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

CARACTERIZAÇÃO DE UM INIBIDOR DE SERINO-PROTEASE DO FUNGO *Moniliophthora roreri*, CAUSADOR DA MONILÍASE DO CACAUEIRO

GEISEANE VELOZO AMARAL

ILHÉUS – BAHIA - BRASIL
Fevereiro de 2020

GEISEANE VELOZO AMARAL

CARACTERIZAÇÃO DE UM INIBIDOR DE SERINO-PROTEASE DO FUNGO *Moniliophthora roreri*, CAUSADOR DA MONILÍASE DO CACAUEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como requisito para obtenção do título de título de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani
Coorientador (a): Prof. Virgínia Lúcia Fontes Soares

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular

ILHÉUS – BA HIA – BRASIL
Fevereiro de 2020

A485 Amaral, Geiseane Velozo.

Caracterização de um inibidor de serino-protease do fungo Moniliophthora roreri, causador da monilíase do cacaueiro / Geiseane Velozo Amaral. – Ilhéus, BA: UESC, 2020. xii, 69 f. : il.

Orientador: Carlos Priminho Pirovani.

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

Referências bibliográficas: f. 57-69.

1. Cacaueiro – Doenças e pragas. 2. Relação planta- patógeno. 3. Fungos fitopatogênicos. 4. Proteínas.

I.Título.

CDD 633.74

GEISEANE VELOZO AMARAL

CARACTERIZAÇÃO DE UM INIBIDOR DE SERINO-PROTEASE DO FUNGO *Moniliophthora roreri,* CAUSADOR DA MONILÍASE DO CACAUEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como requisito para obtenção do título de título de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular

APROVADA: 17 de Fevereiro de 2020

Drª Jannaína Velasquez da C Pinto
UFSB

Drª Andréa Miura da Costa
UESC

Drª Akyla Maria Martins Alves
UESC

Dr. Carlos Priminho Pirovani
UESC - Orientador

À minha mãe, por sonhar comigo essa vitória, pelas orações, incentivo e amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por estar sempre comigo, guiando as minhas trajetórias e me protegendo sempre.

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

À UESC, pela infraestrutura e aprendizado.

À FAPESB, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Priminho Pirovani, a quem tenho admiração, pela orientação, aprendizado, atenção e paciência.

À minha família, especialmente à minha mãe e meu pai pelo incentivo, apoio e ajuda desde o início.

Ao meu namorado pela força, compreensão e ajuda nos momentos de crises.

Aos amigos e colegas de laboratório, principalmente ao grupo Proteômicos, em especial à Malu, Andria, Ivina, Monique e Saline.

Um agradecimento especial à Monaliza, Keilane e Maria. Monaliza pelas contribuições intensas, correções, ajuda nas análises de bioinformática; à Maria pelos momentos de apoio, conselhos, às super correções da escrita e parceria sempre; e a Keilaninha, pelo grande apoio, risadas, parcerias, conselhos, e claro, pelas interpretações de protocolos.

Agradeço também ao Dr. Raner José, pela ajuda e dicas nas análises de bioinformática.

À técnica Vanessa Leite, pelas risadas, parcerias e preparo dos géis de poliacrilamida, e a todos os amigos do Centro de Biologia e Genética (CBG), pela colaboração.

E mais um agradecimento especial a todos os amigos e clientes que, direta ou indiretamente, contribuíram com palavras, conselhos, vibrações e orações.

ÍNDICE

EXTRATO ..... **ix**

ABSTRACT ..... **x**

1. INTRODUÇÃO **1**

2. OBJETIVOS **4**

2.1. Objetivo Geral 4

2.2. Objetivos Específicos 4

3. REVISÃO DE LITERATURA **5**

3.1. *Moniliophthora roreri,* o fitopatógeno fúngico causador da monilíase no 5

cacaueiro 5

3.1.1. Impactos socioeconômicos e distribuição geográfica de *M. roreri* .. 8

3.1.2. Formas de controle da monilíase 10

3.2. Proteases 12

3.3. Inibidores de proteases 15

3.4. Proteases e inibidores de proteases (IPs) na interação planta-patógeno 17

4. MATERIAIS E MÉTODOS **20**

4.1. Análise da sequência primária de MrSPI2 20

4.2. Alinhamento de MrSPI2 com sequências homólogas e construção do dendograma 21

4.3. Modelagem por homologia de MrSPI2 e da serino-protease do tipo subtilase SBT1 de *T. cacao* 21

4.4. *Docking* entre MrSPI2 e serino-proteases 22

4.5. Indução, expressão e purificação da proteína rMrSPI2 23

4.6. Análise de Dicroísmo Circular de rMrSPI2 24

4.7. Análise da atividade inibitória de rMrSPI2 24

4.8. Extração de proteínas totais da casca do fruto de *T. cacao* 25

4.9. Armadilha para captura da protease por CNBr-Sepharose 25

4.10. Obtenção Do Soro Imune À Proteína rMrSPI2 26

4.11. Avaliação do (Titulação) do anticorpo anti-rMrSPI2 por Dot blot 27

4.12. Purificação do anticorpo anti-rMrSPI2 por imunoadsorção ao antígeno rMrSPI2 28

4.13. Imunodetecção da proteína rMrSPI2 em extratos de *E. coli* 29
5. RESULTADOS **..... 30**
5.1. Análise da sequência primária de MrSPI2 30
5.2. Alinhamento entre MrSPI2 e sequências homólogas 31
5.3. Análise da estrutura tridimensional de MrSPI2 e a serino-protease SBT1 de *T. cacao* 33
5.4. *Docking* molecular entre MrSPI2 e as serino-proteases do tipo tripsina e subtilase 37
5.5. MrSPI2 é expressa na fração solúvel e insolúvel do extrato bacteriano 40
5.6. O Espectro de CD mostra que MrSPI2 é uma proteína termoinstável ... 42
5.7. rMrSPI2 é ativo e inibe a tripsina suína 44
5.8. Análise da capacidade de ligação do anticorpo anti-rMrSPI2 e Imunodetecção de rMrSPI2 em extratos de *E. coli* 45
6. DISCUSSÃO 48
7. CONCLUSÃO 55
8. PERSPECTIVAS 57
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56

