

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE
UM INIBIDOR DE TRIPSINA DO *Theobroma cacao* L.

MILENA DO AMARAL SANTOS

ILHÉUS - BAHIA - BRASIL

21 de Fevereiro de 2014

MILENA DO AMARAL SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE
UM INIBIDOR DE TRIPSINA DO *Theobroma cacao* L.**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa
Cruz, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Bioquímica
e Proteômica

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

21 de Fevereiro de 2014

S237

Santos, Milena do Amaral.

Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de tripsina do *Theobroma cacao* L. / Milena do Amaral Santos. – Ilhéus, BA : UESC, 2014.

66 f. : il.

Orientador: Carlos Priminho Pirovani.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Inibidores da tripsina. 2. Relação inseto-planta. 3. Biotecnologia. I. Título.

CDD 572.7

MILENA DO AMARAL SANTOS

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE UM
INIBIDOR DE TRIPSINA DO *Theobroma cacao* L.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Bioquímica e Proteômica

Aprovada: 21 de fevereiro de 2014

Dra. Maria de Fátima Grossi de Sá
(CENARGEN)

Dra. Aurizangela de Oliveira Sousa
(UESC)

Dra. Fabienne Florence Lucienne Micheli
(Cirad/UESC)

Carlos Priminho Pirovani
Orientador (UESC)

A meus avós Marlene e Amaral, por sonharem comigo essa conquista,
pelas orações, incentivo e carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por estar presente comigo em minhas orações nos momentos de dificuldade e alegria.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro ao projeto.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

A UESC, pelo financiamento, pela estrutura e apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade.

Ao meu orientador Priminho, a quem tenho muita admiração, por me ensinar a ser uma profissional íntegra e confiável em nosso trabalho.

À família Proteômica, por todo aprendizado, paciência e confiança.

Aos meus colegas de Laboratório em especial, Everton Cruz, Ana Camila Oliveira, Leila Carvalho e Milena Dória, por ajudar nas horas de sufoco.

Aos IC's Taynara, Cristiane e Edson pelas conversas e troca de experiência.

Ao Técnico Orlei, por seu trabalho, que ajuda de forma substancial o encaminhamento de nossas análises e por seu companheirismo.

Ao Juliano, pela amizade e por ter me ajudado nas análises de modelagem.

Ao Alessandro Cunha, por tornar mais leves os momentos de tensão da vida acadêmica.

À Soraya, por cuidar de mim e se preocupar com minha saúde.

À minha irmã Jéssica Amaral, pela amizade sincera e conselhos.

À minha mãe Jacqueline Amaral, por todo amor e confiança, e por dar todo o suporte para minha formação.

Ao meu Pai José Mota, pelo amor e momentos de alegria.

Aos meus amigos, Patrícia, Guidomar, Disraely, Sabrina, Anna Gabriele, Aline, Everlin, Thalles, Larissa, Adalmir e Manoel Messias, pela torcida.

A todos os meus familiares, por sempre estarem presentes, não importa qual momento de minha vida.

A vocês, meu muito obrigada.

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1 O papel das proteases.....	4
2.2 Serino Proteases	5
2.3 Inibidores de proteases.....	7
2.4.1. Mecanismo de inibição dos IPs de serino-proteases	9
2.5 Inibidores do Tipo Kunitz.....	11
2.6 Funções dos inibidores de tripsina.....	13
3. Materiais e Métodos	15
3.1 Análise da sequência <i>TcIT</i> por bioinformática	15
3.2. Clonagem de <i>TcIT</i> Recombinante	16
3.3 Expressão e purificação de <i>TcIT</i> Recombinante.....	17
3.4 Teste para atividade inibitória de <i>TcIT</i>	18
3.5 Teste para termoestabilidade de <i>TcIT</i>	18
3.6 Determinação da constante de inibição K_i	19
3.7 Obtenção do soro imune a proteína <i>TcIT</i>	19
3.8 Imunodeteção de inibidores de tripsina em frutos de cacau em diferentes estágios de desenvolvimento	20
3.9 Imunodeteção em cotilédones em diferentes estágios de germinação	20
3.10 Imunodeteção em diferentes tecidos do cacau	21
3.11 Imunodeteção em meristemas infectados e sadios.....	21
3.12 Análise de <i>TcIT</i> em Dicroísmo Circular (CD).....	22
4. Resultados	23
4.1 Análise da sequência de <i>TcIT</i> indica um inibidor do tipo Kunitz.....	23
4.2 Análise do gene <i>TcIT</i> no genoma do cacau	24
4.3 Análise estrutural por bioinformática	27
4.4 A proteína <i>TcIT</i> é produzida na fração solúvel do extrato de <i>E. coli</i>	29
4.5 <i>TcIT</i> é estável à variação de temperatura de até 60 °C	31
4.6 <i>TcIT</i> apresenta inibição do tipo competitiva.....	32
4.7 <i>TcIT</i> do tipo Kunitz indica conformação padrão de folhas- β	33
4.8 Imunodeteção de <i>TcIT</i> em diferentes estágios do fruto e semente de cacau	34
4.9 <i>TcIT</i> é detectado nos diferentes estágios de germinação da semente	36

4.10	Imunodeteccção de IT em estágios mais avançados de germinação	37
4.11	Imunodeteccção de IT em diferentes tecidos de cacau.....	39
4.12	Acúmulo do inibidor de tripsina em meristemas em resposta ao tempo de inoculação ao <i>Moniliophthora perniciosa</i>	40
5.	Discussão	43
5.1	<i>TcIT</i> apresenta características conservadas com os inibidores do tipo Kunitz.....	43
5.2	A proteína <i>TcIT</i> recombinante é ativa e estável.....	45
5.3	<i>TcIT</i> tem potencial para determinação do binômio tempo-temperatura para indústria	47
5.4	Cinética de inibição de <i>TcIT</i> recombinante	49
5.5	<i>TcIT</i> acumula durante o desenvolvimento do fruto e semente e é mantido nos cotilédones durante a germinação.	51
5.6	IT's apresentam acúmulo diferencial durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa no cacau	54
6.	Conclusões	56
7.	Referências Bibliográficas	57

Resumo:

Santos, Milena Amaral. M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – Bahia Fevereiro de 2014. **CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DO *Theobroma cacao* L.** Orientador: Dr. Carlos Priminho Pirovani. Co-orientador: Dr. Abelmon da Silva Gesteira.

Inibidores de proteases (IPs) são importantes alvos com potencial uso biotecnológico e aplicação na agricultura. Geralmente são as primeiras proteínas a serem acionadas na planta como um mecanismo de defesa a ataque de patógenos, promovendo resistência à planta. Os inibidores de serino-proteases são comumente conhecidos por atuar contra o ataque de insetos, inibindo as proteases do trato digestivo. Diferentes classes de proteases assim como seus respectivos inibidores proteicos foram identificados nos bancos genômicos do cacau. Os IPs de tripsina interagem de forma canônica com a protease formando um complexo estável e reversível, que confere a esses inibidores uma alta capacidade inibitória. Em bibliotecas de EST's da interação *Theobroma cacao* – *Moniliophthora perniciosa* (Mp.) desenvolvida por Gesteira et al. (2007), 32 sequências para inibidores de tripsina foram identificadas apenas para a variedade resistente do cacau, indicando que esses inibidores podem estar vinculados ao processo de resistência ao ataque pelo patógeno. Com isso, o objetivo desse trabalho foi caracterizar um inibidor de tripsina de cacau, aqui denominado TcIT, cuja ORF apresenta 740 pb, codificando uma proteína com 219 aminoácidos e massa molecular estimada de aproximadamente 23 kDa. A proteína heteróloga foi obtida por clonagem e expressão em *Escherichia coli*, sendo purificada da fração solúvel do extrato de células por cromatografia de afinidade, utilizando coluna contendo níquel. A capacidade inibitória da proteína recombinante TcIT foi testada sobre a tripsina suína comercial por meio da hidrólise do substrato cromogênico BApNA, mostrando que a proteína produzida em bactéria é ativa e apresentam um K_i igual a $408,09 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Em análise da termoestabilidade do inibidor TcIT recombinante, 100 % da atividade inibitória foi mantida até os 60 °C, e aos 70 e 80°C a atividade inibitória foi mantida acima de 50 %. As análises de Dicroísmo Circular indicam que a proteína é rica em β -conformações. Anticorpos policlonais contra a proteína recombinante foram produzidos em coelho e utilizados para analisar a presença do inibidor endógeno nos tecidos da planta pela técnica de western blot. A proteína acumulada na semente durante o desenvolvimento e é mantida nos cotilédones durante a germinação. Esse inibidor acumula de forma diferenciada em diversos tecidos do *T. cacao*. Em meristemas infectados sob diferentes

fases de infecção ao *Mp* o inibidor acumula em estágios iniciais da doença em resposta ao patógeno. Esse inibidor tem características bioquímicas que podem ser utilizadas para manipulação de produtos biotecnológicos, além de ser um fator adicional aos estudos de resistência do *T. cacao*.

Palavras-chave: Inibidor de tripsina do tipo Kunitz, interação planta-patógeno, produtos biotecnológicos.

Abstract:

Santos, Milena Amaral, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – Bahia February 2014. **FUNCTIONAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A TRYPSIN INHIBITOR FROM *Theobroma cacao* L.** Advisor: Dr. Carlos Priminho Pirovani. Advisor Committee Members: Dr. Abelmon da Silva Gesteira.

Protease inhibitors (PIs) are important biotechnological tools of target interest to agriculture. Usually are the first proteins to be activated in the plant as a defense mechanism to attack by pathogens, promoting resistance to the plant. Inhibitors of serine-proteases are commonly known to act against insect attack, inhibiting proteases of the digestive tract. Different classes of proteases and their inhibitors protein have been identified in genomic bank of cacao. PIs trypsin interact in canonical form with protease forming a stable and reversible complex which these inhibitors confers a high inhibitory capacity. In libraries of EST's interaction *Theobroma cacao* - *Moniliophthora perniciosa* developed by Gesteira et al. (2007), 32 sequences for trypsin inhibitors were identified only for the resistant variety of cacao, indicating that these inhibitors may be linked to resistance to this pathogen process. Therefore, the aim of this study was characterize a trypsin inhibitor from cacao, here called *TcIT*, which has 740 bp ORF, encoding a protein with 219 amino acids and a predicted molecular weight of approximately 23 kDa. The heterologous protein was obtained by cloning and expression in *E. coli*, and purified from the soluble fraction of the cell extract by affinity chromatography using a Nickel column. The inhibitory capacity of the recombinant protein *TcIT* was tested on commercial porcine trypsin by hydrolysis of the chromogenic substrates BApNA showing that the protein produced in bacteria is active and exhibit a K_i equal to 408.09 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Analysis of the thermostability of recombinant inhibitor *TcIT* 100% inhibitory activity was retained until 60 °C and 70-80 °C inhibitory activity was maintained above 50%. The Circular Dichroism analysis indicates that the protein is rich in β -conformations. Polyclonal antibodies against recombinant protein was produced in rabbits and used to analyze the presence of endogenous inhibitors in plant tissue by Western Blot. The protein accumulates in the seed during development is retained in the cotyledons during germination. This inhibitor accumulates differently in different tissues of *T. cacao*. In meristems infected under different stages of infection by *Mp*, the inhibitor accumulates in the early stages of the disease in response to the pathogen. This inhibitor has biochemical characteristics

which can be used for handling biotechnology products, and is an additional factor to the resistance studies of *T. cacao*.

Key-words: Trypsin inhibitor Kunitz, plant-pathogen interaction, biotechnology products.

Lista de Figura

Figura 1 Etapas na clivagem de uma ligação peptídica por quimiotripsina.	6
Figura 2: Sobreposição de três resíduos inibitórios do inibidor de tripsina.	10
Figura 3: Diferentes estruturas de inibidores de tripsina.	11
Figura 4: Mapa físico da clonagem de <i>TcIT</i>	17
Figura 5: Sequência de aminoácidos de <i>TcIT</i>	23
Figura 6: Alinhamento do domínio conservado Kunitz de <i>TcIT</i> os demais genes encontrados na biblioteca do cacau (Argout et al 2011).	25
Figura 7: Árvore Filogenética construída de acordo com a similaridade de <i>TcIT</i> com outro inibidores.....	26
Figura 8: Análise de conformação e modelagem de <i>TcIT</i>	27
Figura 9: Análise de Ramachandran para a estrutura pdb de <i>TcIT</i>	288
Figura 10: Expressão de <i>TcIT</i> recombinante.....	30
Figura 11: Atividade residual da tripsina..	31
Figura 12: Termoestabilidade de <i>TcIT</i> sob diferentes temperaturas.	32
Figura 13: Modelo do duplo-recíproco para a inibição de <i>TcIT</i> sobre a Tripsina.....	33
Figura 14: Análise de dicroísmo circular da proteína <i>TcIT</i>	34
Figura 15: Frutos de cacau em diferentes estágios de maturação.....	35
Figura 16: Imunodeteção de frutos e sementes de cacau em diferentes estágios de maturação.....	35
Figura 17: Detecção do inibidor de tripsina em extratos proteicos de frutos de cacau..	36
Figura 18: Imunodeteção de inibidores de tripsina em estágio de germinação da semente de cacau..	37
Figura 19: Imunodeteção de cotilédones de cacau em germinação das variedades Catongo e TSH1188.	38
Figura 20: SDS-PAGE de diferentes tecidos do cacau.	39
Figura 21: Imunodeteção nos diferentes tecidos do cacau.	40
Figura 22: SDS-Page de extratos de proteínas totais de meristema.	41
Figura 23: Imunodeteção de inibidores de tripsina em meristema de cacau da variedade TSH1188 e Catongo..	42

1. Introdução

Os inibidores de proteases (IPs) são amplamente distribuídos no reino vegetal. Esses inibidores desempenham importante função na defesa contra patógenos e herbívoros (Jongsma & Bolter, 1997; Zavala et al., 2004). Eles formam complexos com proteases, inibindo sua atividade proteolítica e também atuam como proteína de reserva dos órgãos vegetais. (Ryan, 1990). Os IPs são classificados em várias famílias de acordo com sua estrutura e seu sítio inibitório, atualmente são descritas 67 famílias de inibidores (Rawlings, 2010). Os inibidores de serino proteases, estão entre os mais abundantes, presentes em sementes, folhas e tubérculos de várias espécies de plantas (Richardson et al., 1991; Charity et al., 1999).

Os inibidores de serino proteases podem desempenhar função endógena em respostas ambientais e durante o desenvolvimento (Huang et al., 2007). Tem sido demonstrado que danos mecânicos, ataque de insetos e infecção por microrganismos aumentam significativamente os níveis de IPs no local do ataque e de forma sistêmica (Green & Ryan, 1972; Telang et al., 2003; Hartl et al. 2010).

Os IP's de tripsina apresentam um modo de inibição do tipo competitivo, compete com o substrato pelo sítio ativo da protease. A interação enzima-inibidor ocorre de forma canônica, apresentando uma relação de muita afinidade com a protease (Bode & Huber, 2000).

Facilmente os inibidores de tripsina se ligam as proteases de modo semelhante ao substrato, por meio de uma fenda catalítica muito específica composta por uma tríade formada por serina (Ser), aspartato (Asp) e histidina (His) (Lau & Cheng, 2006; Bode & Huber, 2000). Os IP's de tripsina apresentam um sítio reativo composto por um único resíduo de aminoácido, e este fica exposto, separado de todo o arcabouço proteico, ficando livre para a ligação com a fenda da protease (Bode & Huber, 2000; Krowarsch et al., 2003).

A interação da enzima com o inibidor representa uma relação muito estável, com isso a dissociação desse complexo ocorre de forma muito lenta. Muitos estudos utilizando os dados de K_i (constante de dissociação) relatam valores muito baixos para as serino-proteases inibidas por IPs de tripsina. A constante de dissociação para o inibidor de *Acacia victoriae* é de $1,06 \times 10^{-8} \text{M}$ (Ee et al., 2011) e para inibidores de soja, que estão entre os mais bem estudados, entre $3.2-6.2 \times 10^{-9} \text{M}$ (Deshimaru et al.,

2002), esse valores indicam que a inibição ocorre de forma satisfatória, apresentando baixa dissociação do complexo.

A função mais conhecida e estudada dos inibidores de tripsina é o seu efeito na defesa da planta contra insetos (Sivakumar et al., 2005; Yuan et al., 2011; Hartl et al., 2010;), mas muitos deles estão relacionados à proteção contra infestação por microrganismos (Haq et al., 2004; Hao et al., 2010; Ruan et al., 2011). Plantas de tabaco transgênicas superexpressando um inibidor de tripsina do tipo Kunitz impediu o crescimento do fungo *Rhizoctonia solani*. (Huang et al., 2010).

Os IPs encontrados em plantas têm a capacidade de inibir enzimas endógenas, por exemplo, durante o desenvolvimento das sementes (Richardson et al., 1991), porém muitos inibidores de planta apresentam especificidade a proteases exógenas, uma vez que muitos desses inibem proteases de herbívoros e microrganismos patogênicos (De Leo et al., 2002; Jongasma & Bolter, 1997; Zavala et al., 2004).

Estudos com IPs de tripsina de planta relatam aplicações terapêuticas, como no tratamento de câncer, doenças neurológicas entre outras, essa características para os inibidores é um potencial de aplicação dessas proteínas isoladas fora do seu contexto biológico na planta. Um IPs de tripsina do trigo-mouro foi expresso em bactéria e a proteína purificada apresentou atividade anticarcinogênica (Zhang et al., 2007). Um inibidor de tripsina da batata inibiu o crescimento e induziu apoptose em células leucêmicas (Huang et al., 2007). Um inibidor de tripsina da soja mostrou-se eficaz no tratamento de inflamação pulmonar (Ribeiro et al., 2010). Esses estudos mostram que esses IPs tem características promissoras e ainda há muito a se descobrir sobre seu potencial biológico e biotecnológico.

Patentes demonstram a grande aplicabilidade econômica referente aos inibidores de tripsina como produtos biotecnológicos (Garantziotis et al., 2011; Hackeng et al., 2013). Alguns deles dão margem à obtenção de novos métodos para separação de proteínas, (Chow et al., 2005) e kits para diagnóstico de doenças (Papuashvili, 2001; Garantziotis et al., 2011).

Mais de 20 sequências de inibidores IT foram identificadas por BLAST em banco de dados de bibliotecas de cDNA de *Theobroma cacao* sequenciado pelo CIRAD (Argout et al., 2008). Em bancos de cDNA da interação *T. cacao-M. pernicioso* produzidos em nosso laboratório por Gesteira e colaboradores (2007), os inibidores de tripsina tipo Kunitz se mostraram mais abundantes na interação do patógeno com o genótipo resistente (TSH 1188).

Diante das características de inibidores de proteases de diferentes espécies, a hipótese deste trabalho é que os inibidores de tripsina do *T. cacao* devem estar associados à defesa da planta ao ataque de pragas além de participar dos processos de desenvolvimento nos diferentes tecidos da planta. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar funcional e bioquimicamente o inibidor de tripsina do cacau (*TcIT*). Com isso expressamos *TcIT* em bactéria, determinamos características bioquímicas como a cinética de inibição da proteína recombinante e a sua termomestabilidade, caracterizamos o acúmulo da proteína em sementes de cacau, além de avaliar seu acúmulo em diferentes condições de infecção ao fungo da vassoura-de-bruxa.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 O papel das proteases

As proteases assumem importante papel para a reciclagem de nutrientes nos organismos, elas clivam ligações peptídicas podendo modular a atividade de uma proteína ou degradá-la de forma irreversível. Elas podem atuar como catalisadores inespecíficos disponibilizando aminoácidos livres utilizados no metabolismo celular, entretanto, algumas proteases são agentes altamente seletivos controlando eventos fisiológicos (Page & Cera 2008).

As proteases desempenham numerosas funções nos organismos: são ativadores de zimogênios (diferentes formas da protease podendo estar nativa ou inativa), quando cliva peptídeos específicos; reconhecem sequências de aminoácidos do peptídeo sinal para o endereçamento de proteínas, no início do processo de tradução; são as proteases que retiram a metionina, etapa necessária no processamento pós traducional de muitas proteínas (Ryan, 1990).

As proteases são ferramentas utilizadas pelo organismo para vários processos biológicos, como coagulação sanguínea, diferenciação e morte celular. As serino proteases são importantes fatores responsáveis pela cascata metabólica para coagulação sanguínea. Algumas proteases também são importantes sinalizadores de vias metabólicas, como por exemplo, as caspases que são mediadoras da cascata de reação reguladora do processo de inflamação. Os primeiros relatos sobre a função de proteases foram na degradação de proteínas na digestão de alimentos, são as proteases ácidas presentes no estômago tais como a pepsina, tripsina e quimiotripsina responsáveis pela quebra de proteínas para a absorção (Buller & Townsend, 2013).

As proteases podem ser agrupadas em endopeptidases, as que clivam as ligações peptídicas internas, entre as regiões amino e carboxi terminal, e as exopeptidases que clivam ligações peptídicas dos resíduos terminais da proteína. A classificação de grupos de proteases está relacionada ao seu sítio ativo de clivagem e são nomeadas de acordo com resíduo catalítico (Rawlings & Barrett, 1993).

Os primeiros registros de proteases disponíveis em bancos de dados tiveram 600 sequências de proteases identificadas, a classificação seguia de acordo com a reação catalisada pela enzima. Até os anos de 1993 conheciam-se as aspártico-protease, serino-protease, cisteíno-protease e metalo-protease que ao invés de um aminoácido possui um

metal em seu sítio ativo (Rawlings & Barrett, 1993). Posteriormente foram descritas as proteases do tipo treonina e ácido glutâmico. As proteases do tipo treonina eram conhecidas como componentes do proteassoma. Antes esse grupo de protease representava membros multicatalíticos com atividade de tripsina e quimiotripsina (Seemuller et al., 1995). Em 2004, algumas proteases que eram encontradas apenas em fungos foram reclassificadas para compor o grupo das glutâmico-proteases (Fujinaga et al., 2004). Mais recentemente foi descrito o grupo das asparagino-proteases, descobriu-se que a ação de clivagem pela asparagina não ocorre por hidrólise mostrando uma nova forma de ação das proteases (Rawlings et al., 2011).

Para a classificação das proteases em grupos, famílias e clãs, as relações evolutivas entre elas se dão apenas por uma pequena porção na sequência de aminoácidos, sendo esta responsável pelo seu sítio ativo. Algumas dessas proteases possuem mais de um domínio conservado, entretanto esse fenômeno é pouco frequente entre as proteases (Barrett & Rawlings, 2007).

As proteases apresentam um papel crucial em vários sistemas biológicos, entretanto, sua atividade catalítica deve ser regulada. Algumas formas de regulação podem ser por modulação do zimogênio, ou, principalmente, por intermédio de inibidores proteicos, que muitas vezes atuam de maneira específica impedindo sua atividade (Ryan, 1990).

2.2 Serino Proteases

As serino-proteases são enzimas proteolíticas que apresentam afinidade para clivagem peptídica em serina (Ser), cisteína (Cys) e treonina (Tre), além de regiões ricas em histidinas (His) que aumentam a sua interação ao sítio (Page & Cera 2008). As proteases desta classe ocorrem em todos os seres vivos, porém são mais abundantes nos animais, sendo muito bem estudada quanto a sua atuação no aparelho digestivo e no pâncreas (De Leo et al., 2000).

Essas enzimas também têm um papel importante na coagulação sanguínea, na hemodinâmica (regulação da pressão arterial) e reposta à inflamação (Page & Cera, 2008). Na última década estudos mostraram a presença dessas proteases no sistema nervoso central, tanto relacionadas a doenças como também na fisiologia natural deste tecido (Almonte & Sweatt, 2011; Osterwalder et al., 1996). Anormalidades relacionadas

ao funcionamento dessas enzimas, alterações na formação da tríade catalítica, estão ligadas á doença de Alzheimer, doença de Parkinson, traumatismo crânio-encefálico e acidente vascular cerebral (Almonte & Sweatt, 2011; Fabbro & Seeds, 2009).

