio das cadeias laterais. HBHANH (Figura 17A) são experimentos tridimensionais que correlacionam H e N da ligação peptídica com os hidrogênios alfa e beta presentes na cadeia lateral do aminoácido analisado (H_α e H_β) bem como seu precedente (H_{α-1} e H_{β-1}), enquanto que HBHA(CO)NH nos informa as correlações envolvendo apenas o aminoácido precedente (H_{α-1} e H_{β-1}) àquele ao qual pertence o grupo NH (Figura 17B).

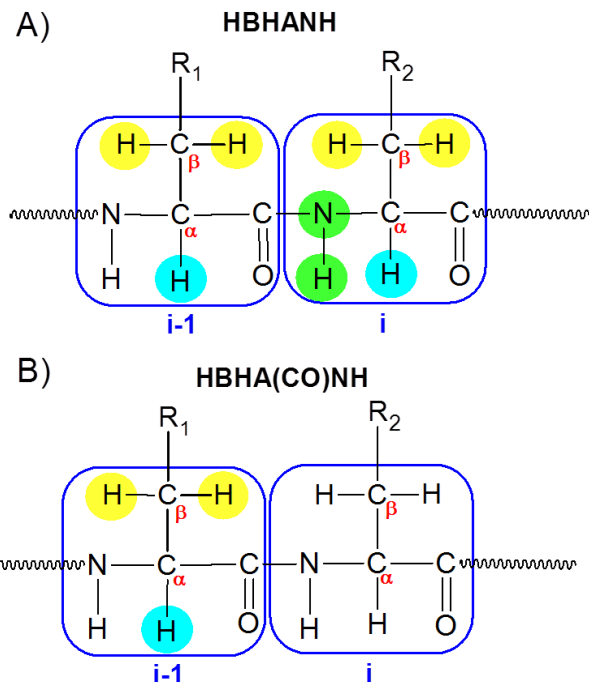


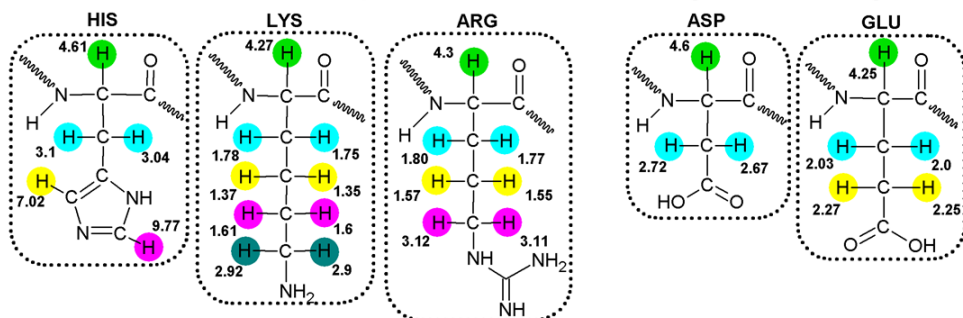
Figura 16: Sequência de impulsos para aquisição dos espectros HBHANH (A) e HBHA(CO)NH (B). Os resíduos i e $i-1$ de uma cadeia polipeptídica são mostrados esquematicamente. Os átomos evidenciados dizem respeito àqueles excitados. Os prótons excitados pertencentes ao carbono beta são mostrados em amarelo, enquanto que os prótons pertencentes ao carbono alfa são mostrados em azul. Os átomos N e H do aminoácido i estão identificados em verde.

Assim como no caso dos átomos de carbono, o *chemical shift* para os prótons depende diretamente do aminoácido ao qual pertence. Abaixo, na Figura 18 vemos os valores descritos para cada um dos aminoácidos.