EXTRATO

VELOZO, Geiseane Amaral. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Fevereiro de 2020. **CARACTERIZAÇÃO DE UM INIBIDOR DE SERINO-PROTEASE DO FUNGO *Moniliophthora roreri*, CAUSADOR DA MONILÍASE DO CACAUEIRO**. Orientador: Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani. Co-orientadora: Profa. Dra. Virgínia Lúcia Fontes Soares

A Monilíase é causada pelo fungo *Moniliophthora roreri,* um dos patógenos mais limitantes da produção de cacau (*Theobroma cacao* L.). Sabe-se que durante a interação planta-patógeno diversos mecanismos moleculares são ativados tanto pela planta quanto pelo organismo invasor. Dentre estes mecanismos destaca-se as proteases secretadas como proteínas de resistência em plantas e os inibidores de proteases secretados por fungos patogênicos para suprimir o sistema imune do hospedeiro. Dessa forma, em muitas interações planta-patógeno a inibição de proteases por efetores que atuam como inibidores de proteases é essencial para a virulência fúngica. Estudos proteômicos realizados com o micélio e com esporos não germinados do fungo *M. roreri* revelaram a presença de inibidores em esporos não germinados, sugerindo-os como fatores de virulência. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi caracterizar um inibidor de serino-protease do fungo *M. roreri*, aqui denominado MrSPI2 (Inibidor de serino-protease de *M. roreri* 1), um possível efetor que pode contribuir para a virulência no cacaueiro. A sequência primária do inibidor foi obtida a partir do banco de dados do NCBI, cuja ORF possui 423 pb codificando uma proteína com 141 resíduos de aminoácidos com massa molecular estimada de 16,3 kDa e ponto isoelétrico (pI) predito de 4,76. O alinhamento entre os homólogos da família I66 mostrou conservação de resíduos entre as folhas β2 e β3 e além disso, MrSPI2 possui elevada identidade de sequência com proteínas preditas em outros basidiomicetos. A estrutura tridimensional da proteína foi predita e é composta por folhas betas, duas alfa hélices e várias regiões de alças típicas de proteínas com estrutura β-trefoil, sendo confirmada por dicroísmo circular. A análise de *docking* mostrou que MrSPI2 se ajustou bem ao sítio reativo da tripsina suína e da subtilase do cacau, a SBT1. Para comprovar a interação de MrSPI2 com a SBT1, foi realizado uma captura em resina CNBr-Sepharose das proteínas presentes no fluido apoplasto e na casca do fruto de *T. cacao.* A proteína recombinante rMrSPI2 foi obtida por clonagem e expressão em *Escherichia coli,* sendo purificada da fração solúvel do extrato bacteriano por cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna contendo cobalto. O perfil do gel SDS-PAGE mostrou a presença de uma proteína de 18 kDa purificada a partir da fração solúvel do extrato de *E. coli Rosetta(DE$_3$)*. A capacidade inibitória de MrSPI2 foi testada contra a tripsina suína por meio da hidrólise do substrato cromogênico BApNA, mostrando que a proteína produzida em bactéria é ativa, alcançando 38% de inibição da serino-protease. Os espectros de CD indicaram uma alteração na estrutura secundária nas temperaturas de 25 ºC e 95 ºC caracterizou a proteína como termoinstável. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que MrSPI2 é uma proteína inibitória que atua contra a tripsina suína, interage com dois tipos de serino-proteases do tipo tripsina e subtilase e que a proteína rMrSPI2 produzida em *E. coli* é ativa. Em conclusão, o inibidor rMrSPI2 apresenta potencial

para ser um fator de virulência de *M. roreri* secretado durante a infecção no *T. cacao,* podendo ser considerado como alvo para o desenvolvimento de estrátegias para o controle da doença e entendimento do mecanismo de ataque do fungo.

Palavras-chave: Interação planta-patógeno, subtilase, tripsina, Monilíase

ABSTRACT

VELOZO, Geiseane Amaral. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Fevereiro de 2020. **CHARACTERIZATION OF A SERINE PROTEASE INHIBITOR OF THE FUNGUS *Moniliophthora roreri*, WHICH CAUSES COCOA MONILIASIS.** Advisor: Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani. Advisor Committee Member: Profa. Dra. Virgínia Lúcia Fontes Soares.