O sítio ativo dessas proteases apresenta uma região conservada chamada de tríade catalítica composta por serina (Ser), aspartato (Asp) e histidina (His) (Lau & Cheng, 2006; Warshel et al., 1989). A maior parte das serino-proteases utiliza um mecanismo mais simples onde Lys ou His está emparelhada com a Ser catalítica. Outras serino-peptidases mediam catálise através de novas tríades de resíduos, como por exemplo, um par de resíduos His combinados com o nucleófilo Ser (Dodson et al., 1998).

A tríade catalítica comumente encontrada nas serino-proteases é responsável pela clivagem de ligações peptídicas. Em solução aquosa a clivagem não ocorre de forma direta, apresentando dois passos, primeiro a acilação e em sequencia a desacilação. Na clivagem entre os peptídeos pela serino-protease há a formação de uma ligação de éster entre a enzima, pelo resíduo de serina protonado, e o carbono da carbonila do peptídeo, formando um intermediário acil-enzima representando a fase de acilação (Figura1). A desacilação é determinada quando a ligação de éster é hidrolisada (Buller & Townsend, 2013).

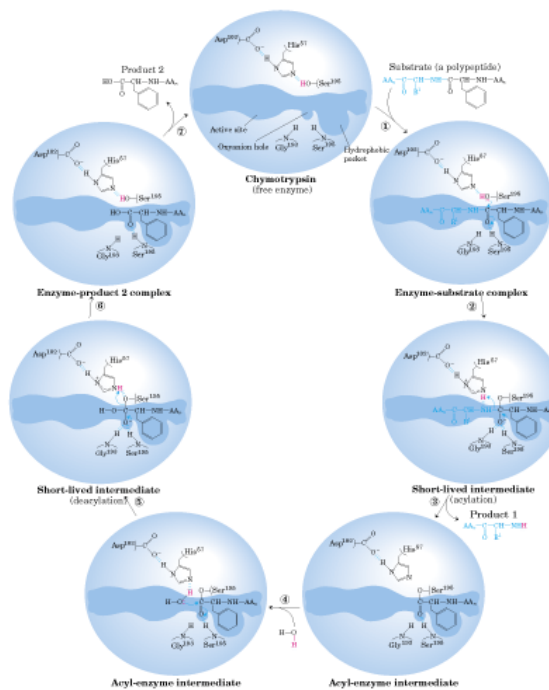


Figura 1 Etapas na clivagem de uma ligação peptídica por quimiotripsina. O substrato (um polipeptídeo ou proteína) está ligado no sítio ativo. A ligação peptídica a ser clivada está posicionado pela ligação da cadeia adjacente hidrofóbica de aminoácidos lado (um resíduo Phe neste exemplo) de uma bolsa hidrofóbica especial sobre a enzima, como mostrado. A reação consiste em duas fases: (a) a (c) a formação de uma acil-enzima intermediário covalente acoplado à clivagem da ligação peptídica. A desacilação para regenerar a enzima livre representado por d à g desacilação é essencialmente o inverso de acilação.

Dentro desse grupo de proteases estão as quimiotripsinas e tripsinas, abundantes no pâncreas, e subtilina presente em bactérias (Santos & Koblitz, 2008). A Quimiotripsina cliva entre resíduos aromáticos e a tripsina apresenta uma maior especificidade de clivagem entre resíduos de cadeia curta e carga positiva.

As serino-proteases como as demais proteases podem perder sua atividade por meio da ação IPs. A relação enzima-inibidor representa um dos mecanismos de regulação da atividade proteolítica da enzima, dessa forma torna-se importante compreender o modo de ação desses inibidores proteicos, como melhores condições de atividade, regulação da expressão, importância no metabolismo, modo de inibição, especificidade, entre outros parâmetros característicos.

2.3 Inibidores de proteases

Os inibidores são moléculas que inibem a ação das proteases, eles são importantes reguladores da atividade proteolítica da célula. Muitos pequenos inibidores atuam como fármacos sendo utilizados no tratamento de muitas doenças, alguns inibidores são conhecidos como medicamentos retrovirais, pois inibem a ação de proteases do vírus, por exemplo, como tratamentos para HIV. (Haq et al., 2004). Nas plantas os inibidores têm um papel fundamental de defesa contra ataque de patógenos (estresse biótico) como também de fatores abióticos, esses inibidores fazem parte da defesa bioquímica.

Os primeiros a propor um tipo de classificação para os inibidores de proteases relacionavam os inibidores com as proteases e o tecido em que se encontravam ou ao micro-organismo (Laskowski & Kato, 1980). Para descrever uma forma de organizar grupos de inibidores foi desenvolvido um sistema em que as unidades inibitórias dos inibidores de proteases eram atribuídas com base em semelhanças detectáveis ao nível da sequência de aminoácidos (Rawlings et al., 2004). Agrupar uma grande variedade de IP's não é uma tarefa muito fácil, pois um único tipo de inibidor pode apresentar características estruturais bem diferentes e apenas o sítio de inibição conservado (Krowarsch et al., 2003.).

De acordo com dados do MEROPS atualmente existem 67 famílias agrupadas de acordo com a similaridade de sequências, 38 clãs de acordo com a comparação da estrutura terciária. Comumente sempre há modificações e reagrupamentos de inibidores

devido às novas descobertas (Rawlings, 2010). A classificação e agrupamento de IP's começaram em 2004 com Rawlings e colaboradores. Assim como para as proteases, as relações entre os inibidores de um clã estão de acordo com a estrutura terciária, mesmo que a comparação de suas sequências de aminoácidos não apresente alguma similaridade significativa (Rawlings, 2004).

Muitos inibidores apresentam multidomínios. Para as proteases a presença de multidomínio é algo pouco comum, porém para inibidores essa propriedade é frequente em algumas famílias. A presença de multidomínios pode aparecer em *tandem* (repetições de um mesmo tipo inibitório), ou domínios variados, cada um responsável por uma atividade diferente. Com a presença de domínios variados para uma mesma proteína torna-se difícil classificá-las em um grupo específico, devido a isso, cada domínio representa uma família diferente, essa proteína acaba possuindo várias classificações (Rawlings, 2010). Inibidores do tipo Kazal, um pequeno inibidor de serino-protease, geralmente apresenta repetições de domínios em *tandem*, alguns contendo até 20 repetições, presentes em uma única cadeia polipeptídica (Li et al., 2009). Nos inibidores da família BBI a característica marcante é a presença de duas regiões homólogas, referentes ao domínio inibitório, cada uma responsável por inibir uma protease simultaneamente (Bode & Huber, 2000).

2.4 Inibidores de serino-proteases

Os IPs de serino-proteases são classificados em superfamílias como a do tipo Kunitz, Bowman-Birk, batata I, batata II, cevada, cereal, Ragi A1 e Taumatina (Haq et al., 2004). Os inibidores do tipo Kunits são os mais conhecidos e estudados, presentes principalmente em leguminosas, contém poucos resíduos de cisteína, geralmente quatro formando duas pontes de dissulfeto e o tamanho varia de 18 a 24 kDa (Mello et al., 2001). Esses inibidores são os mais abundantes em espécies de plantas, principalmente em leguminosas e acumula-se principalmente nas sementes (Richardson, 1991). Esses inibidores estão associados à resistência das plantas contra ataque de patógenos, interferindo no desenvolvimento da praga e na sua proliferação (Ryan, 1990).

Embora o efeito desses inibidores contra os insetos sejam bastante estudados, eles também relatam sua atividade contra a proliferação de fungos, considerando que eles atuem contra a proteólise da parede celular (Huang et al., 2010).

Do ponto de vista nutricional, inibidores de serino-proteases (tripsina e quimiotripsina) são comumente encontrados em alimentos vegetais e têm sido estudados extensivamente devido ao seu papel prejudicial na alimentação humana e animal. Estudos mostram que o inibidor de tripsina da soja é responsável pela diminuição de 23% na absorção de aminoácidos sendo considerado um fator antinutricional (Gilani et al., 2005; Dia et al., 2012). Um inibidor de serino-protease do trigo foi identificado como uma das proteínas relacionadas aos fatores alergênicos nos padeiros (Constantin et al., 2008).

Mesmo com algumas relações arbitrárias aos inibidores de serino-protease, há muito mais vantagens agronômicas associadas com o estudo desses inibidores, entre outras aplicabilidades, como no uso de ferramentas biotecnológicas no uso terapêutico contra doenças humanas.

2.4.1. Mecanismo de inibição dos IPs de serino-proteases

Os mecanismos de inibição para os IP's de serino-proteases podem ser distinguidos em três tipos: canônico, não canônico e serpinas (Krowarsch et al., 2003). A interação do tipo canônico representa a inibição competitiva, onde o inibidor interage com o sítio ativo da enzima de modo semelhante ao mecanismo de interação da enzima com o substrato. A afinidade do inibidor com a fenda catalítica da enzima é muito grande tornando o complexo enzima-inibidor bem estável e de difícil dissociação.

A interação não canônica está relacionada ao tipo de inibição secundária, ou seja, o inibidor interage com porções carboxi ou N-terminais das proteases modulando de forma transitória a atividade catalítica da enzima. Esse tipo de inibição é muito rara para os inibidores de serino-proteases. Os inibidores do tipo serpinas apresenta um tipo de interação similar à interação canônica, porém o complexo enzima-inibidor não é estável. Quando ocorre a interação do *loop* de inibição com a fenda catalítica o *loop* desloca em um ângulo de 70° dissociando o complexo (Loebermann et al., 1984).

A estrutura de inibição é considerada um *loop* convexo que fica exposto ao solvente e se encaixa perfeitamente a fenda catalítica da enzima que se apresenta como estrutura côncava. O *loop* de inibição consiste em uma formação em âncora com um peptídeo central (o resíduo P1) ligado a dois peptídeos laterais (P3-P3') (Figura 2). O peptídeo central corresponde ao sítio inibitório, nos inibidores de tripsina esses resíduos

em sua maioria representa uma arginina (Arg) e em alguns casos uma lisina (Lys) (Laskowski et al., 2000).

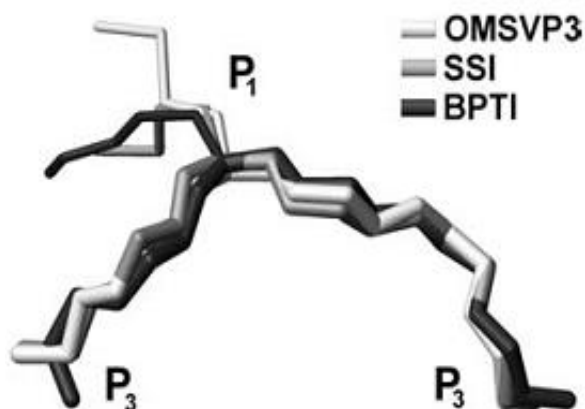


Figura 2: Sobreposição de três resíduos inibitórios do inibidor de tripsina. P₁ - resíduo central inibitório; P₃-resíduos adjacentes (Krowarsch et al.2003)

Os resíduos adjacentes do loop de inibição são responsáveis por interações secundárias com a enzima, dessa forma esses resíduos também influenciam na energia de ligação enzima-inibidor proporcionando uma maior estabilidade ao complexo. O resíduo inibitório faz a interação principal com a enzima, mas os resíduos laterais são cruciais para o enrijecimento do complexo potencializando a capacidade inibitória (Buczek, 2002; Majumder et al., 2012).

Esse mecanismo de interação entre o inibidor da planta com a protease animal formando um complexo estável não se aplica a interação entre inibidor-enzima endógeno, a ligação peptídica do resíduo inibidor permanece quase intacta (Bode & Huber, 1992).

Os inibidores de serino-protease do tipo serpinas, apresenta um tipo de inibição transiente, em que o modo de inibição se assemelha ao tipo canônico, porém o complexo enzima-inibidor não é estável, ou seja, se dissocia rapidamente. (Bode & Huber, 2000; Krowarsch et al., 2003).

Os inibidores canônicos representam o mais claro exemplo de evolução convergente entre grupos de proteínas, uma vez que o *loop* inibitório apareceu varias vezes ao longo da evolução em proteínas não relacionadas (Figura 3). Dessa forma os inibidores podem apresentar estruturas diferentes, mas estarem relacionados devido ao tipo de sítio inibitório conservado entre eles. Essa relação é frequente nos inibidores de serino-proteases (Laskowski et al., 2000).

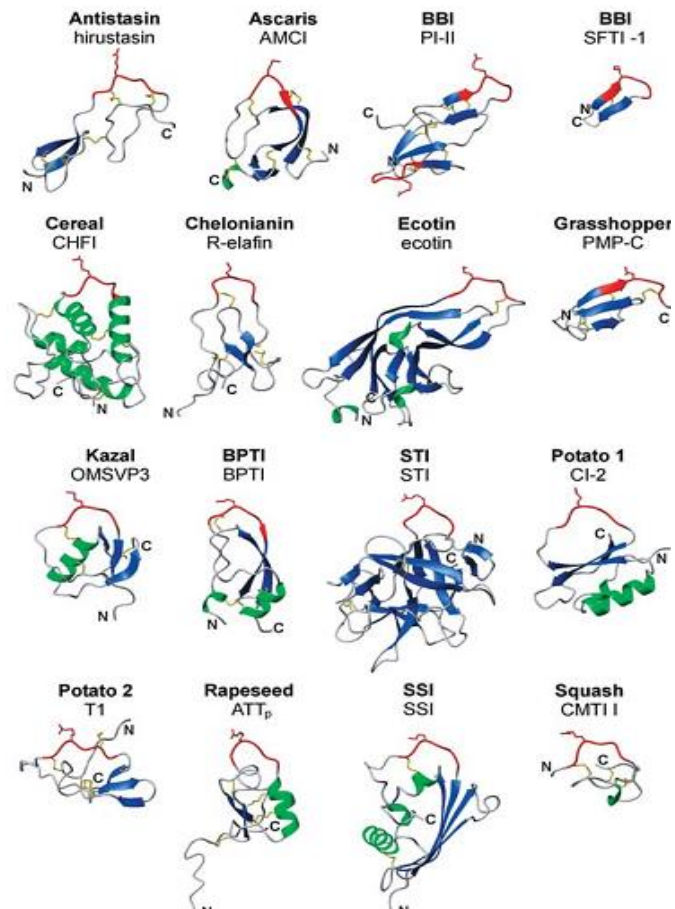


Figura 3: Diferentes estruturas de inibidores de tripsina. Algumas famílias mais estudadas estão sendo representadas, o resíduo inibitório (*loop* em vermelho) entre elas apresenta-se conservado entre elas. (Krowarsch et al.2003)

2.5 Inibidores do Tipo Kunitz

Inibidores Kunitz são os mais conhecidos e estudados entre os inibidores de tripsina, estão largamente distribuídos nas plantas e são concentrados principalmente em sementes de leguminosas, contém poucos resíduos de cisteína, o tamanho varia de 18 á 24 kDa (Mello et al., 2001). O inibidor de tripsina foi o primeiro a ser estudado e caracterizado por Kunitz (1947a,b) isolado da semente de soja e passou a ser chamado por inibidor de tripsina do tipo Kunitz.

A maioria das proteínas pertencentes à família kunitz possuem um padrão estrutural contendo duas ligações de cisteína (Cys-Cys) formando duas pontes dissulfeto em uma única cadeia polipeptídica de aproximadamente 20 kDa. Entretanto algumas variações relacionadas a quantidades de ligações de cys-cys têm sido descritas. Os inibidores de Kunitz podem ser classificados em quatro grupos de acordo com o seu

conteúdo de cisteína, entre eles estão os que não apresentam Cys, os com um resíduo, os com dois e os com mais de dois. (Oliva et al., 2010). Essas variações não implicam em uma modificação significativa da estrutura tridimensional da proteína, para as proteínas que não possuem resíduos de cisteína a conformação é mantida por ligações de hidrogênio.

Em soja os inibidores de tripsina apresentaram um alto grau de polimorfismo, podendo um mesmo gene apresentar uma variação de inibidores do tipo Kunitz, essa variação de inibidores são alelos codominantes presentes em um único locus, já foram descritas algumas variedades para o inibidor de tripsina do tipo Kunitz (Lee et al., 2012), entre eles os variantes mais contrastantes são do tipo Tia e Tib com nove resíduos de aminoácidos diferentes entre eles (Wang et al., 2008). Em cultivar de soja já foram descritas 12 variedades de inibidores do tipo Kunitz entre eles os denominados Tia, Tib, Tid, Tic, Tie, Ti-null, Tif, Tibi5, Tiaa1, Tiaa2, Tiab1, e Tig (Wang et al., 2008; Lee et al., 2012). Essas variações genéticas para o inibidor de tripsina da soja se tornaram boas ferramentas no estudo evolutivo desse cultivar (Krishnamurthy et al., 2013).

Diferentes formas de inibidores tipo Kunitz apresentaram diferentes níveis de atividades inibitórias, essas relações alelo específico ajudaria a comunidade científica a selecionar características agrônômicas, como por exemplo, com o aumento a resistência à praga e demais estresses ambientais (Lee et al., 2012).

Em estudos para investigar a filogenia do gênero *Theobroma* foi utilizado o gene do inibidor de tripsina do cacau, devido a sua abundância em sementes, cerca de 54 % de proteínas totais, mostrando que esse gene apresenta relações evolutivas entre grupos de plantas (Silva & Figueira, 2005).

Além da variedade genética dos inibidores de tripsina, há uma variação desses inibidores relacionados por diferentes isoformas. Em sementes de acácia foram identificados três isoformas do inibidor com uma diferença mínima de peso e carga (pI) oriundos de modificações por glicosilação (Ee et al., 2011). Mais ainda, em ervilhas foi detectado uma grande variedade de isoformas, cerca de 10 iso-inibidores identificados em uma extensa faixa de pI, entre 4.6-7.6 (Morrison et al., 2007).

2.6 Funções dos inibidores de tripsina

A interação planta-patógeno persiste ao longo da evolução, não deixará de ser uma luta constante. Compreender os mecanismos envolvidos é de fundamental importância, para o controle de pragas agrícolas, pois facilitará o desenvolvimento de cultivares mais resistentes a diversas doenças, indicando um meio de controle menos invasivo (Franco et al., 2004; Jongsma & Bolter, 1997).

Nas plantas a inativação da protease por IP's ocorre de forma reversível e é considerado seu principal mecanismo de defesa (Santos & Koblitz, 2008). Lesões mecânicas nas folhas, ataques de insetos e infecção por microrganismos aumentam significativamente os níveis de IP's no local do ataque e de forma sistêmica (Green & Ryan, 1972; Telang et al., 2003; Hartl et al., 2010).

A função mais conhecida e estudada dos inibidores de tripsina é o seu efeito na defesa da planta contra insetos (Sivakumar et al., 2005; Yuan Ma et al., 2011; Hartl et al., 2010), mas muitos deles estão relacionados à proteção contra infestação por microrganismos (Haq et al., 2004; Hao et al., 2010; Ruan et al., 2011). Plantas de tabaco transgênicas superexpressando um inibidor de tripsina do tipo Kunitz impediu o crescimento do fungo *Rhizoctonia solani* (Huang et al., 2010).

Muitos estudos independentes têm revelado que ocorre um aumento da expressão de inibidores de serino-proteases em resposta a estresse abiótico, isso é relatado sob déficit hídrico e altas de temperatura (Yang et al., 2011), bem como na presença de metil jasmonato, um fitohormônio sempre presente no momento de estresse (Hartl et al., 2010). Em estresse salino por cloreto de sódio em tomate foram identificados inibidores de serino-protease II (Dombrowski, 2003).

Os IP's encontrados em plantas têm a capacidade de inibir enzimas endógenas, durante o desenvolvimento das sementes, e também podem inibir atividade de protease exógena, formando complexos estáveis (Richardson et al., 1991). Alguns inibidores de planta apresentam especificidade a proteases exógenas, uma vez que muitos desses inibem proteases de herbívoros e micro-organismos patogênicos (De Leo et al., 2002; Jongsma & Bolter, 1997; Zavala et al., 2004). Entretanto, em relações de mutualismo entre plantas e insetos, o inibidor de tripsina de uma espécie de acácia não inibe a protease da espécie de formiga mutualista, mas inibe fortemente as proteases dos insetos generalistas que visitam a planta, mostrando também que a falta de especificidade a um

tipo de protease representa um tipo de proteção se tornando uma alternativa de defesa para plantas que apresentam relações de mutualismo (Tamayo et al., 2013).

Alguns IP's de tripsina possuem atividade bifuncional, ou seja, inibe também proteases de outras classes, a especificidades frente às enzimas proteolíticas variam consideravelmente, uns tem atividade contra tripsina e quimiotripsina, e outros inibem proteases de outras famílias como cisteíno- e aspártico-proteases, dentre outras. Esses inibidores podem apresentar sítio de inibição menos específico e sua atividade pode estar suprindo a necessidade por outros inibidores (Oliveira et al., 2007; Roy & Dutta, 2009). Em olho-de-pavão (*Adenantha pavonina*) o inibidor de tripsina inibe a atividade de -serino e cisteíno-proteases (Migliolo et al., 2010).

Além das atividades de defesa, outros papéis biológicos têm sido reconhecido aos IP's de tripsina. Comumente encontrados em tecidos de reserva como sementes e tubérculos, tem a função de prevenir a degradação proteolítica dos tecidos (Ryan, 1990). Alguns estudos indicam que IP's de tripsina podem estar envolvidos nos processos de regulação da germinação, com papel de alongamento do epicótilo e radícula (Jimenez et al., 2007), morte celular programada no processo de diferenciação vascular e xilogenese em grão de bico (Nistal et al., 2009). Nas flores foi relatado aumento da expressão de IP's de tripsina no início do desenvolvimento floral e logo após a polinização (Sin & Chey; 2004).

Alguns estudos com inibidores relatam novas aplicabilidades fora do contexto de sua ação endógena no metabolismo da planta. Um IT de trigo-mouro foi expresso em bactéria e a proteína purificada apresentou atividade anticarcinogênica (Zhang et al., 2007). Um inibidor de tripsina de batata inibiu o crescimento e induziu apoptose em células leucêmicas (Huang et al., 2007). Inibidores de cisteíno-protease foram imobilizados e utilizados como armadilhas na captura de proteases (Pirovani et al., 2009). Assim, estes inibidores podem constituir ferramentas para a caracterização de novas proteases e isto pode ser muito relevante, uma vez que mais de 10 % das proteases codificadas pelos genomas das plantas são caracterizadas (Van der Hoorn, 2008). Esses estudos mostram que esses IP's têm características promissoras e ainda há muito a se descobrir sobre seu potencial biológico e biotecnológico.

3. Materiais e Métodos

3.1 Análise da sequência TcIT por bioinformática

A sequência nucleotídica completa da ORF do inibidor de tripsina do cacau foi obtida em banco de dados da biblioteca EST's de cacau (Argout et al., 2008), acessada por <http://esttik.cirad.fr/>, a sequência foi separada a partir do contig KZ0ACR1YI20FM1, esse gene foi denominado TcIT. A sequência de aminoácidos foi deduzida utilizando a ferramenta de bioinformática da plataforma Expsy Translate tool (<http://au.expsy.org/tools/dna.html>) e a identificação do peptídeo sinal por Signal P 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Para reconhecimento de domínios conservados foi utilizado o Pfam, e para identificação de possíveis sítios de glicosilação utilizou-se YinOYang (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>). Para desenhos dos primers utilizou-se o programa WebCutter Orf Finder (http://pga.mgh.harvard.edu/web_apps/web_map/start) que gerou um mapa de restrição indicando o local de sítios de clivagem no gene.

3.1.1 Alinhamento e análise filogenética:

Para as análises de alinhamento de sequência foi utilizado o programa BioEdit fazendo a comparação entre as sequências por ClustalW. Esse alinhamento foi usado para a construção da árvore filogenética pelo programa Mega utilizando o método de neighbor-joining. As sequências analisadas para a formação da árvore filogenética foram provenientes de sete sequências de genes para o inibidor de tripsina encontrados no banco genômico do cacau Cirad. Os sete genes do cacau foram alinhados por Blast utilizando o ExpsyBlast (<http://web.expsy.org/blast/>), a partir dessa análise foram selecionadas sequências de outras proteínas homólogas acima de 80% de similaridade para a construção da árvore filogenética.