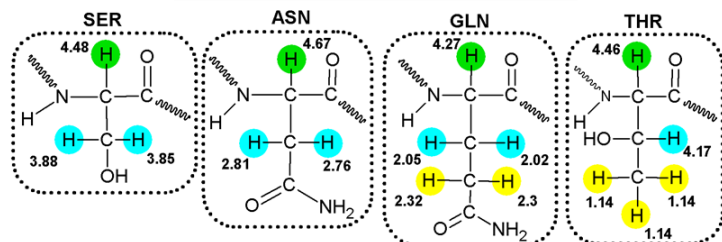
Aminoácidos eletricamente carregados

Positivamente carregados

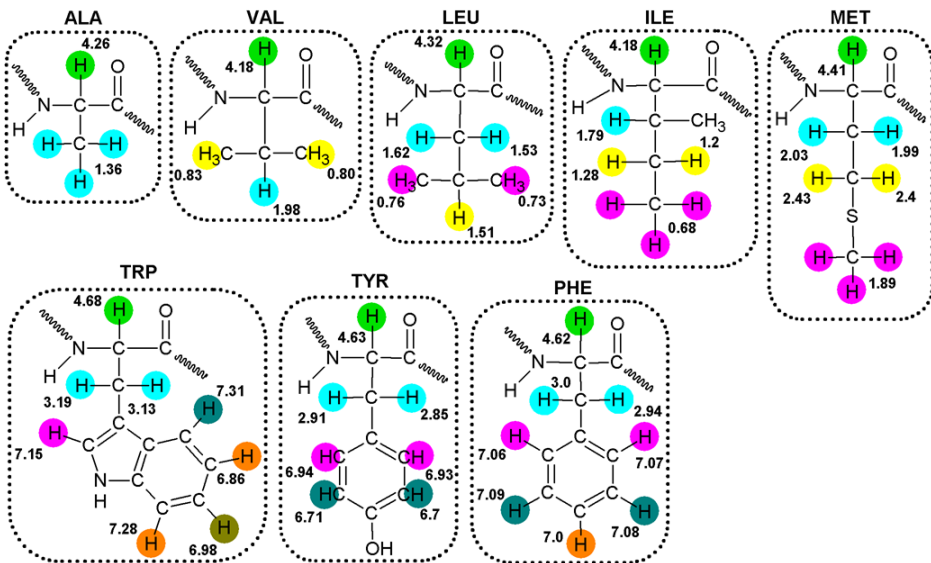
Negativamente carregados



Aminoácidos polares não carregados



Aminoácidos hidrofóbicos



Aminoácidos - Casos especiais

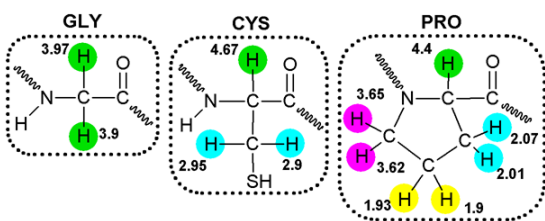


Figura 17: Chemical shifts relativos aos hidrogênios alfa e beta (H_α e H_β) dos aminoácidos contidos na sequência de uma proteína. Evidenciados estão os hidrogênios α , β , γ , δ , ϵ , ξ em verde, ciano, amarelo, rosa, verde e laranja, respectivamente.

2.5 *Cálculo de estrutura de uma proteína*

Após assinalar os picos identificados nos espectros de RMN, fazendo uso do *software* CARA (<http://cara.nmr.ch/doku.php>), estes dados, juntamente com o espectro de NOESY, são utilizados para cálculo de distâncias e obtenção de estrutura com o uso de programas adequados.

2.6 *Índice de deslocamento químico (Chemical shift perturbation)*

O *Chemical shift* nos dá informações importantes quanto à estrutura atômica, sendo este dado suscetível ao ambiente em que a proteína se encontra, bem como à geometria das ligações entre os átomos. De forma mais precisa, o *chemical shift* para os átomos que compõem o *backbone* de uma proteína são sensíveis aos ângulos diedros phi e psi (MULDER *et al.*, 2010).

No caso de proteínas globulares, com estrutura tridimensional definida, os ângulos diedros podem ser facilmente obtidos a partir dos valores de *chemical shift* do *backbone* da cadeia polipeptídica, enquanto que para IDPs este processo apresenta maior dificuldade devido à flutuação destes valores, sendo o *chemical shift* para cada átomo apresentado como uma média ponderada de uma região preferencial.

Mudanças no *chemical shift* podem ser usadas como preditores qualitativos de mudanças de estrutura, como no caso de predição de interface de interação de uma proteína com seu ligante (WILLIAMSON, 2013). Para análise de mudança de estrutura utilizando *chemical shift*, assumimos um espectro $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC da proteína em estudo como padrão - *fingerprint* da estrutura protéica – e as aquisições com titulação do ligante são sobrepostas e analisadas quanto ao deslocamento dos sinais detectados. O *chemical shift perturbation* (CSP) utiliza o espectro de $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC, devido à sua maior sensibilidade a qualquer mudança relativa ao meio, para monitorar a aquisição/mudança de estrutura da proteína devido à adição gradual de um ligante. A técnica de análise de CSP é muito útil, e pode ser usada mesmo que o assinalamento da proteína a ser estudada não tenha sido efetuado, pois se ocorre uma mudança de conformação após interação da proteína com seu ligante é detectada uma variação no *chemical shift* (WILLIAMSON, 2013).

A titulação gradual do ligante é capaz de prever a velocidade da reação com que o equilíbrio da reação se desloca em direção à produção de proteína-ligante (PL). Quando a taxa de produção de PL é alta, ou seja, a constante de dissociação (k_{off}) é baixa, o sinal da proteína desaparece a medida que o sinal do produto PL surge, como pode ser visto no exemplo ilustrado na Figura 19A. Ao contrário, quando a k_{off} é alta, o sinal muda gradualmente de posição, adquirindo posições intermediárias entre a posição inicial (na ausência do ligante) e final (em presença do ligante), conforme pode ser visto esquematicamente na Figura 19B.

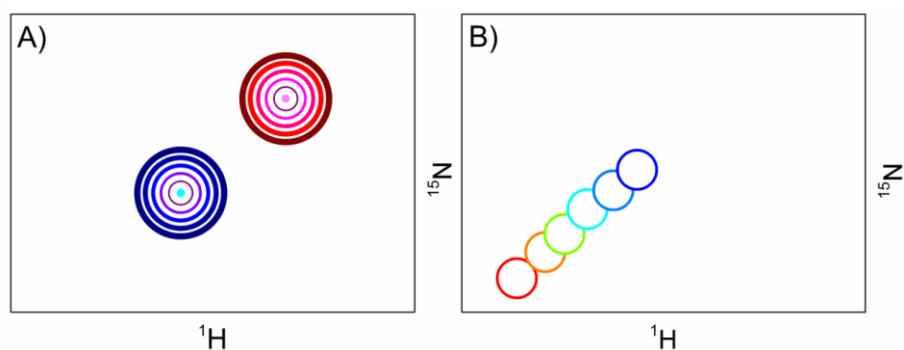


Figura 19: Esquema geral da variação do *chemical shift* verificado em um espectro de RMN bidimensional **A)** Ilustração do tipo de sinal obtido quando a interação proteína-ligante ocorre rapidamente. Esquematicamente, verifica-se que os picos referentes à proteína tendem a desaparecer (em tons de azul) enquanto aqueles que dizem respeito ao produto PL surgem (em tons de vermelho). **B)** Quando a velocidade de ligação proteína-ligante é baixa, os picos apresentam diversas posições intermediárias. Em vermelho seria a posição inicial, sofrendo uma gradual mudança de posição até a posição final, em azul. Figura adaptada de Williamson, 2013 (WILLIAMSON, 2013).