Moniliasis is caused by the fungus *Moniliophthora roreri*, one of the most limiting pathogens of cocoa production (*Theobroma cacao* L.). It is known that during the plant-pathogen interaction several molecular mechanisms are activated by the plant and the invading organism. Among these mechanisms, proteases are secreted as resistance proteins in plants and protease inhibitors secreted by pathogenic fungi stand out to contain the host's immune system. Thus, in many plant-pathogen interactions, protease inhibition by effectors that act as protease inhibitors is essential for fungal virulence. Proteomic studies carried out with the mycelium and non-germinated spores of the fungus *M. roreri* revealed the presence of inhibitors in non-germinated spores, suggesting them as virulence factors. In this way, the aim of this study is to characterize a serine protease inhibitor of the fungus *M. roreri*, here called MrSPI2, a possible effector that can contribute to virulence in cocoa. The primary sequence of the inhibitor was obtained from the NCBI database whose ORF has 423 bp encoding a protein with 141 amino acid residues with an estimated molecular mass of 16.3 kDa and a predicted isoelectric point (pI) of 4.76. The alignment between the I66 family counterparts showed conservation of residues between the β2 and β3 leaves and in addition MrSPI2 has high sequence identity with proteins predicted in other basidiomycetes. The three-dimensional structure of the protein has been predicted and is composed of beta sheets, two alpha helices and several regions of typical protein loops with beta-trefoil structure, being confirmed by circular dichroism. Docking analysis shows that MrSPI2 adjusted well to the reactive site of swine trypsin and cocoa subtilase, SBT1. To prove the interaction of MrSPI2 with SBT1, a CNBr-Sepharose resin capture the proteins present in the apoplastic fluid and in the skin of the *T. cacao* fruit was performed. The results of the capture were analyzed by mass spectrometry. The recombinant protein rMrSPI2 was obtained by cloning and expression in *Escherichia coli*, being purified from the soluble fraction of the bacterial extract by affinity chromatography, using a column containing cobalt. The profile of the SDS-PAGE gel showed the presence of an 18 kDa protein purified from the soluble fraction of the *E. coli* Rosetta (DE3) extract. The inhibitory capacity of MrSPI2 was tested against porcine trypsin by hydrolysis of the chromogenic substrate BApNA, showing that the protein produced in bacteria is active, reaching 38% inhibition. The CD spectra indicated a change in the secondary structure at temperatures of 25 ºC and 95 ºC, characterizing the protein as thermounstable. Polyclonal antibodies against the recombinant protein have been produced in mice and will be used to analyze the presence of an inhibitor homologous to the MrSPI2 protein in the mycelia of *M. perniciosa* to suggest the stage of

development of the fungus that occurs the protein expression. The results obtained so far demonstrate that MrSPI2 is an inhibitory protein, interacting with two types of serine proteases from the trypsin and subtilase family and that the rMrSPI2 protein produced in *E. coli* is active. In conclusion, it has the potential to be a virulence factor of M. roreri secreted during infection in T. cacao, and can be considered as a target for the development of strategies for controlling the disease and understanding the mechanism of attack of the fungus.

Key-words: Plant-pathogen interaction, subtilase, trypsin, moniliasis

Lista de Figuras

Figura 1: Esporogênese de *Moniliophthora roreri* e Septo doliporo do micélio vegetativo do pseudoestroma de um fungo Basidiomiceto.....7
Figura 2: Sintomatologia de *M. roreri* nas fases biotrófica e necrotrófica.....8
Figura 3: Alinhamento dos inibidores de tripsina fúngicos com estrutura β-trefoil pertencentes à família I66 da classificação MEROPS.....32
Figura 4: Alinhamento de sequência de aminoácidos de inibidores de serino-proteases de diferentes basidiomicetos.....33
Figura 5: Dendograma construído de acordo com a similaridade de MrSPI2 com outro inibidores homólogos de basidiomicetos.....33
Figura 6: Estrutura tridimensional de MrSPI2 a partir do molde de um inibidor de protease de *Coprinopsis cinerea* (3VWC.1 PDB).....35
Figura 7: Validação do modelo tridimensional de MrSPI2 predito.....36
Figura 8: Estrutura tridimensional da serino-protease de *T. cacao,* SBT1.7.....37
Figura 9: Validação da estrutura tridimensional de SBT1.7 predita.....38
Figura 10: *Docking* entre MrSPI2 e a tripsina suína.....39
Figura 11: Principais resíduos envolvidos durante a interação de MrSPÌ2 e a tripsina de *Sus scrofa* (PDB 1LDT).....39
Figura 12: Docking entre MrSPI2 e uma Subtilase de *T. cacao*.....40
Figura 13: Interação detalhada entre MrSPI2 e a subtilase de *T. cacao*.....41
Figura 14: Representação esquemática da dobra β-trefoil envolvidas na inibição das proteases e representação da estrutura β-trefoil.....41
Figura 15: Mapa físico da estratégia de clonagem de rMrSPI2.....42
Figura 16: Expressão e purificação de rMrSPI2.....43
Figura 17: Avaliação dos espectros da estrutura secundária de rMrSPI2.....44
Figura 18:*Unfolding* e *Refolding* de rMrSPI2 em pH 7……...45
Figura 19: Teste de atividade inibitória de MrSPI2 contra a tripsina suína……..46
Figura 20: Análise da titulação dos antissoros.....47
Figura 21: Imundetecção de rMrSPI2 nos extratos de *E. coli* utilizando anticorpo anti-rMrSPI2 sem purificar.....48
Figura 22: Imunodetecção do inibidor de tripsina, rMrSPI2, em extratos proteico de *E. coli* com o anticorpo anti-rMrSPI2 purificado.....49

1. INTRODUÇÃO

A monilíase, uma das doenças mais limitantes das plantações de cacau, é causada pelo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* (AIME E PHILLIPS-MORA, 2005; PHILLIPS-MORA E WILKINSON, 2007). Este fungo é nativo da Colômbia e ocorre em países da América do Sul e Central, causando grandes impactos econômicos e ambientais (SÁNCHEZ et al., 2012). No Brasil, a sua presença ainda não foi detectada, porém há um grande risco de introdução da doença no país, uma vez que ocorre na região amazônica de países que fazem fronteira com o Brasil, como Bolívia, Peru, Colômbia e Venezuela (BARBOSA et al., 2018). Embora existam algumas formas de controle da doença (manejo da cultura, controle químico e biológico), há ainda grandes perdas na produção de cacau que pode variar de 30 a 100% (PHILLIPS-MORA & WILKINSON 2007). Assim, mais estudos são necessários para auxiliar nas estratégias de controle da doença para que haja redução dos impactos nas plantações e o aumento da produção de cacau.