3.1.2 Modelagem

A inferência sobre a estrutura da proteína foi utilizado o servidor do Swiss-Model através do software Swiss Pdb Viewer v.3.7 (<http://swissmodel.expsy.org/>) (Peitsch, 1997; Schwede, 2009), baseado em alinhamento estrutural e satisfação de restrições espaciais. A estrutura pdb utilizada na comparação foi a 3iir de um inibidor da semente de curry indiano (*Murraya koenigii*) (Gahloth et al., 2010).

A estrutura tridimensional pdb gerada por homologia para o *TcIT* foi validada utilizando o Mordred (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) e o Procheck 3.4/ Anolea (Laskowski et al., 1993; Melo & Feytmans, 1997; Melo & Feytmans, 1998). Esses programas geraram o gráfico de Ramachandran e outras análises estereoquímicas dos resíduos.

3.2. Clonagem de *TcIT* Recombinante

O primer forward desenhado foi denominado de *TcITNdeIF* e possui a sequência 5'GGTAGCCAGACCATATGGAATCTCCGGTG 3', gerando o sítio de clivagem para a enzima *NdeI*. O primer reverso (antisense), *TcITXho1R*, com a sequência 5' CCTCCACCCTCGAGCAAGACTCTG 3', possui sítio de clivagem para *XhoI*. Esses primers anelam no gene excluindo o peptídeo sinal, flanqueando um fragmento de 741 pb entre as bases 115 e 820 do cDNA. O fragmento do gene foi amplificado por PCR, utilizando como DNA molde o clone KZ0ACR1YI20FM1 do banco de EST's do CIRAD. Este clone foi obtido a partir de bibliotecas de plântulas de um híbrido produzido em Papua e Nova Guiné, como resultado do cruzamento 17/3-1 × 36/3-1 (Argout et al., 2008). A reação de PCR foi realizada com ~30 ng de DNA molde, 5 µL de tampão de reação 10X, 3 µL de dNTP (0,2 mmol.L⁻¹ de cada nucleotídeo), 3 µL MgCl₂ 25 mol.L⁻¹, 10 pmoles de cada primer; 0,2 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas) em um volume final de 50 µL. O programa utilizado para amplificação continha 40 ciclos (94 °C por 30 segundos, 55 °C por 40 segundos e 72 °C por 1 minuto) com fase de terminação de 72 °C por 5 minutos e 15 °C para estocagem. Após a PCR, o fragmento amplificado foi purificado com o PCR Purification Kit (Fermentas) e em seguida, digerido com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. A clonagem ocorreu em vetor pET-28a digerido com as enzimas *NdeI* e *XhoI* e o plasmídeo recombinante foi inserido por choque térmico em células competentes da estirpe de *E. coli* [Rosetta (DE₃)], conforme Sambrook et al., (1989). O esquema de clonagem segue conforme demonstrado na Figura 1.

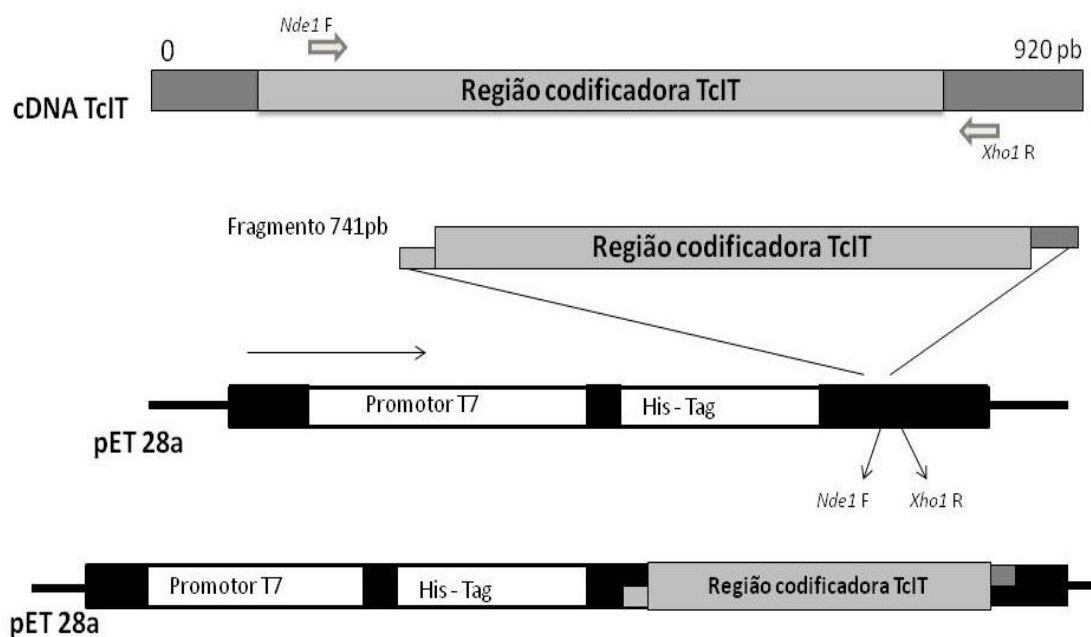


Figura 4: Mapa físico da clonagem de TcIT. A sequência completa de TcIT indica um fragmento de 920pb. A região flanqueada pelos primer's gera um fragmento de 741pb. Esse fragmento foi inserido no sítio de clonagem do vetor pET 28a.

3.2 Expressão e purificação de TcIT Recombinante

A cultura de *E. coli* transformada com o plasmídeo recombinante foi cultivada em meio LB (Luria-Bertani), incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir OD (densidade ótica) entre 0,5-0,7 nm. A expressão foi induzida mediante a adição de 0,4 $\eta\text{mol.L}^{-1}$ de IPTG (Isopropil beta-D-Tiogalactosídeo). Após a etapa de indução a cultura de células foi centrifugada a 10000 g e o precipitado ressuspensão com tampão de ligação e lisozima 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ por 30 min, esse extrato total de bactéria foi sonificado por 20 s intercalado com 30 s de repouso no gelo para resfriamento, utilizando o parâmetro amplitude 70 % em ultrassonicador (Pgex 30) até que perdesse a viscosidade promovendo o rompimento total das membranas. O material lisado foi centrifugado à rotação de 13000 g, 4°C por 10 min, o sobrenadante foi utilizado para a purificação no cromatógrafo Äkta Purify (GeHealthCare) por cromatografia de afinidade líquida utilizando coluna de níquel HisTrap FF crude (GeHealthcare). A proteína recombinante que possui uma cauda de histidina foi eluída com o aumento da concentração de imidazol. As frações coletadas foram submetidas à diálise contra tampão fosfato 500

mmol.L⁻¹, pH 7,4. A proteína purificada foi quantificada pelo método de Bradford 1976, usando albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

3.3 Teste para atividade inibitória de *TcIT*

Para a determinação da curva de inibição uma diluição em série foi preparada para o inibidor *TcIT* partindo de uma concentração inicial de 55 µmol.L⁻¹ e transferindo 900 µl em sequência para tubos contendo 180µl de tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,4, totalizando uma serie de 11 tubos. Em triplicata a alíquota de cada série foi incubada com 10 µl de tripsina suína (Sigma©) a 0,5 mg.mL⁻¹ por 15 mim á 37°C, em seguida foi adicionado 200 µl do substrato BApNA (benzoilarginina-p-nitroanilid-dimetil-sulfóxido de sódio) 1,2 mmol.L⁻¹. A atividade residual da enzima foi medida através da hidrólise do substrato cromogênico (BapNA) com leitura a 410 nm, a cada 15 mim, durante 1h, em espectrofotômetro de microplacas VersaMax (Molecular Devices). As leituras foram monitoradas pelo programa Softmax Pro 4.8 (Molecular Devices).

A percentagem de 100 % da atividade residual de tripsina foi determinada a partir das leituras do controle (sem inibidor), a atividade para as demais concentrações do inibidor foi revelada em detrimento do controle.

$$\% \text{ inibição} = [(\Delta\text{ABS410 SI} - \Delta\text{ABS410 CI}) / \Delta\text{ABS410 SI}] \times 100$$

Em que: $\Delta\text{ABS410 SI}$ corresponde à variação da absorvância a 410 nm na ausência de inibidor e, $\Delta\text{ABS410 CI}$ corresponde à variação da absorvância a 410 nm na presença do inibidor.

3.4 Teste para termoestabilidade de *TcIT*

Alíquotas da proteína *TcIT* recombinante a 7 µmol.L⁻¹ foram incubadas á temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C por 10 mim. Alíquotas em triplicata foram colocadas com um volume de 20 µl de cada tratamento térmico em placas de ELISA, onde foi adicionado 10 µl de tripsina suína (Sigma©) 0,5 mg.mL⁻¹ para incubação a 37 °C por 15mim. Depois disso, foi acrescentado 200 µl de substrato BApNA 1,2 mmol.L⁻¹ em todos os tratamentos. A análise da hidrólise do substrato cromogênico seguido com os mesmos parâmetros de leitura realizado para a curva de inibição (seção 3.3). Os

cálculos para atividade residual em diferentes temperaturas seguiu conforme realizado para a curva de inibição, sendo a reação controle a mesma quantidade de inibidor sem o tratamento térmico, estipulada como 100% da atividade inibitória.

3.5 Determinação da constante de inibição K_i

A constante de inibição (K_i) foi obtida utilizando substrato em diferentes concentrações. O ensaio foi realizado em triplicata para três concentrações finais do Inibidor TcIT, sendo de 0 $\eta\text{mol.L}^{-1}$ o controle positivo (tampão fosfato 50 mmol.L^{-1} pH7,4), 66 $\eta\text{mol.L}^{-1}$ e 133 $\eta\text{mol.L}^{-1}$, para isso foi adicionado 20 μL de TcIT 800 $\eta\text{mol.L}^{-1}$ e 1600 $\eta\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente, para um volume final de reação de 240 μL . O inibidor de tripsina (TcIT) foi incubado com 20 μL de tripsina suína (0,5 mg.mL^{-1}) por 15 min á 37 °C, em sequência, volumes de 30, 40, 50, 60, 80, 110, 140, 200 μL de BApNA 0,5 mmol.L^{-1} foi adicionado a reações com o volume final ajustado para 240 μL . A leitura da placa seguiu conforme determinado para a curva de inibição.

Os dados de absorbância obtidos para cada concentração foram representados graficamente. A velocidade da reação (V_o) foi determinada dividindo a absorbância por hora, assim foi possível determinar o efeito do substrato na velocidade inicial da reação, podendo-se, então, calcular a velocidade máxima (V_{max}) da reação e a constante de Michaelis-Menten (K_m). A partir desses valores o gráfico do duplo recíproco foi determinado, sendo $y = 1/V_o$; $x = 1/S$; a declividade (a) = K_m/V_{max} ; e o intercepto $b = 1/V_{\text{max}}$. Para determinação do K_i a fórmula utilizada foi $K_i = [I] / (K_m/K_{mi}) - 1$, onde, K_{mi} corresponde à média de K_m para as duas concentrações de inibidor e K_m corresponde ao valor da constante de Michaelis-Menten sem a presença do inibidor.

3.6 Obtenção do soro imune à proteína TcIT

A produção de anticorpos em coelho foi feita de forma similar à realizada por Pirovani et al., 2010. O imunógeno utilizado para imunização de coelhos foi a proteína TcIT recombinante. Três imunizações foram feitas, com aproximadamente 500 μg de proteína à 0,6 mg.mL^{-1} cada, em intervalos de 20 dias. Para a primeira imunização, a solução de proteína foi homogeneizada com igual volume de adjuvante “Freund’s” completo (GIBCO/BRL) e para as imunizações posteriores, foi utilizado o adjuvante

“Freund’s” incompleto (GIBCO/BRL). As imunizações foram feitas por meio de injeções aplicadas nos músculos posteriores das patas traseiras do animal e via intramuscular na região dorsal do animal. O soro pré-imune (controle) foi coletado antes da primeira imunização e as frações de antissoro imune a TcIT foram coletadas a cada 20 dias após a segunda imunização. As coletas do sangue para isolamento do soro foram feitas por pequenas incisões em vasos sanguíneos periféricos na orelha do coelho. As frações de antissoro coletadas foram testadas por meio de “immunoblottings”.

3.7 Imunodeteção de inibidores de tripsina em frutos de cacau em diferentes estágios de desenvolvimento

Frutos de cacau de seis estágios de desenvolvimento foram coletados na cabruca, localizada na Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, município de Ilhéus-Bahia. Para frutos mais desenvolvidos foram retiradas as sementes para a impressão direta em membrana de nitrocelulose. As sementes foram seccionadas no sentido do seu maior diâmetro e a superfície do corte foi pressionada sobre a membrana umedecida com tampão de transferência (3 g de Tris; 14,4 g Glicina; 200 ml metanol para 1 L de solução) em triplicata. Para os frutos mais jovens, a impressão na membrana foi realizada diretamente com o fruto seccionado ao meio no sentido transversal ao seu maior diâmetro. Parte do material vegetal foi separado para ser liofilizado e utilizado na extração de proteínas. A membrana "carimbada" foi bloqueada com leite desnatado a 2,5 % em TBS-T (Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹ pH 7,6, NaCl 140 mmol.L⁻¹ e Tween-20 0,1 % v/v), na sequência foi utilizado o protocolo para western blot de acordo com Sambrook and Russell (1989). Duas membranas foram preparadas, uma foi tratada com o antissoro e a outra com o soro pré-imune, durante o western blot.

3.8 Imunodeteção em cotilédones em diferentes estágios de germinação

Sementes de duas variedades de cacau, TSH 1188 (resistente) e Catongo (suscetível) foram plantadas em casa de vegetação da UESC. A cada intervalo de 10 dias de germinação foram coletados os cotilédones de cada variedade. Os cotilédones foram seccionados no sentido longitudinal e pressionados sobre a membrana de

nitrocelulose umedecida em tampão de transferência, esse procedimento foi chamado de ‘print’.

Com a semente antes de germinar também foi realizado o ‘print’, essa etapa foi contada como o tempo inicial. Nos estágios de 50 e 60 dias não foi possível realizar o ‘print’, pois os cotilédones já estavam desmanchando quando manuseados. Após recolher todos os estágios, as membranas carimbadas com os cotilédones foram submetidas ao processo de Western Blot, e os cotilédones utilizados em cada estágio foram separados para extração de proteínas totais.

3.9 Imunodeteção em diferentes tecidos do cacau

Diferentes tecidos do cacau foram coletados em uma mesma planta de cacau escolhida aleatoriamente na cabruca da UESC. Órgãos vegetais como as hastes caulinares, flores, meristema, casca de fruto jovem, folha jovem verde (10 dias de maturação), folha jovem avermelhada (5 dias de maturação), folha madura, semente de fruto jovem e cotilédone com 20 dias de germinação foram selecionados para extração de proteínas totais. A extração de proteínas foi feita segundo o método de Pirovani et al. 2008. Essas amostras foram quantificadas com o 2D Quant Kit e submetidas a separação por eletroforese com massas normalizadas para 4 µg de proteínas totais. As proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose em um sistema Mini Protean II Xi cell (Bio-RAD) de acordo com recomendações do fabricante, para análise do acúmulo comparativo do inibidor entre diferentes tecidos.

3.10 Imunodeteção em meristemas infectados e sadios

Para análise do acúmulo de inibidores IT em meristemas de cacau infectados pelo fungo *M. perniciosa*. Duas variedades de cacau foram selecionadas para o experimento, sendo Catongo a variedade suscetível e TSH1188 a variedade resistente.

Após 30 dias de germinação da semente de cacau, 240 mudas foram selecionadas para cada variedade e mantidas em casa de vegetação da CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira). Um total de 120 mudas de cada variedade foram separadas para inoculação com uma suspensão de $2.10^5 \times \text{mL}^{-1}$ de

basidiocarpo (*M. pernicioso*) (Surujdeo-Maharaj et al., 2003) mantidas por 24 horas em câmara úmida a 25 °C, essa aclimação permitiu a germinação dos esporos de *M. pernicioso*, penetração e, conseqüentemente, a infecção da planta (Schmidt et al., 1995). O grupo de mudas não inoculadas também foram mantidas sobre as mesmas condições para serem usadas como controle.

Os “meristemas” (segmentos de 2-3 cm) foram coletados 1, 5, 45 e 60 dias após a inoculação. Para cada etapa eram coletados entre 10-20 meristemas, sendo identificados na casa de vegetação e mantidos em nitrogênio líquido para o transporte até o laboratório de proteômica na UESC.

O material vegetal foi liofilizado para extração de proteínas totais segundo o protocolo de Pirovani et al., (2008). O extrato proteico foi quantificado com o 2D Quant Kit (GeHealthcare), de acordo com as recomendações do manual do fabricante, e suas concentrações foram normalizadas para a análise do acúmulo da proteína estudada pela técnica de Western Blot. As bandas foram quantificadas pelo software Gel.Quant 3.1

3.11 Análise de TcIT em Dicroísmo Circular (CD)

A proteína TcIT, foi submetida a análise de CD em espectropolarímetro J-815 (JASCO). A proteína utilizada na análise foi purificada de extrato de *E. coli*, sendo posteriormente dialisada em Tampão fosfato 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4, para obter uma proteína completamente livre de sal, dessa forma evitando algum tipo de interferência nas análises.

Para identificar a presença de conformações secundárias foi realizada uma varredura com uma variação de espectro de 150-250 nm, em cubetas de quartzo de 1 mm. Os dados foram coletados com velocidade de varredura de 50 nm.min⁻¹ e intervalo de dados de 0,5 nm. As leituras foram realizadas com temperatura de 26 e 96 °C após 5 min de incubação de TcIT sob a mesma temperatura de leitura, para as análises foi utilizada a média dos espectros de três medições consecutivas de varredura. Após essa análise foi realizado o *foldin* e *refoldin* tratados a uma variação de temperatura entre 26-96 °C e vice-versa. A temperatura da câmara da cubeta foi controlada pelo sistema Peltier PTC-423S/15. O programa utilizado foi o Spectra Manager (JASCO) e os dados foram tratados utilizando o programa Origin Pro 8.0 (OriginLab Corporation).

4. Resultados

4.1 Análise da sequência de *TcIT* indica um inibidor do tipo Kunitz

A análise da sequência do inibidor de tripsina identificado na biblioteca de EST's de *Theobroma cacao* (Argout *et al.*, 2008) revelou uma sequência aberta de leitura com 660 pb, codificando uma proteína com 219 aminoácidos, com massa molecular e ponto isoelétrico estimados de 23.96 kDa e 5.71, respectivamente (Tabela 1). A análise da sequência de aminoácidos predita com o programa Signal P 3.0 revelou a presença de um peptídeo sinal com sítio de clivagem entre A26 e D27 (Figura 5). A massa molecular e o ponto isoelétrico preditos para a proteína após a clivagem do peptídeo sinal foram 21.14 kDa e 5.15, respectivamente (Tabela 1). A proteína livre do peptídeo sinal apresenta quatro possíveis sítios de O-glicosilação, correspondentes a T61, T28, T29 e S158 (Figura 5).

A análise da sequência de aminoácido pelo programa Pfam mostra que *TcIT* possui um motivo do tipo kunitz com 20 aminoácidos compreendidos entre V21 e V50 sublinhados, conforme mostrado na Figura 5.

Tabela 1 Predição de parâmetros de *TcIT*. Número de aminoácidos, Tamanho teórico e ponto isoelétrico.

<i>TcIT</i>	Número de resíduos de aminoácidos	kDa	pI
Inteira	219	23.96	5.71
Processada	193	21.14	5.15

```
1 *
MKTATAVLLLLFAFTSKSYFFGVARADESPVLDSGDDELRTGVEYYVVSATWGA
GGGGLALGRVTGQSCPEIVVQRGSDDDGLPVIFSNADGKDGVVRLSTDVNIIEFV
PIRDRLCLTSTVWKLDDYDPSTGKWWVTTDGVKGDPGHNTLTSWFKIEDAGVLG
YKFRFCPSVCDSCIHLCDNFGRHGHGQVRLALSENGWPWIFKKARNSIKQVVN
AKH
219
```

Figura 5: Sequência de aminoácidos de *TcIT*. A sequência em negrito refere-se ao peptídeo sinal, predito com o software Signal P 3.0. Sublinhado encontra-se a região conservada para inibidores do tipo kunitz. As estrelas acima dos aminoácidos indicam os possíveis sítios de glicosilação.

4.2 Análise do gene *TcIT* no genoma do cacau

Uma busca com a sequência EST's referente à *TcIT* da biblioteca de Argout et al., (2008) no Banco de dados do Cirad (Argout et al., 2011) detectou sete proteínas com alta similaridade. Três dessas proteínas são codificadas por genes (*Tc02_g004560*, *Tc02_g004570* e *Tc02_004580*) que se encontram no cromossomo *Tc02*, situados em localizações próximas. De acordo com o local de início e término da sua sequência (Tabela 2) é possível inferir que eles se encontram em tandem. No cromossomo *Tc05*, foram detectados os dois genes localizados em tandem (Tabela 2) referentes à proteína miraculina (*Tc05_g020940* e *Tc05_g020950*), que é um inibidor de tripsina tipo Kunitz, porém apresentando uma função adicional, como a mudança do sabor doce para azedo.

O gene *Tc00_p042540* apresentou maior similaridade com a sequência blastada (*TcIT*, Gesteira et al., 2007). De acordo com as proteínas (inibidores de tripsina) encontradas no banco genômico do cacau (Argout et al., 2011) nenhuma apresentou 100 % de similaridade com *TcIT*, isso indica que o gene que codifica esta proteína encontra-se em uma região cujo genoma que não foi completamente sequenciado.

Tabela 2: Resumo do Alinhamento de *TcIT* (Argout et al., 2008) e o banco genômico do cacau (Argout et al., 2011). Sete sequências de genes mostraram semelhança com o *TcIT*.

LocusID	E-Value	%Identity	Query Coverage	Chromosome	Start	End	Function
<i>Tc02_p004580</i>	1E-32	50	67,12	<i>Tc02</i>	2518154	2520342	<i>Tc02_g004580</i> Putative Proteinase inhibitor Kunitz legume
<i>Tc02_p004560</i>	9E-29	40,27	98,63	<i>Tc02</i>	2503157	2504318	<i>Tc02_g004560</i> Putative 21 kDa seed protein
<i>Tc00_p042540</i>	2E-91	76,92	100	<i>Tc00</i>	45986162	45986827	<i>Tc00_g042540</i> 21 kDa seed protein
<i>Tc05_p020940</i>	4E-30	44,69	81,28	<i>Tc05</i>	18817759	18818355	<i>Tc05_g020940</i> Miraculin
<i>Tc00_p067240</i>	4E-64	59,72	98,17	<i>Tc00</i>	71826415	71830962	<i>Tc00_g067240</i> 21 kDa seed protein
<i>Tc02_p004570</i>	1E-47	47,98	98,63	<i>Tc02</i>	2507015	2507674	<i>Tc02_g004570</i> 21 kDa seed protein
<i>Tc05_p020950</i>	9E-35	42,31	94,52	<i>Tc05</i>	18821095	18834094	<i>Tc05_g020950</i> Miraculin

As regiões dos domínios Kunitz apresentaram-se conservadas em cacau, exceto para o gene *Tc02_g004580* apresentando identidade abaixo de 11% (Figura 6). A proteína *TcIT* apresenta alta similaridade com os genes *Tc00_67246* (88,24%) e *Tc00_g042540* (82,35%), esses mesmos genes não foram mapeados no genoma do cacau. Com o domínio kunitz da soja, *TcIT* apresentou 55,56% de semelhança.