Para experimento de CSP é muito importante manter as condições utilizadas o mais estáveis possíveis, sendo o *chemical shift* muito sensível, variações de pH e concentração de sais podem alterar os sinais obtidos para cada *spin* podendo causar grande confusão nos dados obtidos. Experimentalmente levam-se em consideração diferentes núcleos ^{15}N e ^1H , e o CSP é calculado como uma função Euclidiana da distância onde as variações em ppm (partes por milhão) dos *spins* são multiplicadas por um fator α , conforme as equações abaixo:

$$CSP = \sqrt{\frac{1}{2}[\delta_H^2 + (\alpha \cdot \delta_N^2)]}$$

Os dados de ^1H e ^{15}N são combinados na mesma equação e o valor de α utilizado é 0,14, exceto no caso de glicinas onde usamos $\alpha = 0,2$ (WILLIAMSON, R. A. *et al.*, 1997; URBANIAK *et al.*, 2002; WILLIAMSON, M. P., 2013), δ diz respeito à variação do *chemical shift* encontrado para cada um dos átomos.

3 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. S. (2014) Capítulo 12: RMN - Bioinformática, da biologia à flexibilidade molecular, Primeira edição, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, São Paulo, 237-250.
- ANFINSEN, C. B., HABER, E., SELA, M. WHITE, F. H. (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 47, 1309–1314.
- BURGER, V., GURRY, T., STULTZ, C. (2014) Intrinsically disordered proteins: where computation meets experiment, *Polymers (Basel)*. 6 2684–2719.
- DUNKER, A.K., GARNER, E., GUILLIOT, S., ROMERO, P., ALBRECHT, K., Hart, J., OBRADOVIC, Z., KISSINGER, C., VILLAFRANCA, J.E. (1998) Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations., *Pac. Symp. Biocomput.* 473–84.
- DUNKER, A. K., LAWSON, J. D., BROWN, C. J., WILLIAMS, R. M., ROMERO, R., OH, J. S., OLDFIELD, C. J., CAMPEN, A. M., RATLIFF, C. M., HIPPS, K. W., AUSIO, J., NISSEN, M. S., REEVES, R., KANG, C., KISSINGER, C. R., BAILEY, R. W., GRISWOLD, M. D., CHIU, W., GARNER, E. C., OBRADOVIC, Z. (2001) Intrinsically disordered protein., *J. Mol. Graph. Model.* 19, 26–59.
- HE, B. WANG, K., LIU, Y., XUE, B., UVERSKY, V. N., DUNKER, A., K. (2009) Predicting intrinsic disorder in proteins: an overview, *Cell Res.* 19, 929-949.
- LIMA M. A., YATES, E. A., TERSARIOL, I. L. S., NADER, H. B. (2014) Capítulo 10: Dicroísmo circular - Bioinformática, da biologia à flexibilidade molecular, Primeira edição, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, São Paulo, 210-219.

- LINDING, R., RUSSELL, R. B., NEDUVA, V., GIBSON, T. J. (2003) GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder, *Nucleic Acids Res.* 31, 3701–3708.
- MOHAN, A., OLDFIELD, C. J., RADIVOJAC, P., VACIC, V., CORTESE, M. S., DUNKER, A. K., UVERSKY, V. N. (2006) Analysis of Molecular Recognition Features (MoRFs), *J. Mol. Biol.* 362, 1043-1059..
- MULDER, F. A. A, LUNDQVIST, M., SCHEEK, R. M. (2010) Nuclear magnetic resonance spectroscopy applied to (intrinsically) disordered proteins, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 61-87.
- TOMPA, P. (2012) Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap, *Trends Biochem. Sci.* 37, 509–516.
- URBANIAC, M. D., MUSKETT, F. W., FINUCANE, M. D., CADDICK, S., WOOLFSON, D. N. (2002) Solution structure of a novel chromoprotein derived from apo-Neocarzinostatin and a synthetic chromophore, *Biochemistry.* 41, 11731–11739.
- UVERSKY, V.N.; LONGHI,S. (2010) Instrumental analysis of intrinsically disordered proteins: assessing structure and conformation, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- UVERSKY, V.N. , GILLESPIE, J.R., FINK, A.L. (2000) Why are natively unfolded proteins unstructured under physiologic conditions?, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 41, 415–427.
- UVERSKY, V.N. (2002) What does it mean to be natively unfolded? *European Journal of Biochemistry - Wiley Online Library, Eur. J. Biochem.* 12, 2–12.
- WILLIAMSON, M. P. (2013) Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 73, 1–16.
- WILLIAMSON, R. A., CARR, M. D., FRENKIEL, T. A., FEENEY, J., FREEDMAN, R. B. (1997) Mapping the binding site for matrix metalloproteinase on the N-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by NMR chemical shift perturbation, *Biochemistry.* 36, 13882–13889.
- WOODY, R. W. (2010) Chapter 10: Circular dichroism of intrinsically disordered proteins - Instrumental analysis of intrinsically disordered proteins: assessing structure and

conformation, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 303-322.

WRIGHT, P. E., DYSON, H. J. (1999) Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm, *J. Mol. Biol.* 293, 321–331.