O fungo *M. roreri* infecta apenas os frutos das espécies pertencentes aos gêneros *Theobroma* e *Herrania* (BAILEY et al., 2018), podendo causar diversos sintomas tanto interna como externamente, bem como a perda total do fruto (EVANS, 2016a). Após o contato com o hospedeiro, os meiósporos infectantes germinam na superfície do fruto e penetram através da cutícula ou pelos estômatos. Por ser um fungo hemibiotrófico, possuindo duas fases em seu ciclo de vida, a fase biotrófica, caracterizada por hifas monocarióticas que se desenvolvem intercelularmente (apoplasto) e a fase necrotrófica tipificada por hifas estreitas, de paredes finas, que se desenvolvem intracelularmente (PHILLIPS-MORA E WILKINSON, 2007; EVANS, 2007; BAILEY et al., 2013). Ao final desta fase é produzido uma grande quantidade de esporos altamente adaptados para disseminação e sobrevivência (EVANS et al., 2002 e 2003).

De maneira geral, em uma interação planta-patógeno, é necessário que haja troca de sinais, percepção e capacidade de resposta a sinais, que são essenciais para a sobrevivência de ambos os organismos (CURSINO et al., 2003; SPOEL E DONG, 2012; DALIO et al., 2014). Assim, diversos mecanismos moleculares de defesa e ataque são ativados tanto pela planta quanto pelo patógeno (CURSINO et al., 2003; DALIO et al., 2014; JASHNI et al., 2015).

As plantas evoluíram um sistema imune eficiente capaz de reconhecer a presença do invasor e impedir a sua propagação (ROUX et al., 2014; SPOEL E DONG, 2012). As duas vias de sinalização de resposta imune das plantas são a PTI (*PAMP-Triggered Immunity*), que está associada à imunidade desencadeada por PAMPs ou MAMPs (Padrão Molecular Associado a Patógeno ou Microrganismo) e a ETI (*Effector-Triggered Immunity),* que está associada à imunidade desencadeada por efetores (JONES E DANGL, 2006; SPOEL E DONG, 2012). Em contrapartida, como resultado da co-evolução os patógenos apresentam diversas estratégias de ataque capaz de suprimir o sistema de defesa do hospedeiro e promover a doença (DE JONGE et al, 2010; DALIO et al., 2014; JASNHI et al., 2015; FIORIN et al., 2018). Os fungos fitopatogênicos secretam inúmeros efetores com potencial para manipular a defesa das plantas (JASNHI et al., 2015; TORUÑO et al., 2016).

Dentre as moléculas de defesa envolvidas na PTI (resposta imune) têm-se as proteases, que atuam como proteínas de resistências (R) reconhecendo moléculas efetoras de fungos patogênicos (KASCHANI et al., 2010; HOU et al., 2018). As proteases podem atuar no espaço extracelular (apoplasto), modificando os receptores da superfície e proteínas da matriz extracelular, bem como em diferentes compartimentos celulares como vacúolo, citoplasma, cloroplasto e núcleo, modulando a sinalização imunológica ou ativando a PCD (morte celular programada) (DIAZ-MENDOZA et al, 2016; BALAKIREVA E ZAMYATNIN, 2018; HOU et al, 2018). O tomate secreta as cisteíno-proteases apoplásticas C14 e Rcr3 que conferem resistência a diferentes patógenos como *Cladosporium fulvum* e *Phytophthora infestans* (KRUGER et al., 2002; KASCHANI et al., 2010). As serino-proteases do tipo Subtilases também estão associadas na resposta de defesa em plantas, mostrando regulação positiva após infecção por patógenos (TIAN et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2016 e 2018; NORERO et al., 2016). A subtilase SBT3.3 de *Arabidopsis thaliana* regula positivamente a resistência aos patógenos *Pseudomonas syringae* e *Hyaloperonospora arabidopsidis* (RAMIREZ et al., 2013). Em *Solanum tuberosum*, análises do perfil de expressão em folhas mostraram que vários genes de Subtilase aumentaram sua expressão após a infecção por *P. infestans*, evidenciando o papel dessa família de protease na resposta imune (NORERO et al., 2016).