Os três genes do cromossomo *Tc02* apresentaram similaridades diferentes entre si, sendo os genes *Tc02_g004560* e *Tc02_g004570* com 77,78 % de similaridade, no entanto não ocorreu similaridade significativa para o outro gene (*Tc02_g004580*)

também na sequência em tandem, com menos de 11%. Portanto, este último deve ter sido resultado de uma duplicação mais antiga.

Os genes em tandem do cromossomo Tc05 (Tc05_020940 e Tc05_02950) apresentam 88.89% de semelhança, sendo os mais parecidos entre os genes de inibidor de tripsina do *Theobroma cacao*.



Figura 6: Alinhamento do domínio conservado Kunitz de TcIT os demais genes encontrados na biblioteca do cacao (Argout et al 2011). As cores de cada aminoácido representam identidade ou similaridade entre eles, na última linha encontra-se o domínio kunitz do inibidor de tripsina da soja.

A análise de agrupamento filogenético com a sequência de proteínas de outros grupos de plantas mostra que os genes referentes aos inibidores de tripsina do cacao se agruparam em três ramos diferentes (Figura 7).

A proteína TcIT apresentou alta similaridade com inibidores de espécies do mesmo gênero *Theobroma* e com um gênero similar, *Herrania*. A proteína do banco genômico do cacao mais semelhante com TcIT foi referente ao locus Tc00_p067240 e um pouco mais distante do locus Tc00_g042540, porém no mesmo ramo (Figura 7).

Os produtos dos genes do cromossomo Tc02 ficaram agrupados no mesmo ramo apresentando 99 % de identidade e mais próximo ao TcIT que os produtos dos genes do cromossomo Tc05.

Os produtos dos genes referentes à miraculina (Tc05_g020940 e Tc05_020950) situados no cromossomo Tc05 no genoma do cacao ficaram agrupados em um ramo distante dos demais genes do cacao. Além disso, IT's do tipo kunitz miraculina de outras espécies ficaram agrupados com os genes referentes à miraculina do cacao, apresentando alta similaridade devido à características conservadas em suas sequencias.

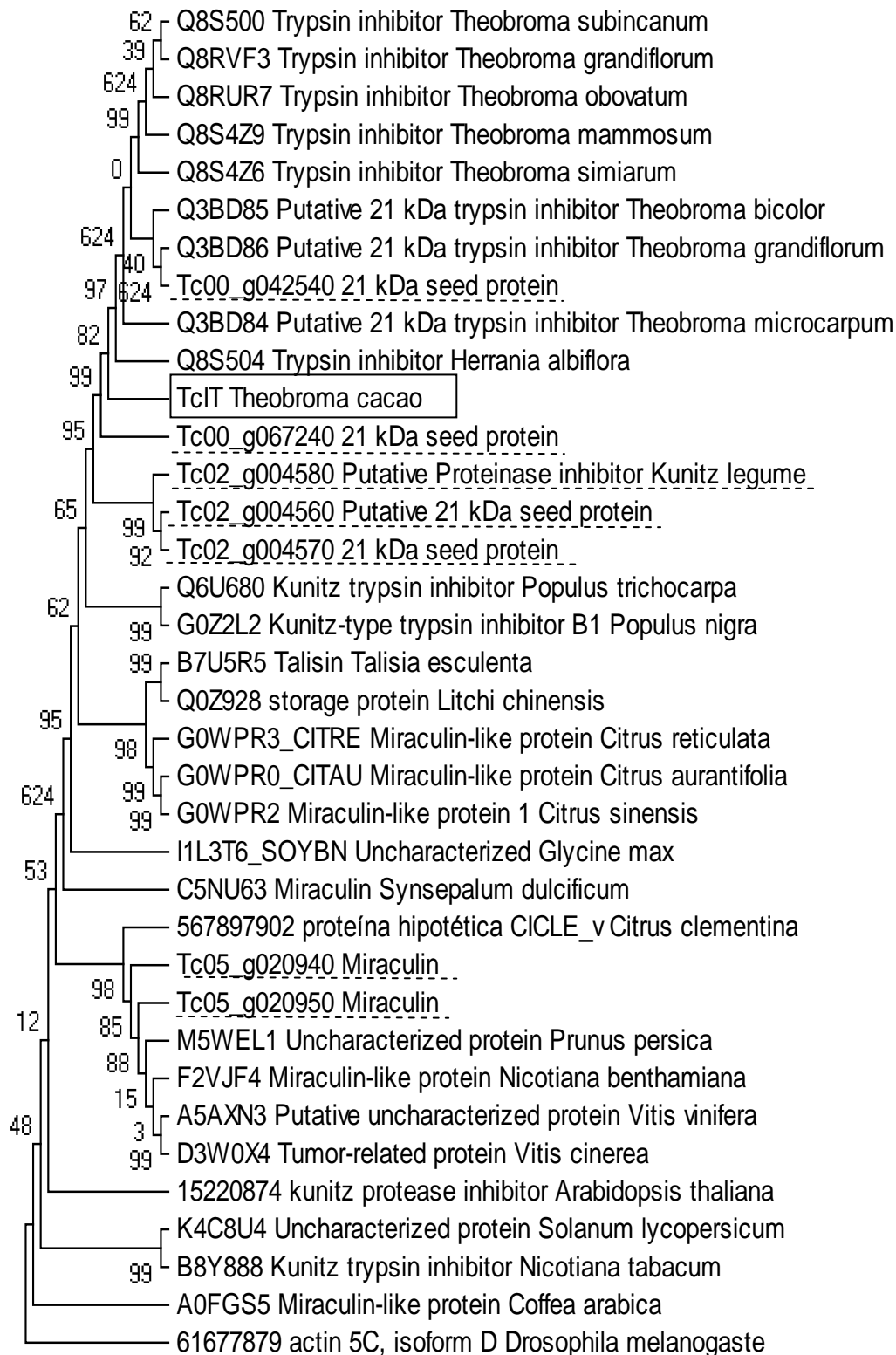


Figura 7: Árvore Filogenética construída de acordo com a similaridade de TcIT com outro inibidores. No quadrado se encontra o TcIT. Sublinhados estão os demais genes para o inibidor de tripsina do tipo Kunitz encontrados no banco genômico do cacau.

4.3 Análise estrutural por bioinformática

A análise comparativa da estrutura de *TcIT* com outros inibidores possibilitou prever a sua conformação. A proteína apresenta doze regiões de folhas-beta antiparalelas e uma pequena torção em alfa conformação, essa proteína apresenta um *loop* inibitório indicado na figura (Figura 8).

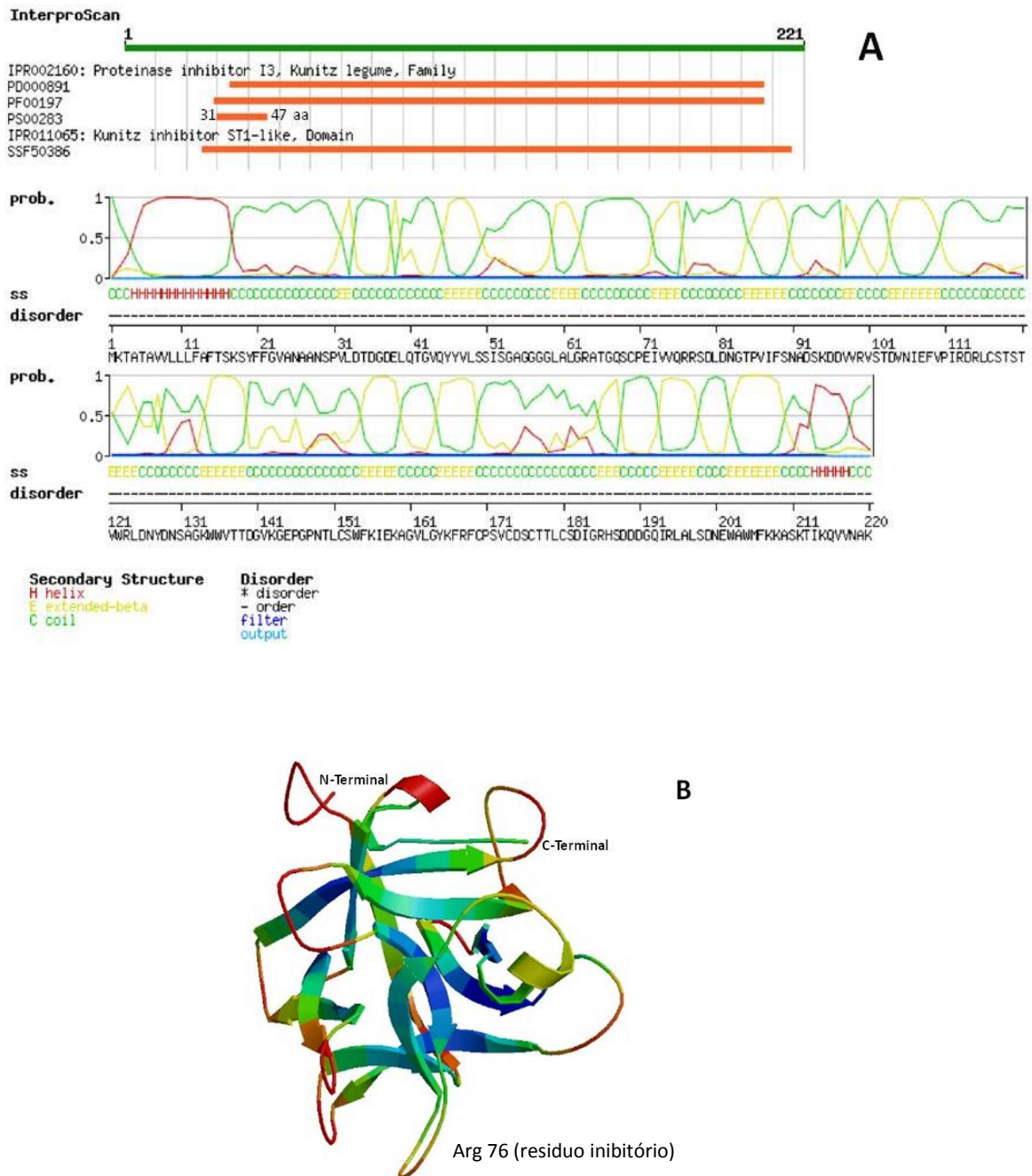


Figura 8: Análise de conformação e modelagem de *TcIT*. A figura A mostra o domínio conservado entre os resíduos 31 e 47, abaixo se encontra o gráfico com picos de diferentes cores representando possíveis conformações. Vermelho indica a presença de alfa hélice; Amarelo as conformações em Beta; Verde representa outros dobramentos. A figura B indica a possível estrutura tridimensional da proteína modelada mostrando predominância em folhas beta.

A análise de domínios conservados mostra sobreposições entre sequências de inibidores com o mesmo tamanho, referentes ao inibidor tipo 3 de tripsina da soja. A análise também mostrou a região do motivo Kunitz presente na sequência, referentes à porção entre o resíduo 31 ao 47 (Figura 8 A). O gráfico (Figura 8 A) mostra que há uma conformação desordenada na região do peptídeo sinal, representada pelo pico inicial vermelho. A abundância de picos verdes e amarelos mostra que essa proteína é livre de conformações em alfa-hélice, com predominância de betas conformações (Figura 8 A e B). A modelagem da proteína, realizada sem a porção do peptídeo sinal, mostrou dominância de folhas betas antiparalelas, com a maioria dos resíduos bem definidos representados em azul na estrutura (Figura 8 B).

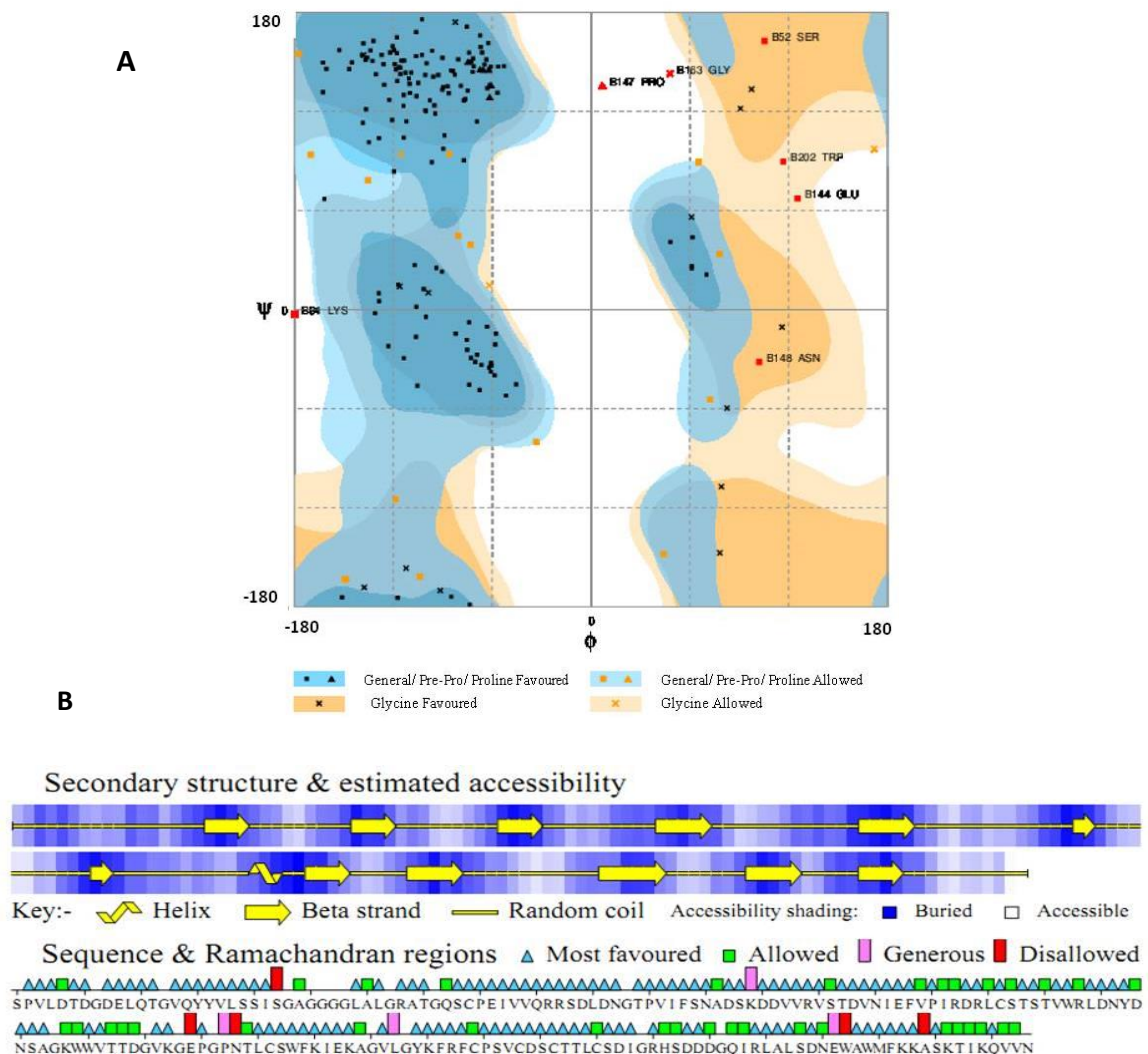


Figura 9: Análise de Ramachandran para a estrutura pdb de TcIT. A figura A mostra o gráfico de Ramachandran, indicando a distribuição dos resíduos em regiões favoráveis e desfavoráveis. A figura B mostra as relações de estruturas secundárias e análise de resíduos mais favoráveis, permitidos, possíveis e desfavoráveis indicadas na figura.

Segundo o gráfico de Ramachandran para esse modelo (Figura 9), foi possível observar a maioria dos resíduos dentro de uma porção considerada confiável para o modelamento da estrutura, pois o modelo apresentou 96,9 % de confiabilidade. Indicando que os resíduos encontram-se em uma região energeticamente favorável e o limiar de uma boa modelagem deve ter acima de 90 % de resíduos favoráveis. Para a modelagem de *TcIT* esse limiar encontra-se dividido em 73 % dos resíduos nas regiões mais favorecidas; 22,1 % em regiões adicionais autorizadas; 1,8 % dos resíduos em regiões generosamente permitidas e apenas 3,1% dos resíduos encontram-se em regiões não permitidas. A figura 9 B mostra com detalhes os resíduos que apresentaram conformações favoráveis. Apenas cinco resíduos foram considerados desfavoráveis e quatro foram generosamente favoráveis.

4.4 A proteína *TcIT* é produzida na fração solúvel do extrato de *E. coli*

Para caracterizar a proteína *TcIT*, um fragmento do cDNA de 741 pb foi clonado e a proteína foi obtida por meio de expressão em bactéria. A análise do extrato proteico total da *E. coli* induzida com IPTG revelou uma banda de aproximadamente 23 kDa (Figura 10A, linha IT), diferencial em comparação com o extrato das células transformadas com o plasmídeo pET28a sem inserto (Figura 10A, linha pET).

A indução de *TcIT* em *E. coli* por 4 horas, a 37 °C, com 0,4 $\eta\text{mol.L}^{-1}$ de IPTG mostra uma abundante produção da proteína recombinante na fração solúvel do extrato bacteriano (Figura 10A, F. solúvel - linha IT). A proteína foi purificada com 100% de homogeneidade a partir da fração solúvel do extrato bacteriano, por meio de cromatografia de afinidade da cauda de histidina (HisTag), proveniente da sequência presente no vetor de expressão (Figura 10 B, linhas de 1 a 4).

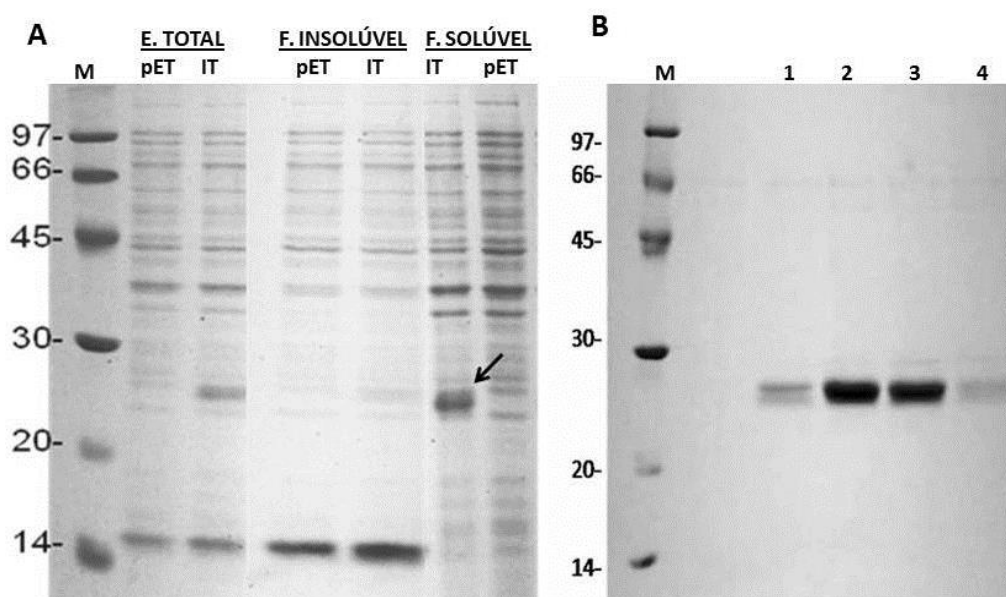


Figura 10: Expressão de *TcIT* recombinante. A- Análise de extratos proteico total e de frações solúvel e insolúvel: pET corresponde à bactéria transformada com o plasmídeo pET-28a sem inserto; IT corresponde ao extrato proteico do clone transformado com o plasmídeo recombinante. A banda apontada pela seta corresponde à proteína *TcIT* recombinante de 23 kDa. M corresponde a um padrão de massa molecular em kDa, cujos valores são indicados à esquerda da figura. B- Purificação da proteína recombinante em HPLC: 1, 2, 3 e 4 correspondem às frações coletadas durante a eluição da proteína com concentrações crescentes de imidazol.

4.5 *TcIT* recombinante é ativo e inibe tripsina suína

O inibidor *TcIT* purificado foi incubado com a tripsina suína (Sigma) por 10 minutos antes dos ensaios com o substrato cromogênico (BApNA). A *TcIT* recombinante produzida em sistema heterólogo é ativo, pois a atividade residual da tripsina é reduzida de forma acentuada com o aumento da concentração do inibidor no meio de reação (Figura 11). A redução da atividade de tripsina foi maior até a concentração de $0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do inibidor (aproximadamente 70%). O aumento da concentração do inibidor de $0,5$ a $1,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ reduziu em aproximadamente 12% a atividade da enzima (Figura 11).

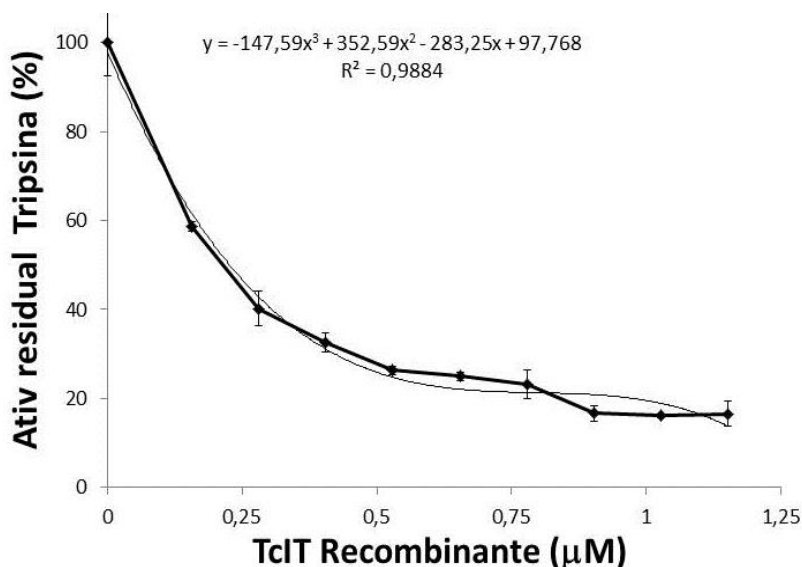


Figura 11: Atividade residual da tripsina. O eixo da abscissa representa a variação na concentração do inibidor *TcIT* recombinante, no eixo das ordenadas a atividade residual da tripsina em percentagem. Alíquotas de tripsina de concentração fixa foram incubadas com as diferentes concentrações do inibidor.

4.6 *TcIT* é estável à variação de temperatura de até 60 °C

O *TcIT* foi submetido a teste de termoestabilidade por incubação por 10 min em temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C. *TcIT* apresentou tolerante a tratamentos térmicos até a temperatura de 60°C (Figura 12).

O tratamento a 70 °C conferiu uma diminuição no percentual de inibição, no entanto ainda manteve mais de 90% da atividade inibitória. A exposição a 80°C promoveu uma queda de 40% na atividade de inibição. Esta informação é relevante para estudos aplicados com o inibidor para indústria de alimentos. *TcIT* perde totalmente a sua capacidade de inibição quando tratado a 90°C, indicando a completa desnaturação da proteína (Figura 12).