WRIGHT, P. E., DYSON, H. J. (2009) Linking folding and binding., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 31–8.

Anexo I



Jaburetox-induced toxic effects on the hemocytes of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae)



Natalia R. Moyetta^a, Valquiria Broll^b, Ana Paula A. Perin^b, Augusto F. Uberti^a,
Matheus V. Coste Grahl^a, Fernanda Staniscuaski^{b,c}, Celia R. Carlini^{a,c}, Leonardo L. Fruttero^{a,*}

^a Brain Institute (Instituto do Cérebro-INSCER), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, prédio 63, CEP 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43431, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Department of Molecular Biology and Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43431, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Hemocytes
Insect control
Jaburetox
Mechanism of action
Rhodnius prolixus
Toxicity

ABSTRACT

Jaburetox is a recombinant peptide derived from a *Canavalia ensiformis* urease that presents toxic effects upon several species of insects, phytopathogenic fungi and yeasts of medical importance. So far, no toxicity of Jaburetox to mammals has been shown. Previous reports have identified biochemical targets of this toxic peptide in insect models, although its mechanism of action is not completely understood. In this work, we aimed to characterize the effects of Jaburetox in hemolymphatic insect cells. For this purpose, the model insect and Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus* was used. *In vivo* and *in vitro* experiments indicated that Jaburetox interacts with a subset of hemocytes and it can be found in various subcellular compartments. In insects injected with Jaburetox there was an increase in the gene expression of the enzymes UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP), chitin synthase and nitric oxide synthase (NOS). Nevertheless, the expression of NOS protein, the enzyme activities of UAP and acid phosphatase (a possible link between UAP and NOS) as well as the phosphorylation state of proteins remained unchanged upon the *in vivo* Jaburetox treatment. Nitric oxide (NO) imaging using fluorescent probes showed that Jaburetox augmented NO production in the hemocyte aggregates when compared to controls. Even though Jaburetox activated the hemocytes, as demonstrated by wheat germ agglutinin binding assays, the peptide did not lead to an increase of their phagocytic behavior. Taken together, these findings contribute to our understanding of toxic effects of Jaburetox, a peptide with biotechnological applications and a prospective tool for rational insect control.

1. Introduction

Jaburetox is a recombinant peptide of ~11 kDa derived from one of the isoforms of urease from *Canavalia ensiformis*, a leguminous plant commonly known as jack bean (Mulinari et al., 2007). The various biological effects of urease isoforms, independent of their enzymatic activity, have been reviewed elsewhere (Real-Guerra et al., 2013; Carlini and Ligabue-Braun, 2016) and include entomo- and fungitoxicity, as well as exocytosis induction in several cell models. Jaburetox was also reported as toxic for several species of phytopathogenic filamentous fungi and yeasts of medical importance (Postal et al., 2012) and to insect species from the orders Lepidoptera (Mulinari et al.,

2007), Blattodea (Mulinari et al., 2007) and Hemiptera (Defferrari et al., 2011; Martinelli et al., 2014; Galvani et al., 2015). Nevertheless, high doses of Jaburetox are not lethal nor caused symptoms of acute toxicity in mice or neonate rats when given orally or *via* injection, indicating that the peptide has potential as an option of a safe insecticide (Mulinari et al., 2007). Moreover, preliminary results with maize, sugarcane and soybean transgenic plants expressing Jaburetox indicated that those crops present higher resistance to the attack of insect pests, making this peptide a prospective tool for rational insect control (Carlini and Ligabue-Braun, 2016).

Due to its physiological characteristics and ease of raising, triatomines (Hemiptera: Reduviidae) have been used as models for

Abbreviations: CNS, central nervous system; NOS, nitric oxide synthase; UAP, UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase; WGA, wheat germ agglutinin; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; FITC, fluorescein isothiocyanate; DAF-FM, 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein, diaminofluorescein-FM; PB, sodium phosphate buffer; FBS, fetal bovine serum; DTT, dithiothreitol; AP, acid phosphatase; JBU, jack bean urease; NO, nitric oxide; PAMP, pathogen associated molecular pattern; SG, salivary glands; Jbtx, Jaburetox

* Corresponding author at: Instituto do Cérebro (InsCer), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, prédio 63, CEP 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

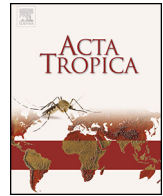
E-mail addresses: valbroll@ufrgs.br (V. Broll), fernanda.staniscuaski@ufrgs.br (F. Staniscuaski), celia.carlini@puccs.br (C.R. Carlini), leofruttero@cbiot.ufrgs.br (L.L. Fruttero).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.06.001>

Received 1 May 2017; Received in revised form 31 May 2017; Accepted 6 June 2017

Available online 08 June 2017

1532-0456/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.



Jaburetox affects gene expression and enzyme activities in *Rhodnius prolixus*, a Chagas' disease vector



Leonardo L. Fruttero^{a,b,*}, Natalia R. Moyetta^{a,1}, Monique Siebra Krug^b, Valquiria Broll^b, Matheus V. Coste Grahl^a, Rafael Real-Guerra^b, Fernanda Stanisçuaski^{b,c}, Celia R. Carlini^{a,b}

^a Brain Institute (Instituto do Cérebro-INSCER), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, prédio 63, CEP 90610-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43431, CEP 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Department of Molecular Biology and Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43431, CEP 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 November 2016

Received in revised form 9 January 2017

Accepted 12 January 2017

Available online 17 January 2017

Keywords:

Jaburetox

Rhodnius prolixus

Action mechanism

Ureases

Enzymatic pathways

ABSTRACT

Jaburetox, a recombinant peptide of ~11 kDa derived from one of the *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) urease isoforms, is toxic and lethal to insects belonging to different orders when administered orally or via injection. Previous findings indicated that Jaburetox acts on insects in a complex fashion, inhibiting diuresis and the transmembrane potential of Malpighian tubules, interfering with muscle contractility and affecting the immune system. *In vitro*, Jaburetox forms ionic channels and alters permeability of artificial lipid membranes. Moreover, recent data suggested that the central nervous system (CNS) is a target organ for ureases and Jaburetox. In this work, we employed biochemical, molecular and cellular approaches to explore the mode of action of Jaburetox using *Rhodnius prolixus*, one of the main Chagas' disease vectors, as experimental model. *In vitro* incubations with fluorescently labeled Jaburetox indicated a high affinity of the peptide for the CNS but not for salivary glands (SG). The *in vitro* treatment of CNS or SG homogenates with Jaburetox partially inhibited the activity of nitric oxide synthase (NOS), thus disrupting nitricergic signaling. This inhibitory effect was also observed *in vivo* (by feeding) for CNS but not for SG, implying differential modulation of NOS in these organs. The inhibition of NOS activity did not correlate to a decrease in expression of its mRNA, as assessed by qPCR. UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP), a key enzyme in chitin synthesis and glycosylation pathways and a known target of Jaburetox in insect CNS, was also affected in SG, with activation of the enzyme seen after both *in vivo* or *in vitro* treatments with the peptide. Unexpectedly, incubation of Jaburetox with a recombinant *R. prolixus* UAP had no effect on its activity, implying that the enzyme's modulation by the peptide requires the participation of other factor(s) present in CNS or SG homogenates. Feeding Jaburetox to *R. prolixus* decreased the mRNA levels of UAP and chitin synthase, indicating a complex regulation exerted by the peptide on these enzymes. No changes were observed upon Jaburetox treatment *in vivo* and *in vitro* on the activity of the enzyme acid phosphatase, a possible link between UAP and NOS. Here we have demonstrated for the first time that the Jaburetox induces changes in gene expression and that SG are another target for the toxic action of the peptide. Taken together, these findings contribute to a better understanding of the mechanism of action of Jaburetox as well as to the knowledge on basic aspects of the biochemistry and neurophysiology of insects, and might help in the development of optimized strategies for insect control.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: Jbtx, Jaburetox; CNS, central nervous system; NOS, nitric oxide synthase; SG, salivary glands; NO, nitric oxide; UAP, UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase; UDP-GlcNAc, UDP-N-acetylglucosamine; GPI, glycosylphosphatidylinositol; rUAP, recombinant UAP; AP, acid phosphatase; JBU, Jack Bean Urease; GPIs, glycoinositolphospholipids.

* Corresponding author at: Instituto do Cérebro (InsCer) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, prédio 63, CEP 90610-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

E-mail addresses: leofruttero@cbiot.ufrgs.br, leonardofruttero@gmail.com (L.L. Fruttero), nataliarmoyetta@gmail.com (N.R. Moyetta), monie.krug@gmail.com (M.S. Krug), valbroll@ufrgs.br (V. Broll), matheusgrahl@hotmail.com (M.V.C. Grahl), rafael.guerra@ufrgs.br (R. Real-Guerra), fernanda.stanisçuaski@ufrgs.br (F. Stanisçuaski), celia.carlini@puccs.br, ccarlini@ufrgs.br (C.R. Carlini).

¹ These authors have contributed equally to the paper.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.01.009>

0001-706X/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

RESEARCH

Open Access



Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*

Leonardo L. Fruttero^{1,2,5*}, Natalia R. Moyetta¹, Augusto F. Uberti^{1,2}, Matheus V. Coste Grahl¹, Fernanda C. Lopes^{1,2}, Valquiria Broll², Denise Feder³ and Celia R. Carlini^{1,2,4}

Abstract

Background: Although the entomotoxicity of plant ureases has been reported almost 20 years ago, their insecticidal mechanism of action is still not well understood. Jaburetox is a recombinant peptide derived from one of the isoforms of *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) urease that presents biotechnological interest since it is toxic to insects of different orders. Previous studies of our group using the Chagas disease vector and model insect *Rhodnius prolixus* showed that the treatment with Jack Bean Urease (JBU) led to hemocyte aggregation and hemolymph darkening, among other effects. In this work, we employed cell biology and biochemical approaches to investigate whether Jaburetox would induce not only cellular but also humoral immune responses in this species.

Results: The findings indicated that nanomolar doses of Jaburetox triggered cation-dependent, in vitro aggregation of hemocytes of fifth-instar nymphs and adults. The use of specific eicosanoid synthesis inhibitors revealed that the cellular immune response required cyclooxygenase products since indomethacin prevented the Jaburetox-dependent aggregation whereas baicalein and esculetin (inhibitors of the lipoxygenases pathway) did not. Cultured hemocytes incubated with Jaburetox for 24 h showed cytoskeleton disorganization, chromatin condensation and were positive for activated caspase 3, an apoptosis marker, although their phagocytic activity remained unchanged. Finally, in vivo treatments by injection of Jaburetox induced both a cellular response, as observed by hemocyte aggregation, and a humoral response, as seen by the increase of spontaneous phenoloxidase activity, a key enzyme involved in melanization and defense. On the other hand, the humoral response elicited by Jaburetox injections did not lead to an increment of antibacterial or lysozyme activities. Jaburetox injections also impaired the clearance of the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* from the hemolymph leading to increased mortality, indicating a possible immunosuppression induced by treatment with the peptide.