Os fitopatógenos, por sua vez, secretam efetores que são direcionados às proteases para superar o sistema de defesa das plantas. Com isso, eles conseguem

se instalar, se desenvolver e promover a infecção (VAN DER HOON, 2008; JASHNI et al., 2015). Diversos efetores de patógenos atuam como inibidores de proteases para superar a defesa mediada por proteases (JASHNI et al., 2015; TORUÑO et a., 2016). Assim, as proteases e seus inibidores têm sido bastante estudados durante a interação planta-patógeno e demonstram um papel importante na ETI (VAN DER HOORN, 2008; JASHNI et al., 2015; CLEMENTE et al., 2019). O patógeno fúngico *C. fulvum* secreta o efetor Avr2 que inibe as cisteíno-proteases do tipo Papaína (PLCPs), RCR3 e PIP1 (Protease inibida por *Phytophthora* 1), secretadas no apoplasto para promover o seu crescimento (VAN ESSE et al., 2008). Estas proteases apoplásticas também são alvos dos efetores (inibidores de proteases extracelular do tipo cistatina 1) EPIC1 e EPIC2B secretados pelo patógeno *P. infestans* que causa a requeima do tomate e da batata (TIAN et al., 2007; SONG et al., 2009). Estes efetores apoplásticos também mostram elevada afinidade pela cisteíno-protease C14 secretada pelas plantas hospedeiras, tomate e batata (KASCHANI et al., 2010). Da mesma forma, o patógeno do milho (*Zea mays*), *Ustilago maydis*, secreta o inibidor de cisteíno-proteases, Pit2 (proteína importante para tumores 2), que inibe as cisteíno-proteases do milho CP1, CP2 (cisteíno-protease 2) e XCP2 (Cisteíno-protease do xilema 2) e suprime a defesa do hospedeiro (MUELLER et al., 2013).

Os inibidores desempenham importantes funções durante a interação planta-patógeno, pois atuam como fatores de virulência para muitos fungos patogênicos, inibindo a atividade de proteases hospedeiras (JASNHI et al., 2015; TORUNO et al., 2016). Dessa forma, estes inibidores se destacam como importantes alvos para estudos, podendo contribuir para desenvolvimento de novas estratégias para o controle de doenças fúngicas. Estudos proteômicos realizados com o micélio e com esporos não germinados do fungo *Moniliophthora roreri* mostram proteínas diferencialmente acumuladas entre esses dois estágios de desenvolvimento (ZUGAIB et al, 2016). Dentre estas, proteínas com possíveis funções de patogenicidade e um possível fator de virulência (inibidor de serino-protease) foram identificados (ZUGAIB et al., 2016).

A partir do trabalho anteriormente citado, surgiu o interesse de caracterizar inibidores de serino-protease secretados pelo fungo *M. roreri,* investigar o seu papel no patossistema *T. cacao-M. roreri* e auxiliar no conhecimento sobre como estas moléculas contribuem para a patogenicidade do fungo e assim, promover estratégias

de controle da doença. Diante disso, o primeiro inibidor de serino-protease do fungo *M. roreri* (MrSPI1) foi caracterizado (MENEZES, 2017). Esse inibidor, produzido por expressão heteróloga em *Escherichia coli*, reduziu a atividade da tripsina suína *in vitro* e mostrou acoplamento (docking) com a tripsina suína *in silico*. Estes resultados indicam que o inibidor rMrSPI1 interage com a serino-protease, constituindo importante alvo para investigação durante a interação do patógeno com o hospedeiro.

Desta forma, a hipótese deste trabalho é que o inibidor de serino-protease do fungo *M. roreri* constitui um importante fator de virulência inibindo serino-proteases relacionadas à defesa em *T. cacao.* Diante isso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar *in silico* um inibidor de serino-protease do fungo *M. roreri* e *in vitro* através de expressão em sistema heterólogo em *E. coli.*

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar *in silico* um inibidor de serino-protease do fungo *Moniliophthora roreri*, e *in vitro*, por meio de expressão heteróloga em *E. coli.*

2.2. Objetivos Específicos

i. Avaliar a estrutura primária e a conformação tridimensional da proteína rMrSPI2;

ii. Analisar níveis de identidade entre sequências homólogas de inibidores fúngicos da família I66;

iii. Avaliar possíveis interações do inibidor com proteases alvos do tipo serino-protease;

iv. Realizar estudos funcionais com a proteína recombinante rMrSPI2 para avaliação de capacidade inibitória contra a tripsina suína;

v. Analisar a estrutura secundária e estabilidade da proteína recombinante rMrSPI2;

vi. Realizar captura de proteases alvo do *T. cacao* utilizando o inibidor MrSPI2 imobilizado em resina de CNBr-Sepharose para confirmar interação *in silico;*

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Moniliophthora roreri,* o fitopatógeno fúngico causador da monilíase no cacaueiro

Moniliophthora roreri é um fitopatógeno fúngico causador da Monilíase, uma das principais doenças que afeta o cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). Esse fungo ocorre somente na América tropical e representa um dos principais fatores limitantes para os cultivos de cacau (AIME E PHILLIPS-MORA, 2005). Evidências moleculares, morfofisiológicas e fitopatológicas indicam que *M. roreri* é nativo da Colômbia devido à alta diversidade genética na região (PHILLIPD-MORA et al., 2007).

No início do século XX, *Moniliophthora roreri* foi descoberto no Equador. A partir disso, este fungo começou a ser estudado por J.B. Rorer (EVANS et al, 2002). Inicialmente, este fungo foi identificado como uma espécie do gênero *Monilia* (RORER,1918 apud EVANS, 1981). Posteriormente, Ciferri e Parodi descreveram o nome científico *Monilia roreri* em homenagem ao pesquisador pioneiro Rorer e, por isso, o nome científico ficou sendo *Monilia roreri* Ciferri. (EVANS et al., 2002). Assim, a espécie *Monilia roreri* foi classificada como um fungo Ascomiceto anamórfico devido à ausência de estágios meióticos ou estruturas sexuais. No entanto, através de análises taxonômicas ultraestruturais foi observada maturação basipetal dos esporos (crescimento do ápice em direção à base) (Figura 1A) e não acropetal como tipificada por *Monilia* spp e que o micélio do pseudoestroma possui septos doliporos (Figura 1B), características encontradas em Basidiomicetos. A partir disso, o novo gênero *Moniliophthora* foi descrito e o fungo foi classificado como *Moniliophthora roreri,* um fungo basidiomiceto anamórfico (EVANS et al., 2002 e 2003).