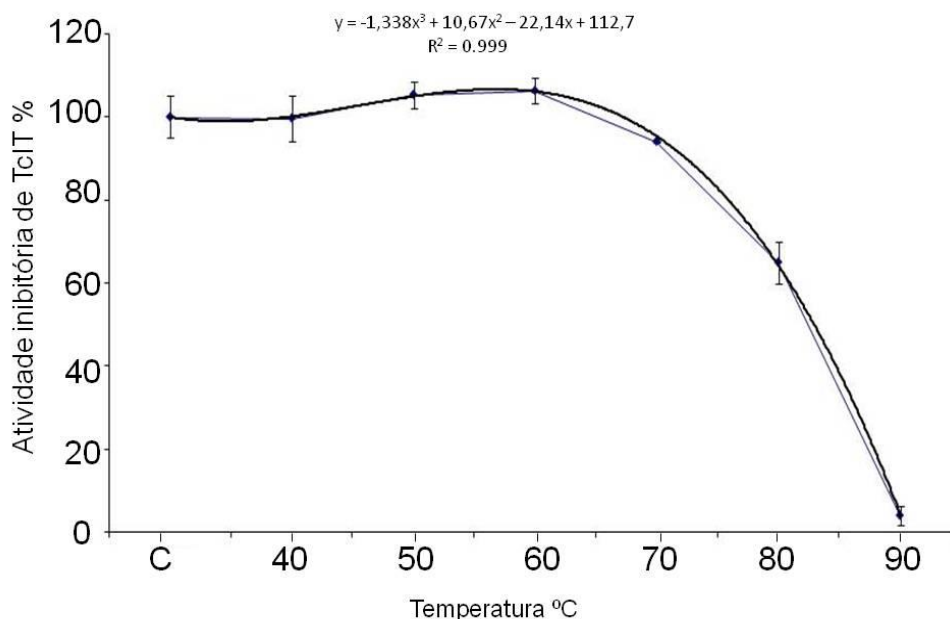


Figura 12: Termostabilidade de TcIT sob diferentes temperaturas. Alíquotas do inibidor TcIT foram expostas por 10 min às temperaturas indicadas na figura. C, representa a reação controle realizada à 37°C. O eixo Y representa a porcentagem de atividade inibitória de TcIT dada em comparação com a reação controle. A proteína TcIT é estável a tratamentos térmicos até a temperatura de 60 °C, mantendo 100 % de atividade inibitória.

4.7 TcIT apresenta inibição do tipo competitiva

Para determinação do K_i foi necessário determinar a velocidade máxima da reação (V_{max}) e a constante de Michaelis-Menten (K_m). Os valores de V_{max} para as concentrações de inibidores determinadas no experimento foram de $6,23 \text{ mmol.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ sem a presença do inibidor e com a presença do inibidor foi de $6,22$ e $5,86 \text{ mmol.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para as concentrações de $66,6$ e $133,3 \text{ } \mu\text{M}$, respectivamente. Para os valores de K_m observou-se uma variação considerada entre eles, apresentando valores de $1,23$; $1,42$ e $1,59 \text{ mmol.L}^{-1}$ para a concentração de menor para maior valor indicado no gráfico (Figura 13).

De acordo com o modelo do duplo-recíproco a inibição estabelecida por TcIT é do tipo competitiva (Figura 13), uma vez que o intercepto entre as curvas ocorrem sobre o eixo da ordenada, indicando alteração de K_m e alteração desprezível de V_{max} .

A constante de inibição (constante de dissociação do inibidor), K_i , determinada a partir do modelo do duplo-recíproco, foi de $408,09 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ para a tripsina suína na presença do substrato BApNA (Figura 13).

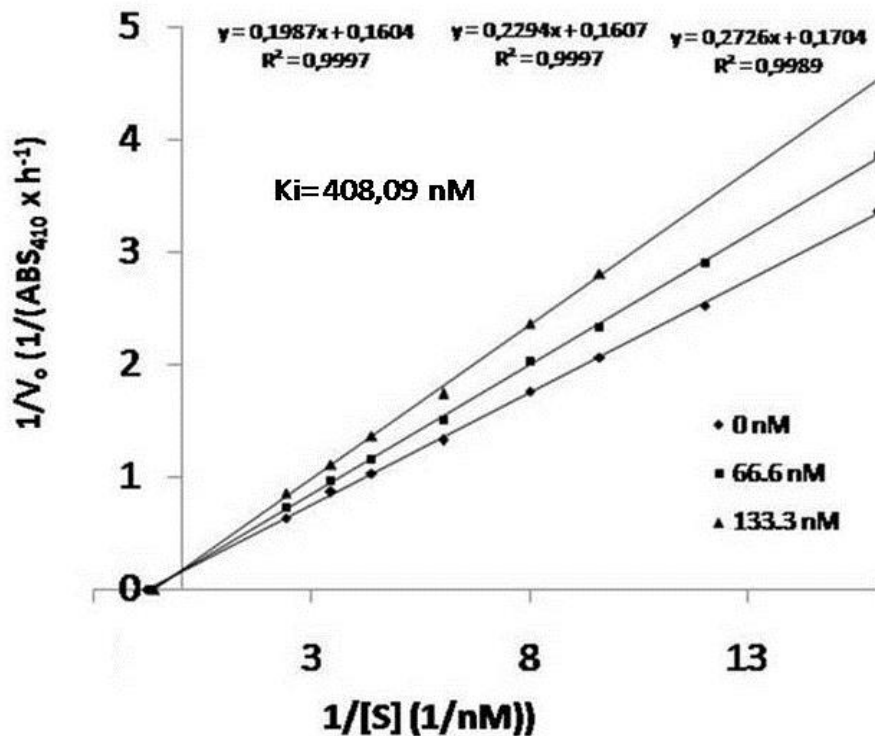


Figura 13: Modelo do duplo-recíproco para a inibição de TcIT sobre a Tripsina, em competição com o substrato BApNA. Ambas as curvas interceptam o eixo y no mesmo ponto indicando que a Vmax não é alterada pelo inibidor. As concentrações do inibidor TcIT são indicadas na figura.

4.8 TcIT do tipo Kunitz indica conformação padrão de folhas-β

Nas análises de conformações de estruturas secundárias feitas por dicroísmo circular foi possível detectar por varredura presença de folhas-β indicadas pelo pico negativo em 220 nm. A análise de varredura foi realizada em duas temperaturas estipuladas de 26 °C e 96 °C para mostrar variação de estrutura sob temperatura de desnaturação. O espectro realizado a 96 °C manteve praticamente o mesmo padrão do espectro a 26 °C, ou seja, apresentou o mesmo tipo de pico negativo aos 220 nm indicado pela linha pontilhada do gráfico (Figura 14).

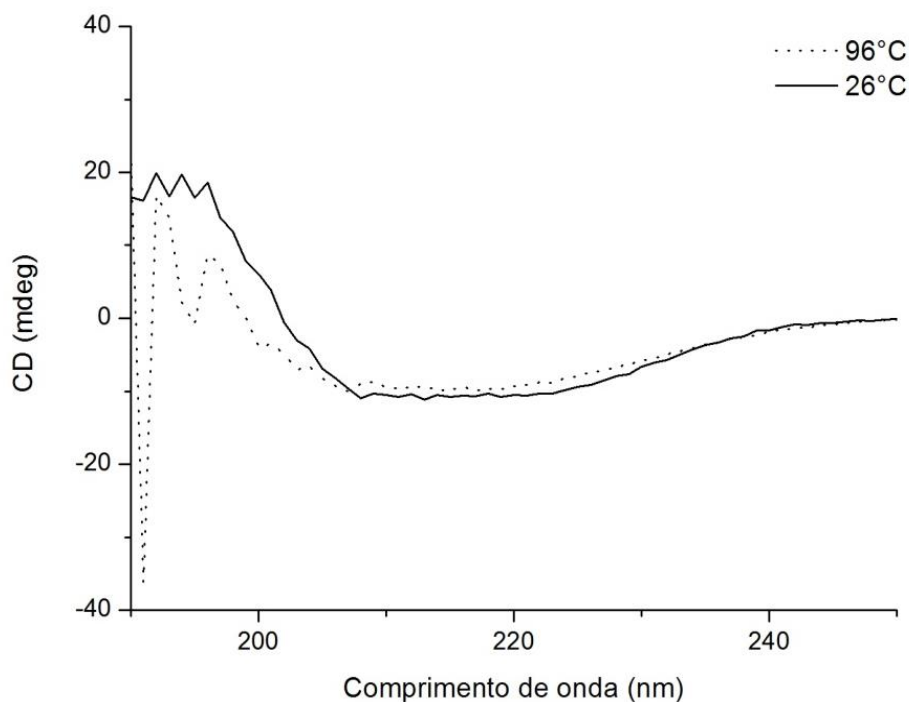


Figura 14: Análise de dicroísmo circular da proteína *TcIT*. A varredura ocorreu entre os comprimentos de onda de 150-250 nm, a linha pontilhada mostra o perfil de varredura aos 96 °C, na linha contínua a varredura aos 26 °C.

4.9 Imunodeteção de *TcIT* em diferentes estágios do fruto e semente de cacau

O acúmulo de *TcIT* foi analisado em frutos e sementes em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 15). A técnica empregada foi a imobilização de proteínas por meio do contato direto do fruto na membrana de nitrocelulose umedecida com o tampão de transferência (contendo metanol e SDS). As membranas foram preparadas em réplica sendo uma tratada com o soro pré-imune e à outra com o antissoro (Soro imune) (Figura 15).

O soro pré-imune não apresentou reação cruzada com a membrana. As manchas observadas correspondem à impregnação de compostos oxidados na membrana, uma vez que a coloração não corresponde à esperada para o produto da reação da fosfatase alcalina sobre os substratos NBT e BCIP presentes na solução de revelação.

O resultado para o contato das sementes e dos frutos jovens de cacau foi positivo para todos os estágios, sendo que, para o fruto em estágio intermediário do desenvolvimento o inibidor de tripsina mostrou-se mais abundante na casca em comparação com a parte interna do fruto contendo as sementes nos estágios iniciais de desenvolvimento (Figura 16, linha 2). A figura 16, linha 3 mostra uma distribuição

homogênea do inibidor em todo o fruto, indicando o início do seu acúmulo nas sementes.

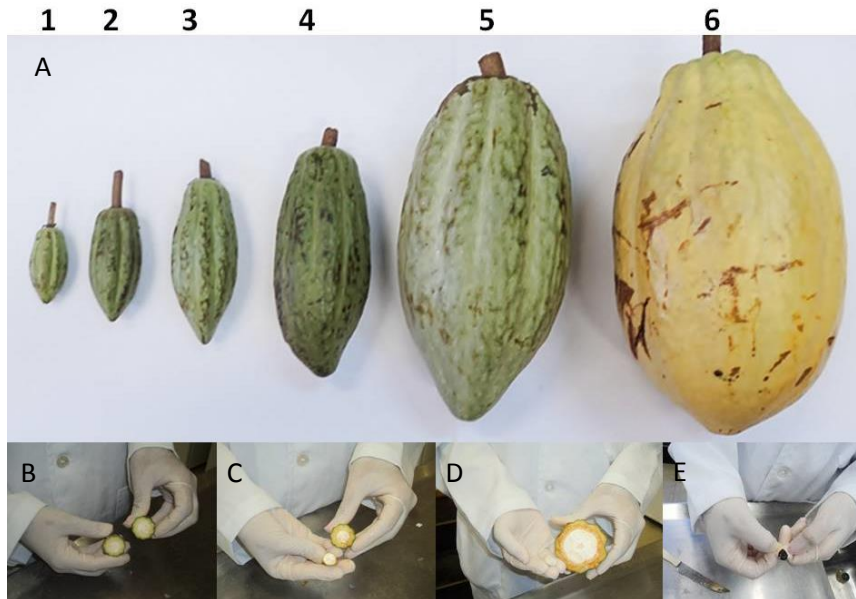


Figura 15: Frutos de cacau em diferentes estágios de maturação. A- Frutos escolhidos para o experimento. B- Fruto estágio 1 foi realizado um corte transversal. C- frutos 2,3 e 4; para o print foi retirada toda a casca deixando apenas o miolo mostrando o corte transversal. D- Fruto 5; foi retirada a semente jovem em estágio de formação e realizado um corte transversal. E- Fruto 6; foi retirada semente madura e realizado o corte transversal.

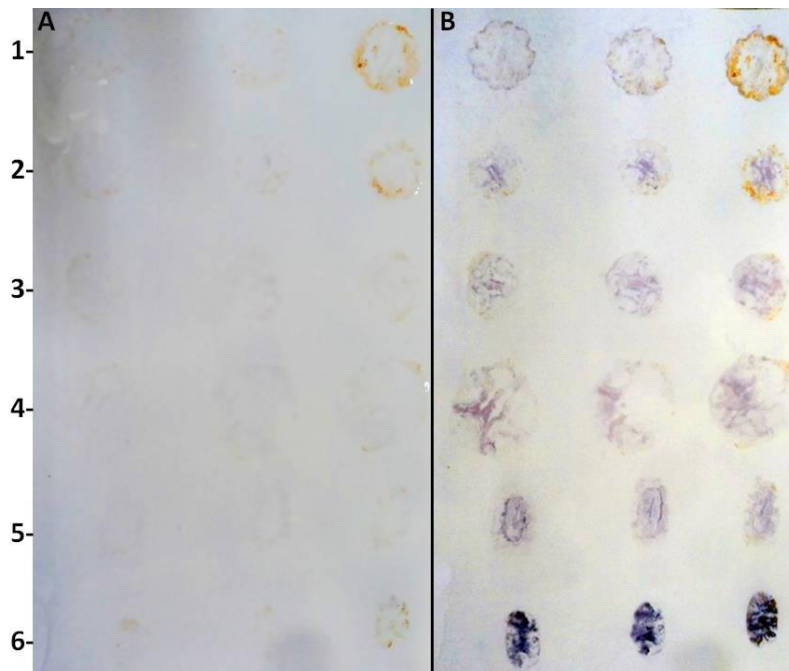


Figura 16: Imunodeteção de frutos e sementes de cacau em diferentes estágios de maturação. Lado A representa a membrana hibridizada com o soro pré-imune. Lado B, membrana hibridizada com soro imune a TcIT. A membrana apresenta triplicata do print de cada estágio. Nos estágios de 1 a 4 foi utilizado o fruto seccionado e de 5 a 6 a semente foi seccionada e colocadas em contato com a membrana.

O aumento do acúmulo mostrado nas linhas 4, 5 e 6 da figura 16, indicam que o inibidor está sendo produzido e acumulado na semente em desenvolvimento. O extrato proteico total dos frutos e sementes analisados na figura 15 foi separado em SDS-PAGE e submetido a western blot usando o antissoro ant-*TcIT* recombinante como sonda. Uma banda única na faixa de 24 kDa foi detectada nos últimos estágios do desenvolvimento da semente (Figura 17, linhas 5 e 6). A banda detectada nos extratos de semente apresentou migração similar à proteína recombinante *TcIT*.

O resultado da figura 16-B não foi muito similar com o relatado para a imunodeteccção do tecido na membrana (Figura 17), uma vez que ocorreu a deteccção do inibidor somente para os estágios 5 e 6, sendo esperada também deteccção para o estágio 4, o que não ocorreu, (Figura 17).

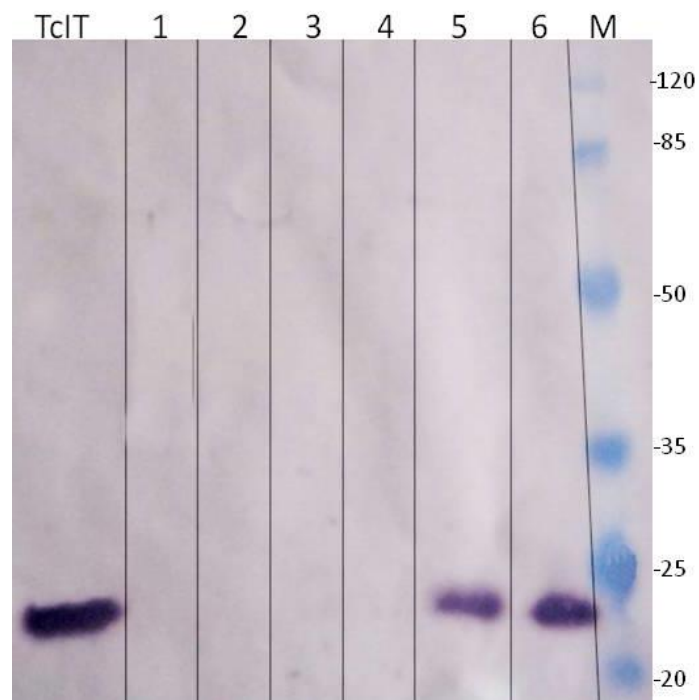


Figura 17: Detecção do inibidor de tripsina em extratos proteicos de frutos de cacau. Os números de 1 a 6 são referentes a extratos proteicos dos estágios representados na figura 13; TcIT é a proteína recombinante considerada como controle; M, o marcador de peso molecular, cujo tamanho estão representados ao lado.

4.10 *TcIT* é detectado nos diferentes estágios de germinação da semente

Os estudos de imunodeteccção também foram empregados para elucidar a presença de inibidores de tripsina do cacau em estágios de germinação da semente, foi realizada a impressão dos cotilédones, conforme descrito na metodologia.

Seis estágios de germinação foram determinados a intervalo de quatro dias de embebição da semente. Em todos os estágios determinados para o estudo foi detectada a presença do inibidor de tripsina (Figura 18), mostrando que esses inibidores podem estar presentes nos cotilédones de *T. cacao* em estágios mais avançados de germinação.

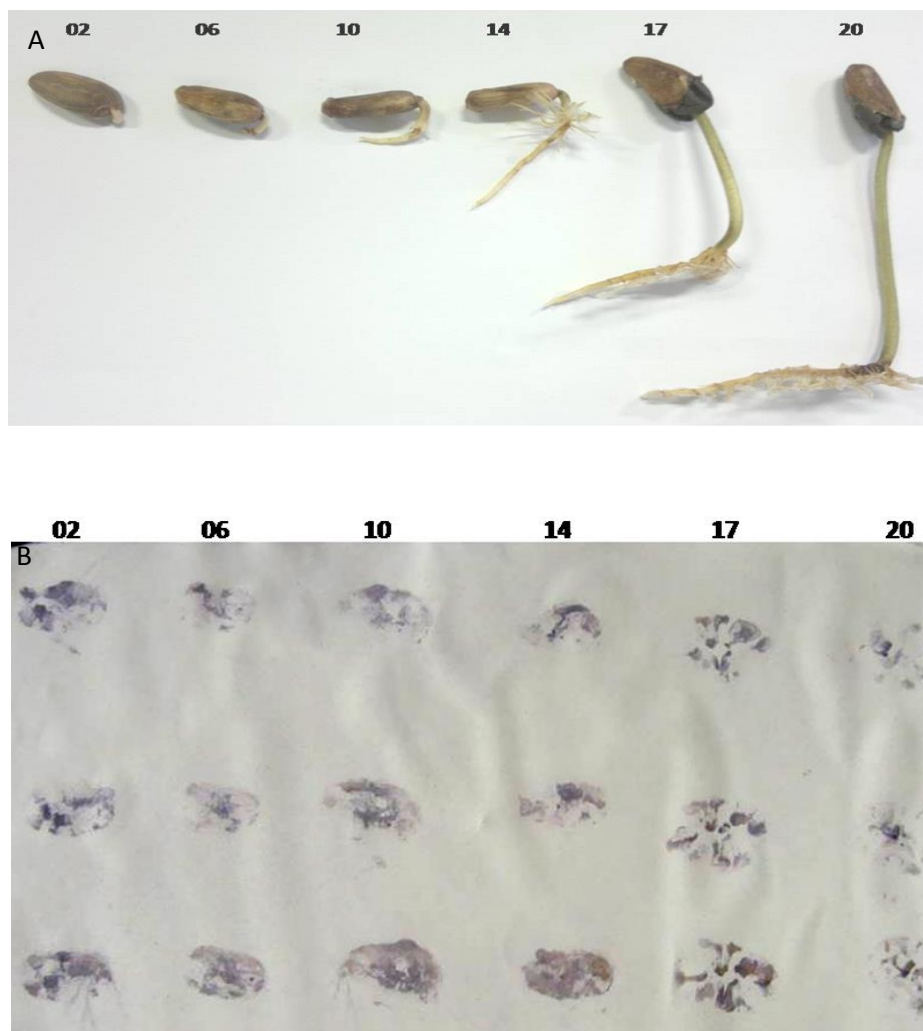


Figura 18: Imunodeteção de inibidores de tripsina em estágio de germinação da semente de cacau. A- Estágio de germinação de sementes de cacau realizado sob embebição. 02, 06, 10, 14, 17 e 20 correspondem aos dias após o início da embebição das sementes de cacau. B- western blot realizado com as sementes em germinação. As linhas 02, 06, 10, 14, 17 e 20 indica um print do cotilédone com a membrana realizado em triplicata. As falhas na imagem do print para os tempos de 17 e 20 dias após embebição indicam o consumo do tecido do cotilédone.

4.11 Imunodeteção de IT em estágios mais avançados de germinação

Para compreender o acúmulo de *TcIT* ao longo da germinação de semente de cacau, foi necessário estender o período de germinação até o consumo total do cotilédone, para isso foi plantada em casa de vegetação, sob condições ambiente, sementes de duas variedades de cacau, TSH1188 e Catongo. Os cotilédones foram

coletados a intervalos de 10 dias até completar os 60 dias de germinação. Para as sementes em germinação da variedade Catongo, não foi possível detectar o acúmulo de TcIT nos estágios de 30 e 40 dias (Figura 19).

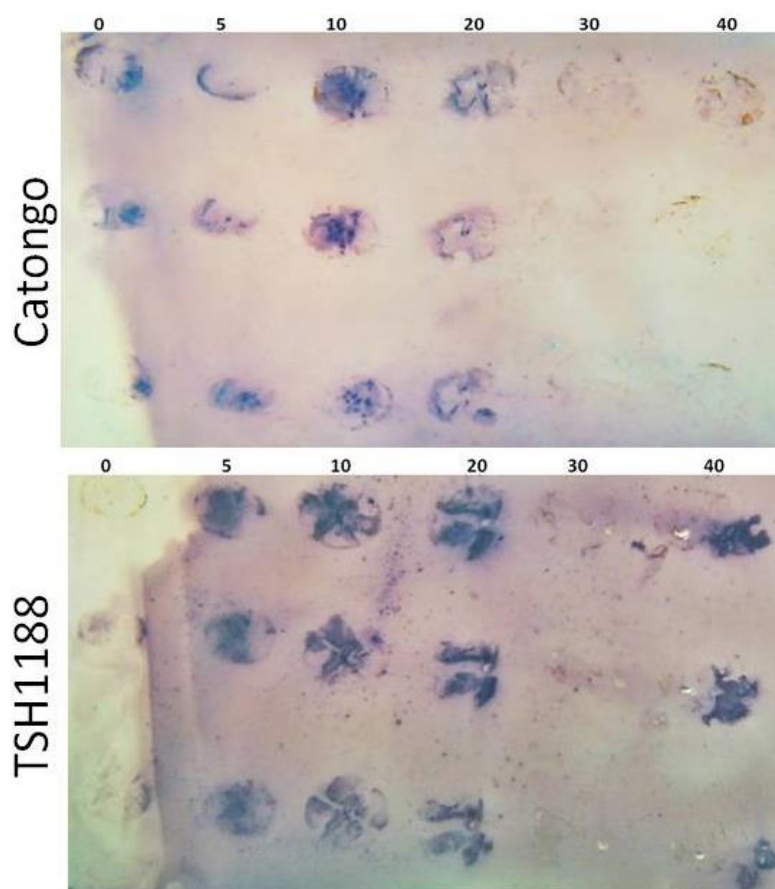


Figura 19: Imunodecção de cotilédones de cacau em germinação das variedades Catongo e TSH1188. O tempo 0 representa a semente sem germinar. Os números de 5 a 40 representam os dias de germinação da semente em casa de vegetação. Os prints foram feitos em triplicata

Na figura 19 o estágio 0 não apresentou uma detecção satisfatória para o inibidor de tripsina, isso pode estar relacionado a erros no manuseio e armazenamento da membrana, pois a membrana foi estocada em geladeira durante 60 dias para o acompanhamento dos estágios de germinação.

Para a variedade TSH1188 foi observado o acúmulo de inibidores de tripsina até o estágio de 40 dias de germinação, diferente do que foi encontrado para a variedade de Catongo que por essa técnica não foi possível observar o acúmulo para os estágios finais de 30 e 40 dias. Também é observado que a variedade TSH1188 apresenta um acúmulo de proteínas mais acentuada que a variedade Catongo.