(Continued on next page)

* Correspondence: leonardofruttero@gmail.com; leofruttero@cbiot.ufgrs.br

¹Brain Institute (INSCER) and Graduate Program in Medicine and Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 The Author(s). **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Pliable natural biocide: Jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease

Fernanda C. Lopes¹, Olena Dobrovolska², Rafael Real-Guerra³, Valquiria Broll¹, Barbara Zambelli², Francesco Musiani², Vladimir N. Uversky^{4,5,6}, Célia R. Carlini^{1,3,7} and Stefano Ciurli²

1 Graduate Program in Cellular and Molecular Biology – Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

2 Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Department of Pharmacy and Biotechnology, University of Bologna, Italy

3 Department of Biophysics and Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

4 Department of Molecular Medicine and USF Health Byrd Alzheimer's Research Institute, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, USA

5 Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russia

6 Department of Biological Science, Faculty of Science, King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia

7 Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Keywords

Canavalia ensiformis; circular dichroism; Jaburetox; light scattering; NMR spectroscopy; urease

Correspondence

S. Ciurli, Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Department of Pharmacy and Biotechnology, University of Bologna, Via Giuseppe Fanin 40, 40127 Bologna, Italy
Fax: +39 051 209 6203
Tel: +39 051 2096204

E-mail: stefano.ciurli@unibo.it

V. N. Uversky, Department of Molecular Medicine and USF Health Byrd Alzheimer's Research Institute, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, FL 33612, USA

Fax: +1 813-974-7357

Tel: +1 813-974-5816

E-mail: vuvversky@health.usf.edu

C. R. Carlini, Graduate Program in Cellular and Molecular Biology – Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil

Fax: + 55 51 3308 7003

Tel: + 55 51 3308 7606

E-mail: ccarlini@ufrgs.br

(Received 9 October 2014, revised 13

January 2015, accepted 14 January 2015)

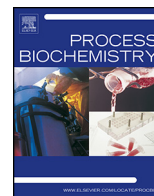
doi:10.1111/febs.13201

Jaburetox is a polypeptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease and toxic to a broad spectrum of insects, phytopathogenic filamentous fungi and yeasts of medical importance. The elucidation of the structural basis for the mode of action of Jaburetox is the focus of this multifaceted study. Jaburetox in solution is a monomer of 11.0 kDa featuring a large hydrodynamic radius, suggestive of a disordered polypeptide. The intrinsically disordered nature of Jaburetox was theoretically predicted by a comprehensive bioinformatics analysis and experimentally confirmed by light scattering as well as by circular dichroism and NMR spectroscopy. NMR signal assignment provided backbone secondary chemical shifts that indicated that Jaburetox has a low propensity to assume a stable secondary structure. ¹⁵N relaxation studies revealed significant backbone mobility, especially in the N-terminal portion of the polypeptide. The solution structure of Jaburetox shows the presence of an α -helical motif close to the N terminus, together with two turn-like structures situated in the central portion of the protein and close to the C terminus. Similar regions were predicted as potential protein–protein interaction sites using computational tools. The knowledge of the structural properties of Jaburetox in solution is a key step to correlate its structural and biological activities.

Abbreviations

HSQC, heteronuclear single quantum coherence; IDP, intrinsically disordered protein; JBU, jack bean urease; LUV, large unilamellar vesicle; MALS, multiple-angle light scattering; MoRF, molecular recognition feature; QELS, quasi-elastic light scattering; SEC, size exclusion chromatography; SSP, secondary structure propensity; TCEP, tris(2-carboxyethyl)phosphine.

Anexo II



Soybean ubiquitous urease with purification facilitator: An addition to the moonlighting studies toolbox



Anne H.S. Martinelli^{a,*}, Fernanda C. Lopes^{b,c,**}, Valquiria Broll^b, Marina S. Defferrari^f, Rodrigo Ligabue-Braun^b, Karine Kappaun^c, Deise M. Tichota^b, Leonardo L. Fruttero^{a,c}, Natalia R. Moyetta^c, Diogo R. Demartini^b, Melissa Postal^b, Monica Medeiros-Silva^b, Arlete Beatriz Becker-Ritt^d, Giancarlo Pasquali^{b,e}, Célia R. Carlini^{a,b,c}

^a Department of Biophysics, Biosciences Institute (IB), UFRGS, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Graduate Program in Cellular and Molecular Biology – Center for Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Instituto do Cérebro (InsCer) and Graduate Program in Medicine and Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Graduate Program in Cellular and Molecular Biology Applied to Health, Genetics Applied Toxicology, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), CEP 92425-900, Canoas, RS, Brazil

^e Department of Molecular Biology and Biotechnology, IB, UFRGS, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^f Department of Biology, University of Toronto Mississauga, Mississauga, Ontario, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 February 2016

Received in revised form 5 December 2016

Accepted 8 December 2016

Available online 9 December 2016

Keywords:

Soybean

Ubiquitous urease

Production optimization

Antifungal activity

Fungal pigments

Insecticidal activity

ABSTRACT

Ureases are nickel-dependent enzymes that catalyze the hydrolysis of urea to ammonia and carbon dioxide. In soybean (*Glycine max*), the embryo-specific urease (eSBU), the ubiquitous urease (uSBU), and a third isoform (SBU-III) are synthesized. Our group has previously demonstrated that eSBU, purified from seeds, has antifungal properties against phytopathogenic fungi, entomotoxicity against *Dysdercus peruvianus*, the ability to induce blood platelet aggregation, and these properties are independent of its enzymatic activity. Here we describe the biological properties of apo-uSBU fused to glutathione S-transferase (GST) produced in *Escherichia coli*. Removal of GST affected apo-uSBU stability. We performed a Response Surface Methodology to optimize GST-uSBU production to 5 mg per liter and then bioassays were carried out. The recombinant protein exhibited inhibitory effects on filamentous fungi and affected fungal secondary metabolism. *Candida albicans* and *C. tropicalis* were also susceptible to GST-uSBU and formed pseudo-hyphae. The fusion protein was toxic against *Rhodnius prolixus*, with the toxicity being accompanied by *in vivo* and *in vitro* hemocyte aggregation. Rabbit platelet also aggregated in the presence of GST-uSBU. Thus, uSBU displayed similar biological properties as previously described for eSBU even when fused to GST, reinforcing the proposed role of ureases in plant defense.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ureases (EC 3.5.1.5, urea amidohydrolase), metalloenzymes that catalyze the hydrolysis of urea to produce ammonia and carbon

dioxide, are produced by plants, fungi and bacteria but not by animals [1,2]. Ureases contain two catalytically important atoms of nickel [3] that require a set of accessory proteins to place them in the active site of the apoenzymes [4,5]. In plants, ureases are abundant mainly in seeds of some members of the Fabaceae and Curcubitaceae families [1]. It has been postulated that these enzymes are not only involved in nitrogen bioavailability, but also in plant defense processes [6]. Over the last two decades our group has demonstrated that ureases from different organisms are multifunctional proteins, displaying a number of biological properties unrelated to their enzyme nature, including platelet aggregation, insecticidal, and antifungal activities [6–10].

* Corresponding author at: Department of Biophysics, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43.431, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

** Corresponding author at: Graduate Program in Cellular and Molecular Biology – Center for Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: anne.martinelli@ufrgs.br, ahsmartinelli@yahoo.com.br

(A.H.S. Martinelli), fernanda.cortez@ufrgs.br (F.C. Lopes).

¹ These authors have equally contributed to this work.




Valquiria Broll
Curriculum Vitae

Agosto/2017

Valquiria Broll

Curriculum Vitae

Dados pessoais

 Rua João da Silva Bueno, 227/338 – Porto Alegre, RS/Brasil
 valbroll@gmail.com / valbroll@ufrgs.br
 <https://it.linkedin.com/in/valquiria-broll-08840286>
<http://laneurotox.net.br/en/>

Formação acadêmica/titulação

- 2013** **Doutorado em Biologia Celular e Molecular.**
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Doutorado sanduíche na Università di Bologna (Orientador : Stefano Luciano Ciurli)
Orientador: Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini
Co-orientador: Dr. Diogo Ribeiro Demartini e Dr. Stefano Luciano Ciurli
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2011 - 2013** **Mestrado em Biologia Celular e Molecular.**
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Purificação e caracterização da urease recombinante de *Proteus mirabilis*
Orientador: Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini
Co-orientador: Diogo Ribeiro Demartini
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2006 - 2011** **Graduação em Química Bacharelado.**
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Estudos proteômicos da semente de Canavália ensiformis
Orientador: Tânia Mara Pizzolato, Célia Regina Carlini e Diogo Demartini
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2015 - 2015** Good Clinical Practices (GCP). (Carga horária: 6h).
NIDA Clinical Trial Network
- 2015 - 2015** Introdução à biologia de sistemas. (Carga horária: 15h).
Escola Gaúcha de Bioinformática (UFRGS) – Porto Alegre, RS, Brasil
- 2012 - 2012** Coletor de amostras em laboratório clínico. (Carga horária: 20h).
Faculdades FACTUM – Porto Alegre, RS, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Espectroscopia de massas de proteínas. (Carga horária: 30h).
Fundação Oswaldo Cruz - Bahia, FIOCRUZ-BA, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Capacitação para monitoria acadêmica a distância. (Carga horária: 4h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em A química analítica forense de traços. (Carga horária: 4h).
Conselho Regional de Química da 5ª Região, CRQ-V, Porto Alegre, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Produtos naturais: Estudos químicos e biológicos. (Carga horária: 8h).
Universidade Estadual do Ceará, UECE, Fortaleza, Brasil

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. MOYETTA, N. R.; **BROLL, V.**; PERIN, A. P. A.; UBERTI, A. F.; GRAHL, M. V. C.; STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C. R.; FRUTTERO, L. L., Jaburetox-induced toxic effects on the hemocytes of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY - PART C: TOXICOLOGY & PHARMACOLOGY*, *in press*, 2017.
2. FRUTTERO, L. L.; MOYETTA, N. R.; KRUG, M. SIEBRA; **BROLL, V.**; GRAHL, M. V. C.; REAL-GUERRA, R.; STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C. R., Jaburetox affects gene expression and enzyme activities in *Rhodnius prolixus*, a Chagas' disease vector. *ACTA TROPICA*, v.168, p.54 - 63, 2017.
3. MARTINELLI, A. H. S.; LOPES, F. C.; **BROLL, V.**; DEFFERRARI, M. S.; LIGABUE-BRAUN, R.; KAPPAUN, K.; TICHOTA, D. M.; FRUTTERO, L. L.; MOYETTA, N. R.; DEMARTINI, D. R.; POSTAL, M.; MEDEIROS-SILVA, M.; BECKER-RITT, A. B.; PASQUALI, G.; CARLINI, C. R., Soybean ubiquitous urease with purification facilitator: An addition to the moonlighting studies toolbox. *PROCESS BIOCHEMISTRY*, v.53, p.245 - 258, 2017.
4. FRUTTERO, L. L.; MOYETTA, N. R.; UBERTI, A. F.; GRAHL, M. V. COSTE; LOPES, F. C.; **BROLL, V.**; FEDER, D.; CARLINI, C. R. Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*. *PARASITES & VECTORS*, v.9, p.412 - , 2016.
5. LOPES, F. C.; DOBROVOLSKA, O.; REAL-GUERRA, R.; **BROLL, V.**; ZAMBELLI, B.; MUSIANI, F.; UVERSKY, VLADIMIR N.; CARLINI, C. R.; CIURLI, S., Pliable natural biocide: Jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease. *THE FEBS JOURNAL*, v.85, 2015.