Estudos citológicos posteriores demonstraram a ocorrência de meiose durante a esporogênese e germinação, dessa forma, considerou-se o fungo um basidiomiceto teleomórfico (EVANS et al, 2002 e 2003), pertencente à família Marasmiaceae (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005). Logo, ficou evidenciado que o principal propágulo infectante é um meiósporo, uma estrutura altamente adaptada para disseminação, recombinação genética e sobrevivência (EVANS et al., 2002, 2003 e 2013). As análises de sequenciamento de DNA e análises filogenéticas mostraram que

Moniliophthora roreri e *M. perniciosa,* agente causador da vassoura de bruxa no cacau (AIME E PHILLIPS-MORA, 2005), são grupos irmãos (AIME E PHILLIPS-MORA, 2005).

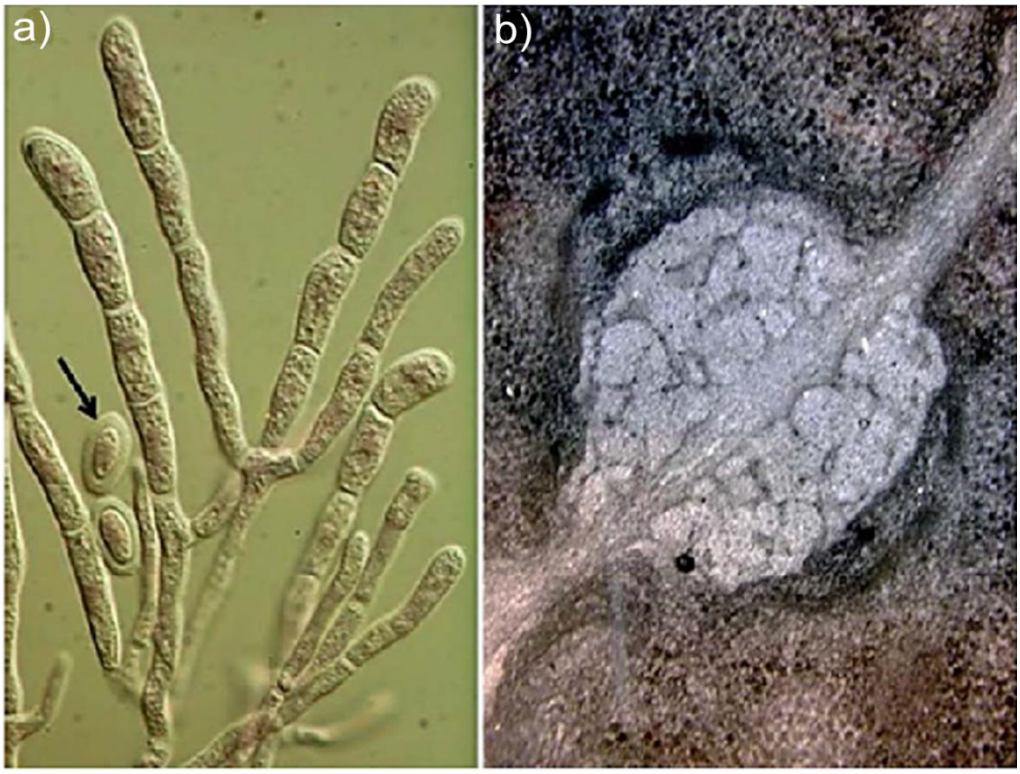

Figura 1. (A) Esporogênese de *M. roreri* e (B) Septo doliporo do micélio vegetativo do pseudoestroma de um fungo Basidiomiceto. Em A, microscopia de luz mostrando cadeias de esporos sendo formado do ápice para a base, com o mais antigo no ápice (basípeto); a seta mostra os esporos com parede espessada. Em B, microscopia eletrônica de transmissão (MET) do micélio vegetativo do pseudostroma, mostrando a presença de septo doliporo de um Basidiomiceto (BAILEY et al., 2018).

Ao contrário de *M. perniciosa,* que acomete diferentes tecidos do cacaueiro e outros hospedeiros*,* a infecção por *M. roreri* está limitada apenas aos frutos das espécies pertencentes aos gêneros *Theobroma* e *Herrania* (BAILEY et al, 2018)*.* Os frutos mais jovens (até três meses de idade) são mais suscetíveis e os efeitos na expressão dos sintomas, tanto internamente como externamente, são maiores, bem como a perda total do fruto (EVANS et al, 2002; EVANS, 2016a). Os frutos que são infectados na fase posterior do seu desenvolvimento apresentam amadurecimento precoce, podendo não apresentar mudanças externas (EVANS et al, 2002).