4.12 Imunodeteção de IT em diferentes tecidos de cacau

Nos diferentes tecidos da planta foi observado perfis proteicos com níveis de expressão de proteínas bem diferenciados entre eles (Figura 20). Na semente de frutos verde (Linha S.V) foi notado um acúmulo acentuado de uma proteína em torno de 50 kDa, o acúmulo dessa proteína foi menor em cotilédones com 20 dias de germinação (Linha Cot). Uma proteína em torno de 23 kDa apresenta-se abundante em folha madura, semente de fruto verde e meristema (Linhas F.M; S.V; Mer) sendo pouco notado em caule e flor (Linhas Cal e F) pela análise de separação por eletroforese.

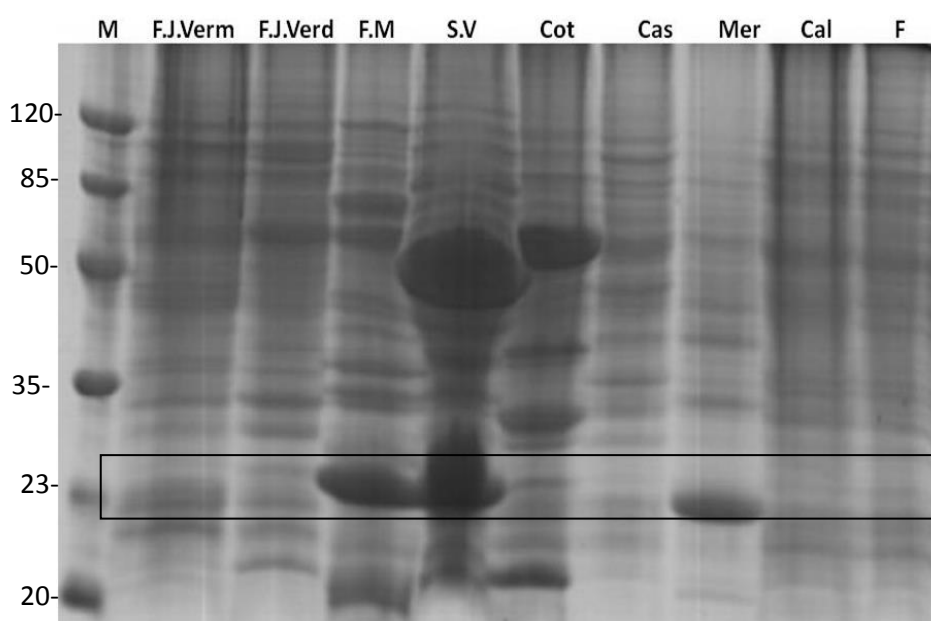


Figura 20: SDS-PAGE de diferentes tecidos do cacau. M, marcador molecular; F.J.Verm, folha jovem vermelha (5 dias de maturação); F.J.Verde, folha jovem verde (10 dias de maturação); F.M, folha madura; S.V, semente do fruto verde; Cot, cotilédone 20 dias de germinação; Cas, casca de fruto jovem; Mer, meristema; Cal, hastes caulinares e; F, flor.

O perfil de acúmulo do inibidor de tripsina nos diferentes tecidos da planta mostrou que esse inibidor é mais abundante em folhas maduras e sementes de frutos jovens (Figura 21 Linhas F.M e S.V). As Folhas jovens analisadas apresentam um curto período de maturação entre elas, com 5 dias e 10 dias de maturação (Linhas FJ. Verm e FJ. Verd respectivamente) foi observado um perfil de acúmulo diferente entre elas, sendo mais intenso nas folhas de 10 dias de maturação. Também foi observado um acúmulo significativo nos meristemas, um tecido da planta que requer maior proteção. De modo interessante foi detectado um acúmulo desse inibidor em flores (Figura 21

Linha F), porém em SDS-Page não foi notado a presença significativa dessa banda (Figura 20 Linha F).

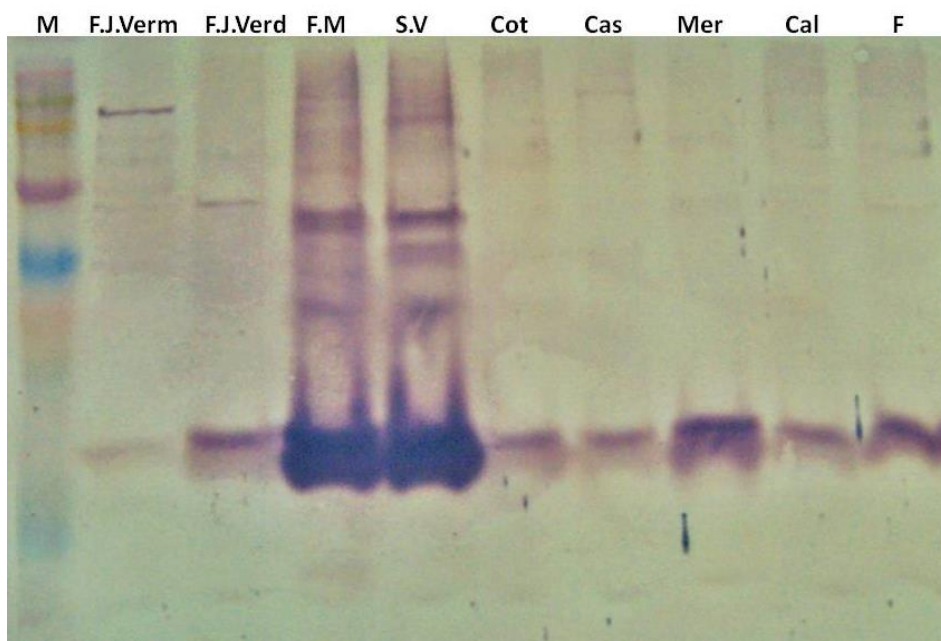


Figura 21: Imunodeteção nos diferentes tecidos do cacau. M, marcador molecular; F.J.Verm, folha jovem vermelha (5 dias de maturação); F.J.Verd, folha jovem verde (10 dias de maturação); F.M, folha madura; S.V, semente do fruto verde; Cot, cotilédone 20 dias de g germinação; Cas, casca de fruto jovem; Mer, meristema; Cal, hastes caulinares e; F, flor.

4.13 Acúmulo do inibidor de tripsina em meristemas em resposta ao tempo de inoculação ao *Moniliophthora perniciosa*.

A análise do perfil proteico de meristemas mostra a diferença de proteínas expressas sob diferentes tratamentos. A banda de aproximadamente 23 kDa apresenta uma variação de expressão mais intensa que as demais, sendo observada tanto para os estágios iniciais com os finais da inoculação (Figura 22 A e B), essa banda corresponde ao inibidor de tripsina.

Nos estágios finais (Figura 22) a diferença do perfil proteico nos tratamentos infectados e controle são mais acentuadas quando comparadas aos estágios iniciais (Figura 22 A).

Nos estágios iniciais as bandas de aproximadamente 83 e 32 kDa também apresentaram um perfil diferenciado de expressão.

Para os estágios finais de inoculação (figura 22 B) as bandas que se destacam são de 50 e 32 kDa, sendo mais expressas na variedade resistente (TSH1188).

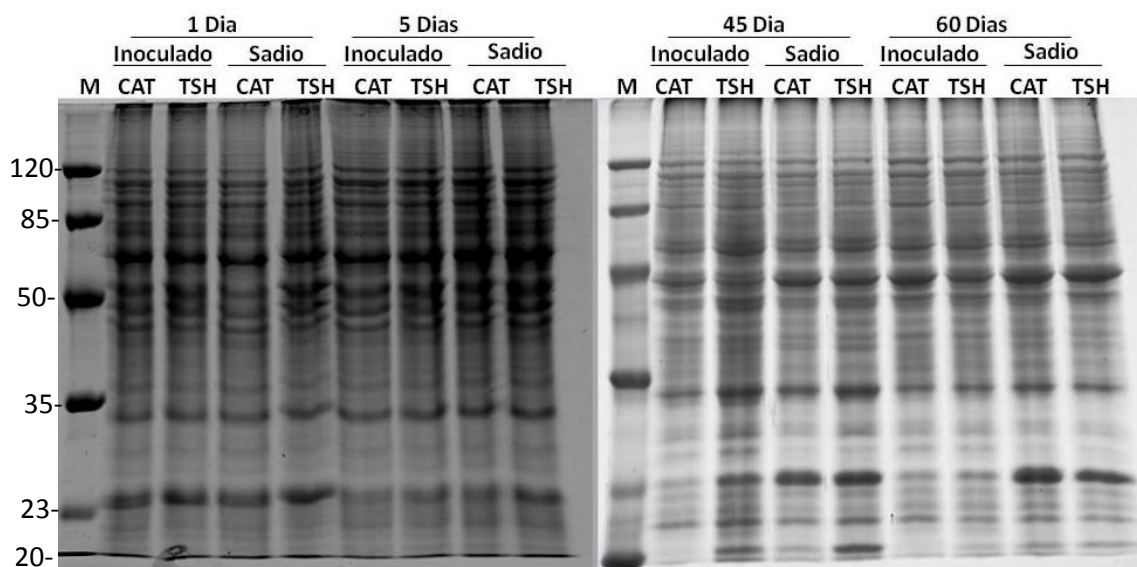


Figura 22: SDS-Page de extratos de proteínas totais de meristema. O lado A indica os estágios iniciais de infecção da doença (Mp.). B- indica os estágios finais de infecção ao Mp.

O acúmulo do inibidor de tripsina foi analisado em meristemas sob diferentes tempos após inoculação com *Moniliophthora perniciosa*. No início da infecção, com 1 dia de inoculação, houve um maior acúmulo dos inibidores no tratamento infectado para a variedade resistente (TSH), o que não aconteceu para a variedade suscetível (Catongo), onde ocorreu uma diminuição do acúmulo desse inibidor (Figura 23). No período de cinco dias de inoculação o acúmulo do inibidor foi menor para as duas variedades, no entanto, no período controle de cinco dias no TSH1188 o inibidor foi mais abundante, de acordo com o western blot.

No catongo o acúmulo do inibidor nos estágios iniciais de infecção e seus respectivos controles foram menores, mantendo uma expressão basal.

Para os estágios finais da infecção entre 45 e 60 dias de inoculação a abundância do inibidor diminuiu consideravelmente quando comparado aos controles. Aos 60 dias de inoculação, estágio muito avançado da doença, não foi possível detectar acúmulo significativo desses inibidores pela técnica de Western Blot, isso ocorreu para as duas variedades.

Na variedade Catongo não foi possível detectar a presença do inibidor no período de 45 dias de inoculação, sob condições experimentais adotadas, entretanto em TSH1188 foi detectado um acúmulo mínimo do inibidor.

Para todos os tratamentos analisados foi detectado também duas bandas muito próximas de aproximadamente 85 kDa. elas podem estar relacionadas à proteína de

multidomínios, é notado que esse par de bandas também acumula de forma diferenciada nos tratamentos e a variedade TSH1188 apresenta menor abundância dessas bandas que o Catongo, no entanto essas bandas estão sendo consideradas como artefatos nas análises, pois não corresponde à proteína alvo no presente estudo.

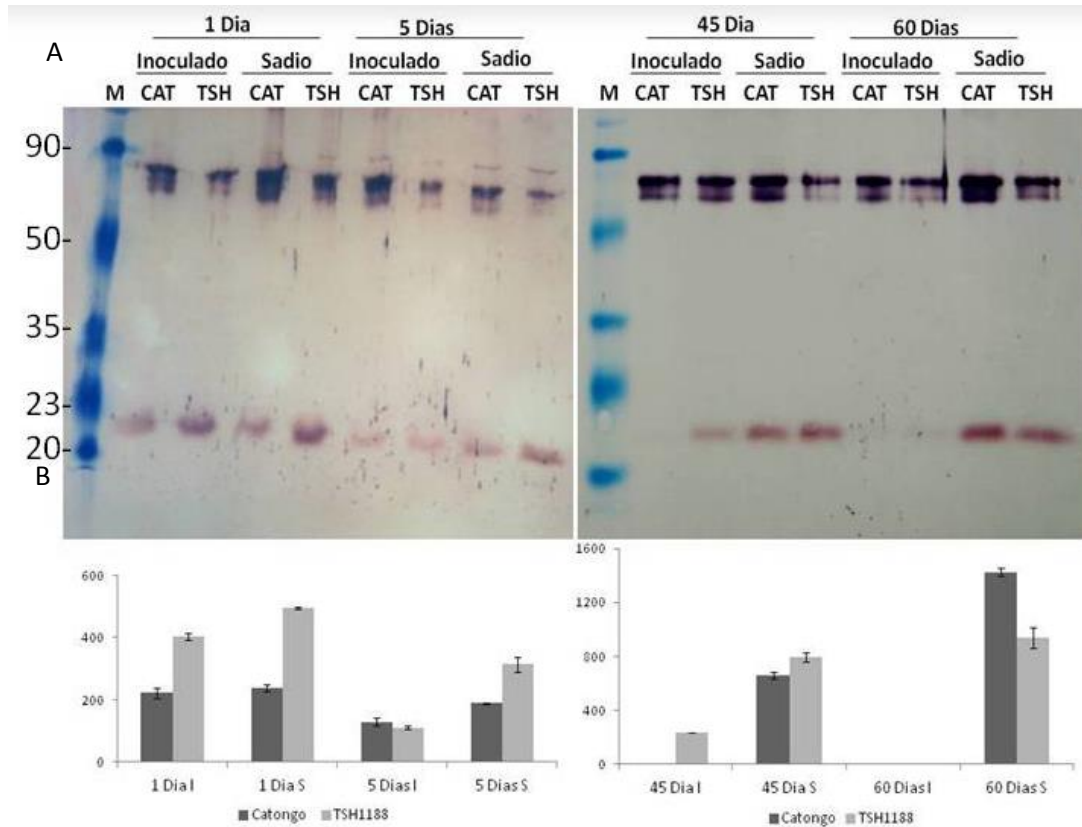


Figura 23: Imunodeteção de inibidores de tripsina em meristema de cacau da variedade TSH1188 e Catongo. A- Estágios iniciais de 1, 5, 45 e 60 dias indicam os períodos de infecção pelo *Moniliophthora perniciosa* e seus controles, M: indica o marcador molecular, CAT; catongo (variedade suscetível), TSH; TSH1188 (variedade resistente), de 1 e 5 dias indica os estágios iniciais da doença, enquanto 45 e 60 dias indica os estágios finais da doença. B- Gráficos de intensidade das bandas proteicas referentes aos diferentes tratamentos, quantificadas com o Gel.Quant.

5. Discussão

5.1 *TcIT* apresenta características conservadas com os inibidores do tipo Kunitz

O interesse para estudo do inibidor de tripsina do cacau iniciou-se a partir dos resultados apresentados por Gesteira et al. 2007, onde identificou o gene do inibidor de tripsina como diferencialmente expresso durante diferentes estágios de infecção pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura-de-bruxa, doença responsável por grande parte da perda de produção no Sul da Bahia-Brasil. Um fragmento de sequência referente ao inibidor de tripsina detectada em bibliotecas de EST's da interação *T. cacao-M. perniciosa* (Gesteira et al., 2007) foi utilizado para identificar a sequência completa do inibidor no banco de dados de EST's de cacau do Cirad/França (<http://ESTtik.cirad.fr/>) (Argout et al., 2008).

Pela análise de domínios conservados identificou-se uma região relacionada à família de inibidores de tripsina do tipo Kunitz, esse tipo de inibidor é muito abundante em sementes de várias espécies de plantas, atuando como proteína de estoque nesse tecido.

Em sementes de cacau concentra-se cerca de 17,4 % do inibidor de tripsina do tipo Kunitz presente no extrato de proteínas totais (Paulilo et al., 2012). Em outros tecidos da planta esse tipo de inibidor tem papel de defesa contra ataque de patógenos, corroborando com Gesteira et al., 2007 que detectou esses genes de defesa em meristemas de cacau infectado com *M. perniciosa*.

A sequência completa do inibidor de tripsina do cacau apresenta 219 aminoácidos indicando um peso de aproximadamente de 23.9 kDa. Geralmente os inibidores do tipo Kunitz apresentam um peso molecular de 18-24 kDa (Mello et al., 2001).

A presença do peptídeo sinal na proteína endógena *TcIT* indica que essa proteína pode ser transportada através de membrana celular, que pode ser secretada para o meio extracelular para interagir com proteases exógeno de um determinado patógeno. Neste sentido, foi investigada a localização de uma miraculina de *Richadella dulcifica* com o peptídeo sinal conservado para o tipo Kunitz. A miraculina fundida à proteína GFP foi localizada no exterior da membrana plasmática em função do peptídeo de sinal (Takai et al., 2013). Por outro lado, o trabalho de Spencer & Hodge (1991) mostra a localização intracelular da proteína de 21 kDa ligadas à membrana dentro do vacúolo, isso

corroborar com o seu papel de proteína de armazenamento ou um protetor de proteínas de reserva na fase final de desenvolvimento da semente de cacau.

Na sequência de *TcIT* há a presença de sítios de glicosilação, indicando que essa proteína pode sofrer alterações pós-traducionais. Nas sementes de *Acacia victoriae* foram identificados três isoformas desse inibidor proveniente de glicosilação (Ee et al., 2011). Em um trabalho de proteômica com meristemas de cacau desenvolvido em nosso laboratório, foram identificados três inibidores de tripsina do tipo Kunitz com peso molecular e pI muito próximos, sendo diferencialmente expressos entre variedade resistente e suscetível, além da expressão diferencial sob as condições de infecção ao fungo. Hipotetizamos que essas isoformas do inibidor podem estar envolvidas nos sintomas da doença (Dados não publicados).

A presença de isoformas do IT Kunitz está bem estabelecida em algumas espécies como *Entada acaciifolia* (Oliveira et al., 2012); *Acacia victoriae* (Ee et al., 2011); *Pisum sativum* (Morrison et al., 2007) e *Adenanthera pavonina* (Macedo et al., 2004). Fisiologicamente, a ocorrência de tais isoformas pode ser uma das estratégias de sobrevivência que evoluíram em plantas hospedeiras.

Analisando a sequência referente ao domínio Kunitz de *TcIT*, utilizando a ferramenta BLASTp pelo (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (dados não mostrado) foi detectada uma alta similaridade com os inibidores de espécies do mesmo gênero (*Theobroma*) com espécies do gênero *Populus*. A biblioteca descrita por Argout et al., (2011) mostra que o *Theobroma cacao* compartilha algumas famílias de genes com *Populus trichocarpa*. Uma alta similaridade também foi observada para a proteína miraculina, uma proteína presente em *Richadella dulcifica* responsável por modificar o gosto doce para o azedo (Takai et al., 2013) e esporamina recentemente classificada como um IT Kunitz presente na batata doce (Senthilkumar & Yeh, 2012). Essa alta similaridade foi confirmada utilizando a Ferramenta ExpasyBlast com a sequência de *TcIT* e outras proteínas relacionadas ao inibidor de tripsina do cacau com IT's de outras espécies. Essas análises mostraram que embora esses genes sejam muito similares, as pequenas variações agrupam esses genes em ramos diferentes (Figura 3).

O Alinhamento de sequências corrobora com a hipótese que os IT's Kunitz representam uma família de genes que não contém introns, pois as análises de alinhamento do cDNA de *TcIT* com o banco genômico do cacau não apresentaram trechos desalinhados no genoma, característicos de íntron (dado não mostrado). Algumas sequências genômicas referentes ao inibidor do tipo Kunitz são integralmente

livres de íntrons, como no caso do IT de *Inga laurina* em que o DNA genômico foi sequenciado e comparado com a sequência de aminoácidos da proteína mostrando alta correlação entre elas (Ramos et al., 2012). Esse fato ocorre de forma similar ao inibidor de tripsina da soja mostrando que essa família de genes pode não conter íntrons (Song et al., 1993). Nossas análises corroboram com a de Silva & Figueira, (2005), demonstrando que o inibidor de tripsina do cacau é um gene sem íntrons.

A modelagem de *TcIT* foi de alta confiabilidade, apresentando 96.9 % de resíduos em regiões favorecida, esses resultados corroboram com outras modelagens para essa família de inibidores, como para o IT de *Enterolobium contortisiliquum* apresentando um modelo de 95 % de confiabilidade (Zhou et al., 2013).

Embora a proteína *TcIT* apresente seis resíduos de cisteína, quatro deles ocupam regiões conservadas para o domínio Kunitz. Os inibidores do tipo Kunitz geralmente possuem quatro resíduos de cisteína formando duas pontes de dissulfeto, mas a proteína *TcIT* possui seis resíduos de cisteína, sendo quatro desses resíduos conservados em IT's Kunitz. No entanto, os inibidores que apresentam mais de duas pontes de dissulfeto, ou seja, mais que quatro resíduos de cisteínas são agrupados na mesma categoria, porque apresentam características estruturais similares (Oliva et al., 2010). Isso sugere que as pontes de sulfeto adicionais não promovem modificação drástica da sua estrutura tridimensional o que foi demonstrado com o modelo de modelagem (Figura 5). Contudo, a presença de resíduos de cisteína confere á esse grupo de inibidores uma maior estabilidade, sendo estes mais resistentes á altas temperaturas e variações extremas de pH (Klomklao et al., 2011).

5.2 A proteína *TcIT* recombinante é ativa e estável

O cDNA foi clonado visando a expressão da proteína madura com a fusão de uma cauda de histidina derivada do vetor pET-28a. A proteína foi expressa na fração solúvel do extrato bacteriano com uma massa molecular de aproximadamente 23 kDa (Figura 8). Esta massa é compatível com a massa estimada para a proteína de fusão carregando a cauda de histidina derivada do vetor pET-28a. Para a clonagem do gene *TcIT* foi utilizada a sequência de cDNA, de modo que os primer's desenhados flanqueassem uma região adjacente ao sítio de clivagem proteolítica do peptídeo sinal, dessa forma ao

realizar os experimentos de expressão e purificação evitaria o endereçamento da proteína para o meio de cultura.

A fusão de *TcIT* à cauda de histidina facilita a purificação com alto grau de homogeneidade, pelo método de purificação por cromatografia de afinidade. Da mesma forma Ribeiro et al., (2008) utilizou a mesma técnica de clonagem em *E. coli* para um IT tipo Kunitz, onde o fragmento amplificando excluía o peptídeo sinal.

A produção da proteína *TcIT* ocorreu de forma satisfatória, com altos níveis de expressão em *E. coli*. Uma alta produção de proteína exógena pode conferir toxicidade à bactéria, podendo ou ser excretada para o meio de cultura ou acumular-se em corpos de inclusão (Kadokura et al., 2003). Mas a figura 8 mostra que a proteína recombinante acumulou em maior proporção na fração solúvel do extrato bacteriano, o que facilitou a sua purificação com elevado rendimento e elevada homogeneidade.

O tamanho da proteína também influencia no processo de expressão e purificação com alta homogeneidade, sendo as pequenas proteínas mais facilmente purificadas. Quando a proteína é produzida acima das concentrações ideais, ela passa a se acumular em corpos de inclusão, dessa forma a proteína é purificada na fração insolúvel (Mergulhão et al., 2005). Isto não é desejável, uma vez que as proteínas da fração insolúvel são purificadas em condições desnaturante e dificilmente são obtidas na forma ativa.

A estratégia de clonagem com a remoção do peptídeo sinal resultou na proteína *TcIT* ativa. A expressão heteróloga da proteína recombinante com o peptídeo sinal pode resultar na secreção da proteína para o meio de cultura e muitas vezes, na perda da sua forma ativa ou degradação. Mas, nem sempre a produção da proteína com peptídeo sinal implica na sua secreção para o meio de cultura, uma vez que alguns peptídeos sinal eucarióticos não são reconhecidos pela via secretória de bactéria (Mergulhão et al., 2005). Entretanto, em algumas proteínas a presença de um peptídeo sinal pode interferir no dobramento e na sua forma ativa (Takai et al., 2013).