Educação e popularização de ciência e tecnologia

Curso de curta duração ministrado

1. **Broll, V.**; LOPES, F. C.; MARTINELLI, A. H. S.; Becker-Ritt, A. B.
Biotechnologia: Métodos e aplicações – Terceira edição, 2016.
Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas/RS-Brasil.
2. **Broll, V.**; LOPES, F. C.; MARTINELLI, A. H. S.; LIGABUE-BRAUN, Becker-Ritt, A. B.
Biotechnologia: Métodos e aplicações - Segunda edição, 2016.
Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas/RS-Brasil.
3. **Broll, V.**; LOPES, F. C.; MARTINELLI, A. H. S. ; Becker-Ritt, A. B.
Biotechnologia: Métodos e aplicações - Primeira edição, 2015.
Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas/RS-Brasil.
4. **Broll, V.**; LOPES, F. C.; MARTINELLI, A. H. S.
Proteínas recobinantes: Do DNA à análise de proteínas, 2015.
Instituto Federal de Pelotas, Pelotas/RS-Brasil.

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras e olimpíadas

1. Becker-Ritt, A. B.; MARTINELLI, A. H. S.; LOPES, F. C.; **Broll, V.**; Ligabue-Braun R.
Biotechnologia: métodos e aplicações – Segunda e terceira edições, 2016
Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas/RS-Brasil.
2. Becker-Ritt, A. B.; MARTINELLI, A. H. S.; LOPES, F. C.; **Broll, V.**
Biotechnologia: métodos e aplicações – Primeira edição, 2015
Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas/RS-Brasil.
3. MARTINELLI, A. H. S.; LOPES, F. C.; SILVA, R. S.; **Broll, V.**
Proteínas recombinantes: do DNA à análise de proteínas, 2015
Instituto Federal de Pelotas, Pelotas/RS-Brasil.

4. CARLINI, C. R. R. S.; **Broll, V.**; BRAUN, R. L.; LOPES, F. C.; VERLI, H.; SILVA, A. O.; MAHL, C. D.; BEHLING, C. S.; CHIODI, C. G.; BALAGUEZ, C.; CHIELA, E. C. F.; REDER, G. M.; MEJIA, G. L.; ESTANISLAU, J. F. R.; KAPPAUN, K.; FLACH, K.; SOUZA, L. M.; REIS, S. V.

Curso de Férias - "Você conhece a célula?", 2013

Universidade federal do Rio Grande do Sul - CBiot, Porto Alegre/RS-Brasil.

5. CARLINI, C. R. R. S.; LOPES, F. C.; **Broll, V.**; GUERRA, A. S.; SOUZA, A. F. D.; VERLI, H.; TICHOTA, D. M.; KIPPER, F. C.; GIESEL, G. M.; DEBARBA, J. A.; FACHIN, L. P.; COSTA, L. L.; RITT, A. B.; VAINSTEIN, M. H.; LEDUR, P. F.; MEIRA, S. M. M.; GONCHOROSKI, T.; ALMEIDA, V. R.

Curso de Férias - "Alimentos", 2012

Universidade federal do Rio Grande do Sul - CBiot, Porto Alegre/RS-Brasil.

Orientações e Supervisões

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Edoardo Salladini. **Studi strutturali su Jaburetox, un insetticida naturale derivante dall'ureasi presentata**. 2015. Curso de biotecnologia molecular e industrial - Università di Bologna (UniBO-Italia)

Iniciação científica

1. Daniel Barletta Sulis. **Endopeptidases ácidas a partir de sementes da *Canavalia ensiformis***. 2013. Iniciação científica (Biotecnologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2. Lucas Roveré Franz. **Otimização da expressão e purificação da urease de *Proteus mirabilis* recombinante**. 2016-2017. Iniciação científica (Biotecnologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster no(a) **23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology – SBBq**, 2015.

Structural studies on jaburetox: an intrinsically disordered polypeptide derived from Jackbean (*Canavalia ensiformis*) urease.

2. Apresentação de Poster no(a) **23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology – SBBq**, 2015.

Non-enzymatic biological activity of *Proteus mirabilis* urease.

3. Apresentação de Poster no(a) **Convegno Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici**, 2013.

Purification and characterization of recombinant urease from *Proteus mirabilis*.

4. Apresentação de Poster no(a) **XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2013.

Urease from *Proteus mirabilis*.

5. Apresentação de Poster no(a) **XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2013.

Acidic Endopeptidases from *Canavalia ensiformis* Seeds.

6. Apresentação de Poster no(a) **Congresso Latinoamericano de Microbiologia - XXI ALAM**, 2012.

Urease de *Proteus mirabilis*: Efeitos sob modelos celulares.

9. **III Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica**, 2012.

Urease de *Proteus mirabilis*: Efeitos sob modelos celulares.

10. Apresentação de Poster no(a) **39^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2010.

Acidic Endopeptidases from *Canavalia ensiformis* Seeds.