Após o contato com o hospedeiro, os meiósporos infectantes germinam na superfície do fruto e penetram através da cutícula ou pelos estômatos (EVANS et al, 2002). *M. roreri* é um fungo hemibiotrófico, possuindo duas fases em seu ciclo de vida, fase biotrófica e necrotrófica (PHILLIPS-MORA E WILKINSON, 2007; EVANS, 2007 e 2016a; BAILEY et al, 2013). A longa fase biotrófica (45-90 dias) é caracterizada por hifas monocarióticas que se desenvolvem intercelularmente (apoplasto). Durante essa fase, apesar do inchaço dos tecidos e malformações em alguns casos, os frutos permanecem assintomáticos (EVANS et al, 2002; GRIFFITH et al, 2003; EVANS, 2016a). A fase necrotrófica é tipificada por hifas estreitas, de paredes finas, que se desenvolvem intracelularmente (BAILEY et al, 2013). Após 90 dias, os sintomas externos que caracterizam essa fase são o aparecimento de lesões irregulares, áreas de maturação precoce, rachaduras, amêndoas com tecidos gelatinosos e manchas castanho-escuras em expansão que se unem cobrindo toda a superfície do fruto até o crescimento micelial branco a creme (Figura 2), formando um pseudoestroma, que constitui uma massa pulverulenta de esporos infectantes (EVANS et al., 2002; PHILLIPS-MORA e WILKINSON, 2007; SÁNCHEZ e GARCÉS, 2012; BAILEY et al., 2013; EVANS, 2016a). Esses esporos podem sobreviver por sete meses em frutos mumificados que produzem grande quantidade de esporos (mais de 7 bilhões por fruto) durante todo o período de esporulação (GARCÍA et al., 2015). Os esporos são facilmente liberados do pseudoestroma e podem se espalhar de forma rápida e eficiente através do movimento do ar, e consequentemente, o balanço das árvores, contaminando toda área com esporos infectantes (EVANS, 2016a). Outras formas de disseminação importantes são a chuva, animais e seres humanos, sendo o transporte de frutos infectados entre países, o principal fator de distribuição da doença (PÉREZ, 2018).

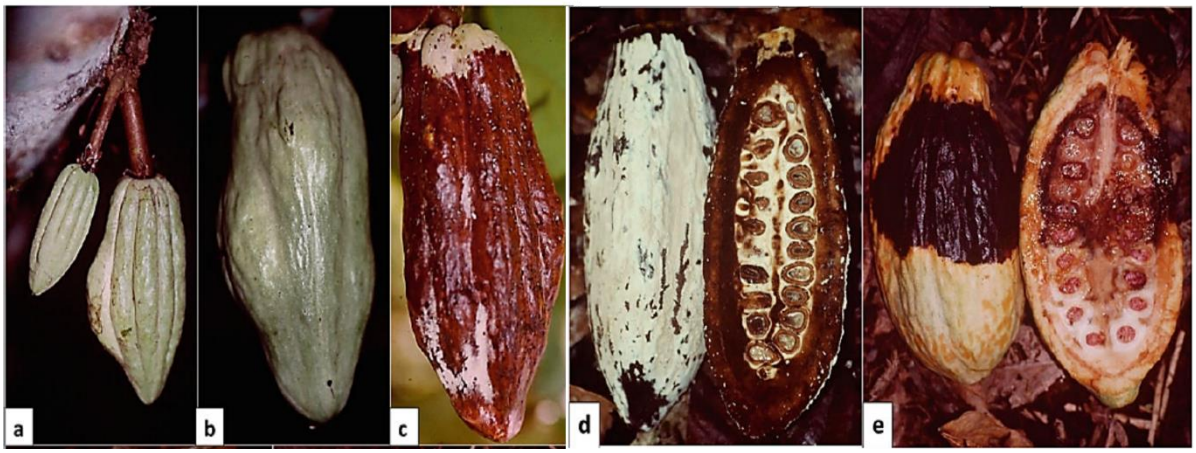

Figura 2.Sintomatologia de *Moniliophthora roreri* nas fases biotrófica e necrotrófica (EVANS, 2016a). a e b, Frutos jovens com 1 e 3 meses, respectivamente apresentando inchaço e deformação; c, Fruto (3-4 meses) mostrando inchaços e fase inicial de necrose; d, Fruto com pseudoestroma formado, apresentando necrose interna com compactação e destruição completa das amêndoas; e, Fruto apresentando mancha marron-escura, sem o pseudoestroma externo, mas com podridão interna e amêndoas com tecidos aquosa.

3.1.1. Impactos socioeconômicos e distribuição geográfica de *M. roreri*

Os efeitos da monilíase nos cultivos de cacau têm causado grandes impactos sobre a economia dos países da América tropical onde o *M. roreri* ocorre, representando uma grande ameaça à cacauicultura (EVANS, 2007; PHILLIPS-MORA & WILKINSON, 2007). Além do impacto econômico, observa-se também um consequente impacto ambiental, onde as terras são abandonadas por se tornarem menos sustentáveis (PHILLIPS-MORA, 2006). Acontece ainda, perda de habitat que afeta a vida selvagem e fragmentação de áreas arborizadas (SÁNCHEZ et al, 2015). A monilíase foi relatada como duas vezes mais destrutiva que a podridão parda, causada por *Phytophthora palmivora,* e mais perigosa e difícil de controlar do que a doença da vassoura-de-bruxa, causada por *M. perniciosa* (EVANS, 2002b; PHILLIPS-MORA e WILKINSON, 2007). As perdas causadas por este fungo podem variar de 30% a 100% dependendo de alguns fatores como idade da plantação, presença em plantações vizinhas afetadas, tempo de duração da doença no local e das condições climáticas (PHILLIPS-MORA & WILKINSON 2007).