Os métodos utilizados para clonagem e expressão resultaram na produção de uma proteína ativa. A presença de *TcIT* no meio de reação reduziu a atividade catalítica da tripsina suína, à medida que aumentava a concentração do inibidor. Um IT de escorpião muito similar ao inibidor da planta apresentou uma curva de inibição muito semelhante à obtida para *TcIT*, porém a concentração do inibidor foi 10 vezes maior que a analisada para *TcIT*, (Chen et al., 2013). A capacidade inibitória para IT de *Putranjiva roxburghii* foi muito elevada, apresentando diminuição de 100% da atividade residual com a

relação de 1:1 entre inibidor e enzima (Chaudhary et al., 2008), isso ocorre de forma similar para outros inibidores (Oliveira et al., 2012).

O dicroísmo circular (CD) mostrou espectro compatível para uma proteína estruturada, assim, podemos deduzir que a estrutura secundária de *TcIT* é predominantemente composta por folhas- β e estruturas desordenadas com leve teor helicoidal (Figura 12). Esses dados corroboram com a análise de modelagem de *TcIT* (Figura 5). Essas características são marcantes para um inibidor do Tipo Kunitz, sendo estes desprovidos de α -hélices bem estabelecidas. Essa mesma estrutura é descrita para outros inibidores Kunitz (Lopes et al., 2009; Liao et al., 2007; Chaudhary et al., 2008; Oliveira et al., 2012; Oddpally et al., 2013).

A parte da estrutura não-ordenada pode conferir flexibilidade ao IT do tipo Kunitz para inibir enzimas de diferentes classes (Majunder et al., 2012).

A análise de varredura aos 96 °C apresentou um espectro similar à varredura feita aos 26 °C, com um mesmo pico negativo em 220 nm, esse pico negativo é referente a presença de folhas- β , mostrando que essa estrutura se mantém á tratamentos de altas temperaturas. Os espectros de CD e a curva de Termoestabilidade (Figuras 12 e 10), conjuntamente, sugerem que a perda de atividade de *TcIT* recombinante durante o tratamento de 90 °C pode não estar associada a alterações drásticas da estrutura tridimensional. A presença de ligações de dissulfeto na estrutura primária dessa proteína pode contribuir para esta estabilidade da estrutura tridimensional. Esses dados sugerem que a proteína *TcIT* pode apresentar um potencial para se re-enovelar, pois não perde por completo a sua estrutura, dessa forma supõe-se que, após os tratamentos de altas temperaturas, a proteína pode voltar a sua forma nativa.

5.3 *TcIT* tem potencial para determinação do binômio tempo-temperatura para indústria

A termoestabilidade de inibidores proteicos pode estar relacionada à presença de cisteínas responsáveis pela formação de pontes de dissulfeto no dobramento das proteínas (Klomklao et al., 2011). O estudo do efeito da temperatura sob a estabilidade da proteína demonstraram que o *TcIT* apresenta características de um inibidor parcialmente estável, com relações de tolerância a altas temperaturas. A alta atividade inibitória foi mantida até os 70°C. No tratamento de 10 min à 80°C revelou uma redução mínima de 10 % da sua capacidade inibitória. Um perfil similar foi encontrado para o

inibidor de tripsina de *Vigna radiata*, que manteve sua atividade estável até os 90 °C, perdendo aos poucos a atividade com aumento do tempo de incubação (Klomklo et al., 2011). No entanto, em outros inibidores do tipo Kunitz a atividade mantém-se estável a temperaturas mais baixas, como no caso do IT de *Piptadenia moniliformi*, que apresentou 100% de inibição somente até os 60°C, porém no tratamento a 100 °C perdeu apenas 20% da sua capacidade inibitória (Cruz et al., 2013). Para o TcIT, no tratamento a 90°C ocorre perda completa da atividade inibitória, porém com o tratamento a 80°C a proteína mantém mais de 60% da sua atividade inibitória.

A termoinstabilidade exibida pelo inibidor TcIT recombinante a partir das temperaturas superiores a 70°C, com a perda de atividade de 40 % para a exposição a 80 °C sugerem que o tratamento térmico (torrefação ou cocção) dos produtos de cacau só irá inativar esse inibidor, após tempo prolongado (no mínimo 10 min), ou em temperaturas elevadas (no mínimo 80°C). Esses resultados indicam também que a atividade desse inibidor pode ser monitorada para o estabelecimento do binômio tempo *versus* temperatura a ser usado em processamento de cacau pela indústria de alimentos. Vale destacar, que os inibidores Kunitz ativos podem ser considerados fatores antinutricionais em produtos alimentícios, uma vez que, podem inibir serino-proteases do trato digestivo diminuindo parcialmente a digestão do alimento (Silva & Silva, 2000). A relação combinada entre tratamento térmico e tempo de incubação da proteína pode ser aplicada na determinação da manutenção ou eliminação da atividade desses inibidores, visando à demanda de aplicações na indústria alimentícia ou isolamento desses inibidores ativos na aplicação de produtos biotecnológicos, como aplicado ao IT da semente de *Enterolobium contortisiliquum* que pode se tornar um produto farmacêutico para tratamento de prevenção do câncer gástrico. (De Paula et al., 2012)

Um aumento da atividade inibitória para a proteína TcIT foi observado nos tratamentos de 50 e 60 °C como mostrado na figura 10. O aquecimento pode enriquecer os inibidores de tripsina, devido ao afrouxamento das estruturas da proteína bruta, deixando-as mais maleáveis para uma interação com melhor ajuste à fenda catalítica da enzima-alvo (Benjakul et al., 2000).

Os estudos com tratamento térmico para algumas proteínas específicas podem determinar condições de manipulação ótimas referente à demanda de manutenção ou perda da atividade da proteína. Para o feijão (*V. variata*) com o tratamento a 90 °C por 10 min aumenta em duas vezes o rendimento na obtenção de IT's purificados com alta homogeneidade (Klomklo et al., 2011).

5.4 Cinética de inibição de TcIT recombinante

A proteína TcIT apresenta inibição do tipo competitiva, ou seja, ela compete com o substrato pela interação direta com o sítio ativo da enzima. Dessa forma o aumento da concentração do substrato, a níveis muito superiores ao do inibidor pode reestabelecer atividade catalítica da enzima, pela competição ao sítio catalítico.

Não só o aumento da concentração do substrato afeta a dissociação entre inibidor-enzima, mas também a qualidade de inibição conferida a um determinado inibidor proteico. Esta é considerada a característica mais relevante na dissociação. Quanto mais estável a interação do inibidor com a enzima mais difícil será a dissociação desse complexo. O valor K_i de $4,08 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ indica uma alta afinidade entre a enzima e inibidor. Esse valor de K_i encontrado para o TcIT representa uma constante de inibição muito forte, quando comparado à outros inibidores descritos na literatura, dessa forma esse inibidor se torna um bom candidato para aplicação em ferramentas biotecnológicas.

Inibidores que são considerados bons candidatos para uma forte interação com a enzima apresentam valores mais baixos de K_i e maior capacidade inibitória, como no caso dos IT's kunitz de *Glicine soja* $3,2 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ (Deshimaru et al., 2002); *Trigonella foenum-graecum* $3.01 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ (Oddepally et al 2013); *Entada acaciifolia* $1,75 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ (Oliveira et al., 2012); *Pithecellobium dumosum* $5,7 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ (Rufino et al., 2013). Alguns IT's Kunitz apresentam inibição específica à tripsina e quando inibem outras proteases relacionadas, como no caso das quimiotripsinas, a inibição é menos eficiente, apresentando valores mais altos de K_i como ocorre com o IT kunitz da *Piptadenia moniliformis*. Este inibidor revelou uma constante de inibição para quimiotripsina de $3.0 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$, enquanto que para tripsina o K_i foi de $1.5 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ (Cruz et al., 2013). Entretanto alguns IT's Kunitz apresentam alta inibição contra quimiotripsina como ocorre para o IT de *T. foenum-graecum* apresentando um K_i para quimiotripsina de $0.52 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$, com valores muito próximos ao da inibição á tripsina, porém com o tratamento térmico a inibição para quimiotripsina diminui em 50 % enquanto que para tripsina a inibição não é afetada (Oddepally et al., 2013).

Alguns IT's Kunitz podem apresentar inibição satisfatória contra outras classes de proteases, apresentando atividade bifuncional. O IT Kunitz de *Prosopis juliflora* apresenta inibição competitiva contra a tripsina e papaína (cisteíno-protease) (Franco et al. 2002). O IT de *Adenantha pavonina* apresentou alta similaridade com o IT de *P.*

juliflora, relacionando com a sua atividade bifuncional, porém apresenta um tipo de inibição não competitiva, um modo de inibição pouco esclarecido entre os IT's Kuntiz, com as análises *in vitro* foi demonstrado que essa proteína apresenta dois sítios inibitórios independentes (Migliolo et al 2010).

Estudos que demonstrem a capacidade do inibidor de afetar o crescimento e a proliferação de larvas são mais direcionados a ação direta do inibidor em relação ao tipo de inseto ou patógeno que inibe, pois muitos são os artefatos usados por pragas para se proteger contra um inibidor específico, eles podem desenvolver a produção de outras proteases que não são alvo para os inibidores do hospedeiro como estratégia de sobrevivência (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002).

Os estudos sobre a constante de inibição K_i podem ser utilizados para selecionar um inibidor mais eficaz para a transferência de genes em uma determinada cultura suscetível a praga.

Embora os inibidores sejam uma potente ferramenta de defesa da planta, muitos herbívoros conseguem romper essa barreira. A provável explicação é que os insetos desenvolveram diferentes estratégias para superar os efeitos adversos de IP's (Paulillo et al., 2000;. Brito et al, 2001.). Há muitos fatores que interferem nessa co-evolução entre plantas e patógenos que incluem a concentração do inibidor expresso na planta, o K_i que determina interação com a protease exógena, a estabilidade do inibidor no intestino do inseto, a presença de um conjunto completo de inibidores para inibir todas as proteases do intestino, e a capacidade de adaptação do inseto à inibição (Jongsma e Bolter, 1997; Carlini & Grossi-de-Sá, 2002).

A proteína *TcIT* pode ser empregada em outras culturas vegetais conferindo á outras espécies de planta resistência à praga a qual seu inibidor endógeno não seria capaz de inibir. Uma proposta similar foi empregada em *Nicotiana tabacum* que superexpressou um inibidor de tripsina Kunitz que lhe conferiu resistência à infestação ao fungo (Huang et al., 2010).

A superexpressão dos inibidores de tripsina em plantas transgênicas pode ser considerada uma importante estratégia para tentar burlar a co-evolução entre plantas hospedeiras e seus respectivos patógenos (Franco et al., 2004).

5.5 TcIT acumula durante o desenvolvimento do fruto e semente e é mantido nos cotilédones durante a germinação.

Os IT's de plantas desempenham um importante papel na defesa de plantas sob diversos agentes estressores, principalmente, aos ataques de pragas (Sivakumar et al., 2005; Yuan Ma et al., 2011; Hartl et al., 2010). Além disso, são consideradas proteínas de estocagem em sementes de leguminosas (Mello et al., 2001; Richardson; 1991).

Inibidores de tripsina desempenham papéis duplos na planta, sendo parte das defesas diretas contra predadores e agindo como reguladores endógenos de proteases durante eventos fisiológicos e de desenvolvimento (Mosolov & Valueva, 2005; Howe & Jander, 2008)

As sementes de *Theobroma cacao* contêm cerca de 50 % de gordura e de 20-15 % de proteínas, sendo o maior conteúdo proteico composto por albumina, representando 52% das proteínas totais (Voigt & Biehl, 1993). Dentro da fração de albumina o inibidor de tripsina é o mais abundante (Silva e Figueira, 2005).

As análises do acúmulo de TcIT durante a germinação da semente mostrou que esses inibidores apresentam importante papel na regulação desse processo uma vez que não é observado uma diminuição significativa dessa proteína ao longo da germinação. Essas análises corroboram com o trabalho de Biehl et al. (1982) em que uma proteína de 21 kDa (Inibidor de tripsina do cacau) aumentava durante o desenvolvimento do embrião, mas não se degradava na mesma extensão durante a germinação. Isso pode estar ocorrendo devido ao fato desses inibidores regular de forma indireta a aspártico-protease, responsável pela degradação proteolítica durante a germinação (Voigt et al., 1995).

Biehl et al. (1977, 1982) analisou a evolução das proteínas de sementes maduras em *T. cacao* durante a germinação e fermentação. Eles propuseram que durante a fermentação, as proteínas de armazenamento da semente de *T. cacao* são degradadas por endo- e exo-proteases, que reagem durante a torrefação com outros precursores de aromas, tais como os açúcares e os polifenóis, para desenvolver o sabor de chocolate (Voigt et al. 1995).

No trabalho de Paulillo et al. (2012) utilizando um anticorpo imune ao inibidor de tripsina da soja para imunodeteção em sementes do gênero *Theobroma*, não detectou o acúmulo da proteína em sementes de *Theobroma cacao*. Com o nosso anticorpo produzido a partir da proteína recombinante identificada no banco de cDNA do cacau

ocorreu detecção com alta resolução de bandas referentes ao inibidor de tripsina partindo apenas de 4 µg de um extrato proteico total de semente.

Os inibidores foram detectados em frutos jovens e em sementes por meio da hibridização direta da superfície dos tecidos com a membrana de nitrocelulose. Esta detecção pode ser considerada específica, uma vez que não houve detecção para a reação com o soro pré-imune. Além de detectar uma banda exclusiva com a massa molecular de 23 kDa por western blot em extratos proteicos de semente (Figura 15). Essa massa superior à predita para a proteína madura (Tabela 2) sugere que a proteína endógena sofre modificações pós-traducionais. Isto está compatível com os quatro sítios de O-beta-glicosilação preditos, destacados na figura 7. A detecção do inibidor de tripsina na casca de frutos jovens (Figura 14) sugere que o inibidor pode conferir proteção aos frutinhos contra o ataque de insetos, pois a ação protetiva de inibidores Kunitz contra a herbivoria tem sido demonstrada em outras espécies (Sivakumar et al., 2005; Yuan Ma et al., 2011; Hartl et al 2010;).

O acúmulo de inibidor de tripsina inicia na semente jovem e é mais acentuado nas fases finais do desenvolvimento das sementes, sugerindo que a sua presença pode estar relacionada com o processo de maturação e manutenção da dormência em sementes de cacau (Nistal et al., 2009; Jimenez et al., 2007). Inibidores de tripsina presentes em sementes de cacau podem ter relação com o processo de germinação, pois todos os estágios estudados por hibridização da superfície do tecido do cotilédone com a membrana de nitrocelulose apontam a presença do inibidor de tripsina (Figura 17).

A técnica de imunodeteção direta do tecido na membrana mostrou-se mais sensível do que Western blot do extrato proteico total, pois o inibidor endógeno foi detectado nos extratos proteicos de semente somente nos estágios finais do desenvolvimento (Estágio 5 e 6) por western blot (Figura 15), enquanto que para o estágio 4 só foi detectado o inibidor de tripsina para a técnica de imunodeteção direta (Figura 14). Estudos com dois inibidores de tripsina do tipo Kunitz em sementes de grão-de-bico apresentaram relação direta como processo de germinação. Um dos inibidores promoveu regulação do processo inicial da germinação. O outro teve sua atividade voltada para o processo de xilogenese e alongamento do tecido em germinação (Nistal et al., 2009).

As análises de imunodeteção de IT nos diferentes tecidos do *T. cacao*, indicam onde esses inibidores estão mais presentes. Foi notado que o inibidor de tripsina

acumula de forma crescente aos estágios de desenvolvimento das folhas, se tornando muito abundante nas folhas maduras.

O acúmulo significativo do inibidor nas sementes de frutos verdes (jovens) corroboram com a função protetiva desses inibidores contra a degradação proteolítica das sementes, como ocorre para a maioria das espécies de plantas (Nistal et al., 2009; Mello et al., 2001).

Embora o intervalo que diferencia os estágios entre folhas jovens seja de um curto período de tempo, de 5 a 10 dias, entre folha jovem vermelha e folha jovem verde respectivamente, o acúmulo do inibidor foi muito diferente entre os dois estágios, sendo mais abundante na folha jovem verde. A presença elevada de antocianina em folhas jovens confere proteção ao excesso de luz, no entanto, é relatado também que a presença de antocianina previne a degradação por insetos, uma vez que há uma correlação entre quantidades de antocianina e compostos fenólicos que inibi a ação dos insetos (Karageorgou & Manetas, 2006; Queenborough et al., 2013). Dessa forma a discrepância do acúmulo do inibidor entre as duas folhas jovens de cacau não se dá pela curta diferença no período de maturação entre elas, mas pelo seu fenótipo. Uma vez que a planta investe na produção de antocianina não precisa de concentrações elevadas do inibidor, uma alternativa para a proteção dos tecidos jovens como estratégia de sobrevivência.

Embora as análises de SDS-Page (Figura 18) não tenha mostrado um acúmulo significativo para a flor, a análise por western blot foi mais sensíveis mostrando um acúmulo significativo do inibidor nesse tecido.

Para muitas espécies a visita de insetos na flor é muito importante para a polinização, porém nos períodos de desenvolvimento do botão floral ou no processo de embriogênese do fruto é necessária a presença de inibidores proteicos para proteção contra insetos. Embora não se conheça o papel específico dos IT's em flores de cacau, em outras espécies são descritos alguns papéis dos inibidores nesse tecido. Em *Passiflora edulis*, o extrato proteico de inflorescências apresentou elevada atividade inibitória contra tripsina, e foi observado um aumento de seu acúmulo em estágios de desenvolvimento da inflorescência (Pereira et al., 2011). Esse efeito ocorre de forma semelhante em IT de *Solanum americanum*, que sugere que o inibidor pode regular a proteólise relacionada com PCD (morte celular programada) durante o desenvolvimento da inflorescência (Sin & Chye, 2004).

5.6 IT's apresentam acúmulo diferencial durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa no cacau

Ainda é pouco esclarecido quais ferramentas que o *Theobroma cacao* utiliza para sua defesa contra a infestação devastadora da vassoura-de-bruxa. Para identificar proteínas candidatas Gesteira et al. (2008) explorou uma biblioteca de EST's da interação *T. cacao* e *M. perniciosa*, um inibidor de tripsina foi sugerido como parte dos mecanismos de resistência a planta. De acordo com esse mesmo trabalho foi identificado 32 EST's do inibidor de tripsina apenas para meristemas de variedade resistente provenientes de um pool acumulativo de vários estágios de infecção ao *M. perniciosa*. Nossos resultados de imunodeteção mostram uma variação na dinâmica de acúmulo do inibidor de forma diferencial entre genótipos contrastantes de cacau. Nos estágios iniciais da infecção há um maior acúmulo desses inibidores na variedade resistente TSH1188 como resposta inicial a infecção pelo fungo, entre 1 e 5 dias de infecção. Nos estágios mais avançados da doença entre 45 e 60 dias a expressão desses inibidores diminui de forma acentuada. Com 45 dias já é notável a formação de hifas dicarióticas caracterizando a fase saprofítica da doença, e aos 60 dias de infecção é notado que o tecido meristemático se encontra completamente necrosado (Scapari et al., 2005; Ceita et al., 2007). De forma similar, outro grupo de inibidores da família das fitocistatinas, acumula de forma abundante no tecido sadio de folhas maduras, porém nas folhas infectadas não é observado um acúmulo significativo (Pirovani et al., 2010). Essa diminuição de inibidores em plantas de cacau pode estar ocorrendo devido ao mecanismo de resposta do cacau que ativa a via de sinalização da morte celular programada que ativa a expressão de algumas proteases, como foi descrito para cisteíno-protease que aumenta em tecidos infectados (Pirovani et al., 2008; Cardoso, 2011).

Nos meristemas sadios o acúmulo do inibidor vai aumentando gradualmente ao longo dos estágios de maturação mostrando que esses inibidores fazem parte da proteção natural dos tecidos meristemático. Esse mecanismo é observado para as duas variedades estudadas, porém de forma mais acentuada para a variedade resistente.

Nos ensaios de imunodeteção de meristemas infectados com o *M. perniciosa* também foi evidenciado um acúmulo diferencial referente á uma proteína de aproximadamente 85Kda que mencionado como artefatos. Esses artefatos também foram encontrados em folhas maduras de cacau por imunodeteção com o anticorpo

contra a cistatina (inibidor de cisteíno-protease) do *Theobroma cacao*. Essa proteína de aproximadamente 85 kDa também acumulava de forma diferenciada à inoculação ao *Mp*. Nesse trabalho foi considerado que esses artefatos representavam uma proteína multicistatinas. (Pirovani et al., 2010).

No banco de dados genômico (ncbi) foi publicado em agosto de 2012 uma sequência referenciada como uma cadeia inter-alfa-inibidor de tripsina do *Theobroma cacao*, essa sequência apresenta um peso molecular teórico de 83,6 Kda. Supomos que a proteína detectada refere-se à esse inibidor de tripsina de alto peso molecular, entretanto pouco se conhece sobre essa proteína, numa busca por Blastp (<http://web.expasy.org/cgi-bin/blast/blast.pl>), foi encontrada alta similaridade com mais de 100 proteínas não caracterizadas. No banco genômico do cacau (<http://esttik.cirad.fr/>) foi encontrado dois contigs referentes à essa sequência da cadeia inter-alfa-inibidor de tripsina (Tc09_p006720 e Tc00_p013520).

6. Conclusão

Mediante os resultados apresentados TcIT é um inibidor de tripsina do tipo kunitz com grande potencial de aplicação biotecnológica, pois apresenta características bioquímicas que podem ser empregados no melhoramento genético de plantas e no *Theobroma cacao* desempenha um importante mecanismo natural de defesa da planta.

7. Referências Bibliográficas

- Almonte A. G.; Sweatt J. D. Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: Roles in synaptic function and behavior. Review. **Brain Research**. 1407: 107 – 122. 2011.
- Antuch W.; Berndt K.D.; Chavez M.A.; Delfín J.; Wüthrich K. The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. **Eur J Biochem**, 675–84. 1993.
- Argout X.; Fouet O.; Wincker P.; Gramacho K. P.; Legavre T.; Sabau X.; Risterucci A.M.; Da Silva C.; Cascardo J.; Allegre M.; Kuhn D.; Verica J.; Courtois B.; Loor G.; Babin R.; Sounigo O.; Ducamp M.; Gultinan M.J.; Ruiz M.; Alemanno L.; Machado R.; Phillips W.; Schnell R.; Gilmour M.; Rosenquist E.; Butler D.; Maximova S.; Lanaud C. Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. **BMC Genomics**. 30: 549-512. 2008.
- Argout X.; Salse J.; Aury J.M.; Gultinan M.; Droc G.; Gouzy J.; Allegre M.; Chaparro C.; Legavre T.; Maximov S.N.; Abrouk M.; Murat F.; Fouet O.; Poulain J.; Ruiz M.; Roguet Y.; Goud M. R.; Barbosa-Neto J.F.; Sabot F.; Kudrna D.; Ammiraju J. S.; Schuster S. C.; Carlson J.; Sallet E.; Schiex T.; Dievart A.; Kramer M.; Gelley L.; Shi Z.; Bérard A.; Viot C.; Boccara M.; Risterucci A. M.; Guignon V.; Sabau X.; Golser M. J. A.; Ma Z.; Zhang Y.; Brown S.; Wolfgang B. M.; Song X.; Clement D.; Rivallan R.; Tahiri M.; Akaza J.M.; Pitollat B.; Gramacho K.; Hont A. D.; Brunel D.; Infante D.; Kebeil I.; Costet P.; Wing R.; McCombie I.W.R.; Guiderdoni E.; Quetier F.; Panaud O.; Wincker P.; Bocs S.; Lanaud C. The genome of *Theobroma cacao*. **Nature GeNetics**. 43: 101- 108. 2011.
- Barrett A.J.; Rawlings N.D. “Species” of peptidases. **Biological chemistry**. 11: 1151–1157. 2007.
- Benjakul S.; Visessanguan W.; Thummaratwasik P. Isolation and characterization of trypsin inhibitors from some Thai legume seeds. **Journal of Food Biochemistry**, 24: 107–127. 2000.
- Biehl B.; Wewetzer C.; Passern D. Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. **J Sci Food Agric** 33:1291-1304. 1982.
- Bode W.; Huber R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. Review. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1477: 241-252. 2000.
- Brito L.; Lopes A.R.; Parra J.R.P.; Terra W.R.; Silva-Filho M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by synthesis of new proteinases. **Comp. Biochem. Physiol. B** 128: 365– 375. 2001.

Buczek O.; Koscielska K. K.; Krowarsch D.; Dadlez M.; Otlewski J. Analysis of serine proteinase-in-hibitor interaction by alanine shaving. **Protein Sci.** 11: 806–819. 2002.

Buller A. R.; Townsend C. A. Intrinsic evolutionary constraints on protease structure, enzyme acylation, and the identity of the catalytic triad. **PNAS Plus.** E653–E661. 2013.

Carlinia C.R.; Grossi-de-Sá M. F.; Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon.** 40: 1515–1539. 2002.

Ceita G. O.; Macêdo J.N.A.; Santos T. B.; Alemanno L.; Gesteira A.S.; Micheli F.; Mariano A.C.; Gramacho K.P.; Silva D.C; Meinhardt L.; Mazzafera P.; Pereira G.A.G; Cascardo J.C.M. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Science.** 173: 106-117. 2007.

Chaudhary, N.S., Shee, C., Islam, A., Ahmad, F., Yernool, D., Kumar, P., Sharma, A.K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Putranjiva roxburghii* seeds. **Phytochemistry** 69: 2120–2126. 2008.

Chen Z.; Cao Z.; Li W.; Wu Y. Cloning and characterization of a novel Kunitz-type inhibitor from scorpion with unique cysteine framework. **Toxicon** 72: 5- 10. 2013.

Chow A.W.; Fathollahi B.; Spaid M.A.; Winoto A. Methods, devices and systems for characterizing proteins. Patent **Application publication.** Feb 3, 2005.

Constantin C.; Quirce S.; Grote M.; Touraev A.; Swoboda I.; Stoecklinger A.; Mari A.; Thalhamer J.; Heberle-Bors E.; Valenta R. Molecular and immunological characterization of a wheat serine proteinase inhibitor as a novel allergen in baker's asthma. **J Immunol.** 11:7451-7460. 2008.

Cruz A. C.B.; Massena F. S.; Migliolo L.; Macedo L. L.P.; Monteiro N. K.V.; Oliveira A. S.; Macedo F. P.; Uchoa A.F.; Grossi de Sá M. F.; Vasconcelos I.M.; Murad A. M.; Franco O. L.; Santos E.A. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from Catanduva (*Piptadenia moniliformis*) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry** 70: 61-68. 2013.

De Leo F.; Volpicella M.; Licciulli F.; Liuni S.; Gallerani R.; Ceci L.R. PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. **Nucleic Acids Res.** 30: 347–348. 2002.

De Paula C.A.; Coulson-Thomas V.J.; Ferreira J.G.; Maza P.K.; Suzuki E. *Enterolobium contortisiliquum* trypsin inhibitor (EcTI), plant proteinase inhibitor, decreases in vitro cell adhesion and invasion by inhibition of Src protein-focal adhesion kinase (FAK) signaling pathways. **J Biol Chem.** 287: 170–182. 2012.

Deshimaru M.; Hanamoto R.; Kusano C.; Yoshimi S.; Terada S. Purification and characterization of proteinase inhibitors from wild soja (*Glycine soja*) seeds. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 9: 1897–1903. 2002.

Dia V.P.; Gomez T.; Vernaza G.; Berhow M.; Chang Y.K.; Mejia E.G. Bowman-Birk protease inhibitors from Kunitz and antinutrients and bioactive modified by germination and hydrolysis in Brazilian soybean cultivar BRS 133. **J Agric Food Chem**. 7886-94. 2012.

Dodson G.; Wlodawer A. Catalytic triads and their relatives. **Trends Biochem**. 23: 347 – 352. 1998.

Dombrowski J.E. Sodium chloride stress activation of wound-related genes in tomato plants. **Plant Physiol**. 132: 2098–2107. 2003.

Ee K.Y.; Zhao J.; Rehman A. Agboola S. Glycosylation, amino acid analysis and kinetic properties of a major Kunitz-type trypsin inhibitor from *Acacia victoriae* Bentham seeds. **Food Chemistry** 129: 1224–1227. 2011.

Fabbro S.; & Seeds, N.W. Plasminogen activator activity is inhibited while neuroserpin is up-regulated in the Alzheimer disease brain. **J. Neurochem**. 109, 303– 315. 2009.

Franco O.C.L.; Dias S.C.; Magalhães C.P.; Monteiro A.C.S.; Bloch J.C.; Melo F.R.; Oliveira-Neto O.B.; Monnerat R.G.; Grossi-de-Sá M.F. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Phytochemistry** 81–89. 2004.

Franco O.L.; Grossi-de-Sá M.F.; Sales M.P.; Mello L.V.; Oliveira A.S.; Rigden D.J. Overlapping binding sites for trypsin and papain on a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora*. **Proteins**. 49: 335–341. 2002.

Fujinaga M.; Cherney M.M.; Oyama, H.; Oda, K.; James, M.N. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 101, 3364–3369. 2004.

Gahloth D.; Selvakumar P.; Shee C.; Pravindra K.; Cloning, sequence analysis and crystal structure determination of a miraculin-like protein from *Murraya koenigii*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 494, 15–22. 2010.

Garantziotis S.; Lim Y-P.; Hollingswths J. W.; Foster W.M. Inhibition of inter-alpha trypsin inhibitor for the treatment of airway disease. United States **Patent Application Publication**. 1-19. 2011.

Gesteira A. S.; Micheli F.; Carels N.; Silva A. C.; Gramacho K. P.; Schuster I.; Macêdo J. N.; Pereira G. A. G.; Cascardo J.C.M. Comparative Analysis of Expressed Genes from Cacao Meristems Infected by *Moniliophthora perniciosa*. **Annals of Botany**. 100: 129–140. 2007.

Gilani G.S.; Cockell K.A.; Sepehr E. Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. **J. AOAC Int.** 3: 967-87. 2005.

Hackeng T.M.; Suijlen D.P.L.; Hemker H.C.; Apitz-Castro R.J. Thermostable inhibitors of activation of the blood clotting system through contact with foreign surfaces. **Patentscope.** 2013.

Hao H.; Sheng-D. Q.; Fang Q.; Chang-Ai W.; Guo-D. Y.; Cheng-Chao Z. NtKTI1, a Kunitz trypsin inhibitor with antifungal activity from *Nicotiana tabacum*, plays an important role in tobacco's defense response. **FEBS Journal.** 4076–4088, 2010.

Haq S.K.; Atif S.M.; Khan R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Arch Biochem Biophys** 431, 145–159. 2004.

Hartl M.; Giri A.P.; Kaur I.T.; Baldwin T. Serine Protease Inhibitors Specifically Defend *Solanum nigrum* against Generalist Herbivores but Do Not Influence Plant Growth and Development. **Plant Cell.** 4158–4175, 2010.

Howe, G.A.; Jander, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annu. Rev. Plant Biol.** 59, 41–66. 2008.

Hsu C.T.; Liao D-C.; Wu1 F-H.; Liu N-T.; Shen S-C.; Chou S-J.; Tung S-Y.; Yang C-H.; Chan M-T.; Lin C-S. Integration of molecular biology tools for identifying promoters and genes abundantly expressed in flowers of *Oncidium Gower Ramsey*. **BMC Plant Biology**, 1471-2229. 2011.

Huang G.J.; Sheu M.J.; Chen H.J.; Chang Y.S.; Lin Y.H. Growth inhibition and induction of apoptosis in NB4 promyelocytic leukemia cells by trypsin inhibitor from sweet potato storage roots. **J Agric Food Chem.** 2548-2553. 2007.

Huang H.; Qi S-D.; Qi F.; Wu C-A.; Yang G-D.; Zheng C-C. NtKTI1, a Kunitz trypsin inhibitor with antifungal activity from *Nicotiana tabacum*, plays an important role in tobacco's defense response. **FEBS Journal.** 277: 4076–4088. 2010.

Isaeva MP; Chausova V E; Zelepuga EA; Guzev KV; Tabakmakher V M; Monastyrnaya M M; Kozlovskaya E P. A new multigene superfamily of Kunitz-type protease inhibitors from sea anemone *Heteractis crispa*. **Peptides**, 2011

Jimenez, T.; Martin, I.; Labrador, E.; Dopico, B. A chickpea Kunitz trypsin inhibitor is located in cell wall of elongating seedling organs and vascular tissue. **Planta.** 45–55. 2007.

Jongsma M.A., Bolter C.J. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **J. Insect Physiol.** 43, p.885–895. 1997.

Kadokura H, Katzen F, Beckwith J: Protein disulfide bond formation in prokaryotes. **Annu Rev Biochem**, 72: 111-135. 2003.

Karageorgou P.; Manetas Y. The importance of being red when young: anthocyanins and the protection of young leaves of *Quercus coccifera* from insect herbivory and excess light. **Tree Physiol**. 5: 613-21. 2006.

Krishnamurthy P.; Singh R.J.; Tsukamoto C.; Parque J. H.; Lee J. D.; Chung G. Kunitz trypsin inhibitor polymorphism in the Korean wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.). **Plant Breeding**. 132: 311–316. 2013.

Krowarsch D.; Cierpicki T.; Jelen F.; Otlewski J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. Review. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci**. 60: 2427– 2444. 2003.

Kunitz, M.,. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **J. Gen. Physiol**. 30, 291—310. 1947a.

Kunitz, M.,: Isolation of a crystalline protein compound of trypsin and soybean trypsin inhibitor. **J. Gen. Physiol**. 30, 311— 320. 1947b.

Laskowski M. Jr, Qasim M.A.; Lu S.M. Interaction of standard mechanism, canonical protein inhibitors with serine proteinases. In: protein-Protein Recognition. Oxford **University Press**, pp. 228 – 279, Kleantous C. (ed.). Oxford. 2000.

Laskowski M. Jr.; Kato I. Protein Inhibitors of Proteinases. **Ann. Rev. Biochem**. 49: 593-626. 1980.

Lau J. K-C.; Cheng Y-K. SER-HIS-ASP catalytic triad in model non-aqueous solvent environment: A computational study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 16: 5797–5800. 2006.

Lawrence P.K.; Koundal K.R.; Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic J. Biotechnol**. 5, p.94–109. 2002.

Lee K.J.; Kim J.B.; Há B.K.; Kim S.H.; Kang S.Y.; Lee B.M.; Kim D.S. Proteomic characterization of Kunitz trypsin inhibitor variants, Tia and Tib, in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Amino Acids**. 43: 379–388. 2012.

Li X.C., Wang X.W., Wang Z.H., Zhao X.F., Wang J.X. A three-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor exhibiting domain inhibitory and bacteriostatic activities from freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. **Dev Comp Immunol**. 1229-38. 2009.

Liao, H., Ren, W., Kang, Z., Jiang, J.H., Zhou, X.J., Du, L.F., A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: isolation, characterization and activity on *Pieris rapae*. **Biotechnol. Lett**. 4: 653–658.2007.

Loebermann H.; Tokuoka R.; Deisenhofer J.; Huber R.; Human α 1-proteinase inhibitor. **J. Mol. Biol**. 177: 531-556. 1984.

Lopes, J.L.S., Valadares, N.F., Moraes, D.I., Rosa, J.C., Araujo, H.S.S., Beltramini, L.M., Physico-chemical and antifungal properties of protease inhibitors from *Acacia plumosa*. **Phytochemistry** 70: 871–879. 2009.

Macedo M.L., De Sá C.M., Freire M.D., Parra J.R., A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus* , **J. Agric. Food Chem.** 52: 2533-2540. 2004.

Majumder S.; Khamrui S.; Dasgupta J.; Dattagupta J. K.; Sen U. Role of remote scaffolding residues in the inhibitory loop pre-organization, flexibility, rigidification and enzyme inhibition of serine protease inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1824: 882– 890. 2012.

Mello G.C.; Oliva M.L.; Sumikawa J.T.; Machado O.L.; Marangoni S.; Novello J.C.; Macedo M.L. Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. **J Protein Chem.** 8: 625-32. 2001.

Mergulhão F.J.M.; Summers D.K.; Monteiro G.A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. **Biotechnology Advances.** 23: 177 – 202. 2005.

Migliolo L.; Oliveira A.S.; Santos E.A.; Franco O.L.; Sales M.P. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine- and cysteine-proteinases. **Journal of Molecular Graphics and Modelling.** 148–156, 2010.

Morrison S. C.; Savage G.P.; Morton J. D.; Russell A. C. Identification and stability of trypsin inhibitor isoforms in pea (*Pisum sativum* L.) cultivars grown in New Zealand. **Food Chemistry.** 100: 1–7. 2007.

Mosolov V.V.; Valueva, T.A.; Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. **Appl. Biochem. Microbiol.** 41: 227–246. 2005.

Nistal J. H.; Martín I.; Jiménez T.; Dopico B.; Labrador E. Two cell wall Kunitz trypsin inhibitors in chickpea during seed germination and seedling growth. **Plant Physiology and Biochemistry** 47: 181–187. 2009.

Oddepally R.; Sriram G.; Guruprasad L. Purification and characterization of a stable Kunitz trypsin inhibitor from *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds. **Phytochemistry.** 96: 26–36. 2013.

Oliva M. L. V.; Silva M.C.C., Sallai R. C.; Brito M. V.; Misako A.; Sampaio U. Novel subclassification for Kunitz proteinases e inhibitors from leguminous seeds. **Biochimie.** 92, 1667-1673. 2010.

Oliveira A.S.; Migliolo L.; Aquino R.O.; Ribeiro J.K.C.; Macedo L.L.P.; Andrade L.B.S.; Bemquerer M.P.; Santos E.A.; Kiyota S.; Sales M.P. Identification of a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds with Inseticidal

properties and Double activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 7342-7349. 2007.

Oliveira C.F.R.; Vasconcelos I.M.; Aparicioc R.; Freire M.G.M.; Baldasso P.A.; Marangonia S.; Macedo M.L.R. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. **Process Biochem.** 47: 929–935. 2012.

Osterwalder T.; Contartese J.; Stoeckli E.T.; Kuhn T.B.; Sonderegger P. Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. **EMBO J.** 15: 2944 – 2953. 1996.

Page M. J.; Cera E. D. Serine peptidases: Classification, structure and function. **Cell. Mol. Life Sci.** 65: 1220 – 1236. 2008.

Papuashvili M.N. Use of urinary Trypsin inhibitor for the diagnosis of the onset of AIDS. **Patente Application Publication**. Jun 5, 2001.

Paulillo L.C.M.S.; Sebbenn A.M.; Derbyshire M.T.V.C.; Góes-Neto A.; Brotto M.A.P.; Figueira A. Evaluation of in vitro and in vivo effects of semipurified proteinase inhibitors from *Theobroma* seeds on midgut protease activity of lepidopteran pest insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Vol. 81: 34–52. 2012.

Paulillo, L.C.M.S.; Lopes, A.R.; Cristofolletti, P.T.; Parra, J.R.P.; Terra, W.R.; Silva-Filho, M.C. Changes in midgut endopeptidases activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **J. Econ. Entomol.** 93, 892– 896. 2000.

Pereira K. R.B.; Botelho-Júnior S.; Domingues D. P.; Machado O. L.T.; Oliveira A. E.A.; Fernandes K. V.S.; Madureira H. C.; Pereira T. N.S. ; Jacinto T. Passion fruit flowers: Kunitz trypsin inhibitors and cystatin differentially accumulate in developing buds and floral tissues. **Phytochemistry**. 72: 1955–1961.2011.

Pirovani C. P.; Santiago A. S.; Santos L. S.; Micheli F.; Margis R.; Gesteira A. S.; Alvim F.C.; Pereira G. A. G.; Cascardo J. C. M.; *Theobroma cacao* cystatins impair *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth and are involved in postponing cell death symptoms. **Planta**. 232:1485–1497. 2010.

Pirovani C.P.; Carvalho H.A.; Machado R.C.; Gomes D.S.; Alvim F.C.; Pomella A.W.; Gramacho K.P.; Cascardo J.C.; Pereira G.A.; Micheli F.; Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**. 29: 239-2401. 2008.

Queenborough A.S; Metz M.R.; Valencia R.; Wright S.J. Demographic consequences of chromatic leaf defence in tropical tree communities: do red youngleaves increase growth and survival?. **Ann Bot.** 4: 677-84. 2013.

- Ramos V. S.; Cabrera O. G.; Camargo E.L.O.; Ambrósio A. B.; Vidal R.O.; Silva D. S. Guimarães L. C.; Marangoni S.; Parra J. R.P.; Pereira G.A.G.; Macedo M. L.R. Molecular cloning and insecticidal effect of *Inga laurina* trypsin inhibitor on *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 156: 148–158. 2012.
- Rawlings N. D.; Barrett A. J.; Bateman A. Asparagine Peptide Lyases a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. **The journal of Biological Chemistry**. 12: 38321–38328. 2011.
- Rawlings N.D., Tolle D.P., Barrett A.J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochem. J.** 7: 705-716. 2004.
- Rawlings N.D.; Barrett J.; Evolutionary families of peptidases. **The Biochemical journal**. 290: 205–218. 1993.
- Ribeiro S. M.; Almeida C.; Calisto B. M.; Friedrich T.; Mentele R.; Sturzebecher J.; Prior P. F.; Pereira P.J. B. Isolation, Cloning and Structural Characterisation of Boophilin, a Multifunctional Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from the Cattle Tick. **PLoS ONE**.(3)e1624: 1-17. 2008.
- Richardson M.J;. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: **Methods in Plant Biochemistry**. New York: Academic Press. 259–305. 1991.
- Roy S.; and Dutta S. K. Genomic and cloning, Expression, Purification and Characterization of Chymotrypsin – Trypsin Inhibitor from winged bean seeds. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 2671-2676, 2009.
- Ruan J.J.; Chen H.; Shao J-R.; Wu Q.; Han X-Y. An antifungal peptide from *Fagopyrum tataricum* seeds. **Peptides**.1151–1158. 2011.
- Rufino F. P.S.; Pedroso V. M.A.; Araujo J.; França A.F.J.; Rabêlo L.M.A.; Migliolo L.; Kiyota S.; Santos E. A.; Franco O.L.; Oliveira A.S. Inhibitory effects of a Kunitz-type inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) seeds against insect-pests ' digestive proteinases. **Plant Physiology and Biochemistry**. 63: 70-76. 2013.
- Ryan C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defense against insects and pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.** 28:25–49. 1990.
- Scarpari L.M.; Meinhardt L.W.; Mazzafera P.; Pomella A.W.; Schiavinato M.A.; Cascardo J.C.M.; Pereira G.A.G. Biochemical characterization of cocoa (*Theobroma cacao* L.) infected by *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease. **J. Exp. Bot.** 56: 865–877. 2005.
- Seemuller E.; Lupas A.; Stock D.; Lowe J.; Huber R.; Baumeister W. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: A Threonine Protease. **SCIENCE**. 268: 579-582. 1995.

- Senthilkumar R.; Yeh K-W. Multiple biological functions of sporamin related to stress tolerance in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam). **Biotechnology Advances**. 30: 1309 – 1317. 2012.
- Silva C.R.S.; Figueira A. Phylogenetic analysis of Theobroma (Sterculiaceae) based on Kunitz-like trypsin inhibitor sequences. **Plant Syst. Evol.** 250: 93–104. 2005.
- Sin Suk-Fong; Chye Mee-Len. Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. **Plant** . 219: 1010–1022. 2004.
- Sin, S.F.; Chye, M.L.; Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. **Planta** 219, 1010–1022. 2004.
- Sivakumar S; Franco O.L; Tagliari P.D; Bloch Jr C; Mohan M. Thayumanavan B. Screening and Purification of a Novel Trypsin Inhibitor from *Prosopis juliflora* Seeds with Activity Toward Pest Digestive Enzymes. **Protein and Peptide Letters**, 561-565. 2005.
- Song, S.I., Kim, C.H., Baek, S.J., Choi, Y.D. Nucleoti de sequences of cDNAs encoding the precursors for soybean (*Glycine max*) trypsin inhibitors (Kunitz type). **Plant Physiol.** 101: 1401 –1402. 1993.
- Spencer M. E.; Hodge R. Cloning and sequencing of the eDNA encoding the major albumin of *Theobroma cacao*: Identification of the protein as a member of the Kunitz protease inhibitor family. **Planta**. 183:528- 535. 1991.
- Takai A.; Satoh M.; Matsuyama T.; Ito A.; Nakata R.; Aoyama T.; Inoue H. Secretion of miraculin through the function of a signal peptide conserved in the Kunitz-type soybean trypsin inhibitor family. **FEBS Letters**. 587: 1767–1772.2013.
- Tamayo D. O.; Wielsch N.; Labra A. B.; Vatos A.; Rodrigues R. F.; Heil M. Exclusive rewards in mutualisms: ant proteases and plant protease inhibitors create a lock – key system to protect Acacia food bodies from exploitation. **Molecular Ecology**. 1-14. 2013.
- Telang M., Srinivasan A, Patankar A, Harsulkar A, Joshi V, Damle A, et al. Bitter gourd protease inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Phytochemistry**. 63: 643–652. 2003.
- Valueva T.A.; Revina T.A.; Mosolov V.V. Reactive sites of the 21-kD protein inhibitor of serine proteinases from potato tubers. **Biochemistry (Mosc)**. 9: 1074-1088. 1999.
- Van Der Hoorn R. A. L. Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**. 59: 191-223. 2008.
- Voigt J.; Biehl B. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. **Food Chemistry**. 47: 145-151. 1993.

- Voigt J.; Kamaruddin S.; Heinrichs H.; Wrann D.; Senyuk V.; Biehl B. Developmental Stage-Dependent Variation of the Levels of Globular Storage Protein and Aspartic Endoprotease during Ripening and Germination of *Theobroma cacao* L. Seeds. **J. Plant Physiol.** 145: 299-307. 1995.
- Wang K.J.; Takahata Y.; Kono Y.; Kaizuma N. Allelic differentiation of Kunitz trypsin inhibitor in wild soybean (*Glycine soja*). **Theor Appl Genet.** 117:565–573. 2008.
- Wang KJ, Takahata Y, Kono Y, Kaizuma N. Allelic differentiation of Kunitz trypsin inhibitor in wild soybean (*Glycine soja*). **Theor Appl Genet** 117:565–573. 2008.
- Warshel A.; Naray-Szabo G.; Sussman F. Hwang J.K. How do serine proteases really work? **Biochemistry.** 9: 3629 –3637. 1989.
- Yang D.H.; Hettenhausen C.; Baldwin I.T. BAK1 regulates the accumulation of jasmonic acid and the levels. of trypsin proteinase inhibitors in *Nicotiana attenuatas* responses to herbivory. **J Exp Bot.** 62: 641–652. 2011.
- Yuan Ma; Zhao Q; Zhu Lu M; Wang J, Kunitz-type trypsin inhibitor gene family in *Arabidopsis* and *Populus trichocarpa* and its expression response to wounding and herbivore in *Populus nigra* . **Tree Genetics & Genomes.** 431–441. 2011.
- Zavala JA, Patankar AG, Gase K, Hui D, Baldwin IT. Manipulation of endogenous trypsin protease inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defences. **Plant Physiol.** 134, p.1181–1190. 2004.
- Zhang, Z., Li, Y., Li, C., Yuan, J., Wang, Z. Expression of a buckwheat trypsin inhibitor Gene in *Escherichia coli* and its effect on multiple myeloma IM-9 Cell proliferation. **Acta Biochim Biophys Sin.** 39. p. 701-707. 2007.
- Zhou D.; Lobo Y.; Batista I. F.C.; Marques-Porto R.,; Gustchina A.; Oliva M. L.V.; Wlodawer A. Crystal Structures of a Plant Trypsin Inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) and of Its Complex with Bovine Trypsin. **PLoS ONE.** 4: 62252. 2013.