O elevado potencial de disseminação de *M. roreri* é marcado por grandes devastações das plantações de cacau e seus impactos têm sido documentados em diferentes países e épocas (PHILLIPS-MORA & WILKINSON 2007: PÉREZ, 2018). Embora relatórios registrassem a ocorrência em cultivos de cacau em 1817, esta doença foi evidenciada pela primeira vez na Colômbia em 1851 (PHILLIPS-MORA E WILKINSON, 2007). Em algumas áreas da Colômbia, onde a monilíase e a vassoura de bruxa coexistem, houve perda de 80% da produção, sendo a monilíase a doença mais limitante nas plantações de cacau no país (ARANZAZU et al, 2000, EVANS, 2007). Em outros países onde essas doenças coexistem como no Peru (1988), Bolívia (2012) e Equador (1917), devido à grande devastação, há abandono das plantações

ou conversão para o cultivo de outras culturas (PHILLIPS-MORA e WILKINSON, 2007; PLOETZ, 2016).

A partir da sua área de distribuição nativa na Colômbia, *M. roreri* se disseminou progressivamente para outros países da América do Sul e Central. No Equador, desde que foi registrado pela primeira vez no início do século XX, *M. roreri* prejudicou fortemente a economia do país, que perdeu a condição de maior produtor mundial de cacau. A produção declinou de 50.000 a 30.000 toneladas (PLOETZ, 2016). Os impactos da doença no Peru têm sido substanciais, constituindo mais de 50% da área cultivada e em alguns casos têm levado os produtores a abandonarem as plantações (EVANS et al, 2016a). Os danos à produção na Costa Rica também têm sido grave, ocorrendo cerca de 72% de diminuição da produção por diferentes causas, dentre elas, a monilíase (PHILLIPS-MORA e WILKINSON, 2007).

Em 1941, o fungo *M. roreri* se espalhou para a Venezuela ficando restrito à região ocidental. Posteriormente, a doença foi confirmada em outros países como Panamá (1956), Nicarágua (1980), Honduras (1997) Guatemala (2002), Belize (2004) e México (2005) (PHILLIPS-MORA E WILKINSON, 2007). Mais recentemente, a doença foi relatada na Bolívia (2012) (PHILLIPS-MORA et al., 2015) e Jamaica (2016) (PHILLIPS-MORA E TEN HOOPEN, 2017; IPPC, 2016; PHILLIPS-MORA et al., 2015). Em termos de perda potencial e a dificuldade de gerenciamento, a monilíase é uma doença de grande preocupação para a economia (EVANS, 2007; BAILEY et al., 2018).

Nos últimos 60 anos, nota-se uma progressão gradual do fungo *M. roreri* para outros países da América Tropical , nos quais a sua existência não era verificada, demonstrando elevada agressividade (BAILEY et al., 2018). Assim, percebe-se que esse fungo continua numa fase invasiva com potencial para se espalhar em toda a América Tropical (EVANS, 2002; e EVANS et al., 2003). A presença de *M. roreri* na região amazônica de países que fazem fronteira com o Brasil, como Bolívia e Peru, apresenta grandes riscos de introdução da monilíase em plantações de cacau no país (GRIFFITH et al., 2003; RIOS-RUIZ, 2004). Mais recentemente, em 2018, segundo o órgão responsável pela defesa agropecuária da Bolívia (Senasag), a ocorrencia da monilíase foi confirmada no departamento de Pando, uma área que situa-se apenas 55 quilômetros de Brasileia no Acre, constituindo uma grande ameaça à cacauicultura nacional.

Apesar da dispersão pelo vento ser o principal meio de propagação do fungo, esta não explica a disseminação significativa a longas distâncias e barreiras geográficas (PHILLIPS-MORA E WILKINSON, 2007). Esta disseminação é melhor explicada pela propagação humana involuntária através do tráfego entre áreas infectadas e regiões livres do patógeno (PHILLIPS-MORA et al., 2007). Portanto, medidas de prevenção devem ser realizadas por países onde a doença está ausente e, nos países onde ocorre, o gerenciamento da doença e aquisição de variedades resistentes são essenciais para manter os cultivos de cacau nos países afetados.

3.1.2. Formas de controle da monilíase

A prevenção é a melhor estratégia a ser adotada por países ou áreas onde a doença está ausente. A disseminação através do trânsito de pessoas para as áreas livres da doença é o principal meio de dispersão (PHILLIPS-MORA E WILKINSON, 2007). A ocorrência da monilíase em países fronteiriços com o Brasil representa uma grande ameaça à cacauicultura. Dessa forma, há uma necessidade de atenção fitossanitária em suas fronteiras. No Brasil, *M. roreri* é considerado pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) como uma Praga Quarentenária Ausente no país (INSTRUÇÃO NORMATIVA 41/2008). No entanto, órgãos vinculados ao MAPA, como, a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira –CEPLAC -, discutem estratégias de prevenção da entrada da praga em território nacional, vinculadas ao Plano de Contingência para *M. roreri*. Existe ainda a Comissão Técnica Regional de Prevenção à Monilíase Bahia, composta pela ADAB, SEAGRI, CEPLAC, SFA-BA/MAPA, FAEB, IF-Baiano, INEMA, CAR, BAHIATER e UESC, que foi criada através da Portaria Estadual ADAB nº 160/2014, a fim de promover a integração das ações preventivas de fitossanidade e o fortalecimento interinstitucional.

Além disso, outras ações estão incluídas para reforçar as medidas de prevenção como, ações de treinamento de reconhecimento da monilíase, alerta para a possibilidade da introdução natural do fungo e para a importância da vigilância e prevenção (INSTRUÇÃO NORMATIVA MAPA Nº 13, DE 17/05/2012). O Ministério da Agricultura criou ainda, através da Portaria 131/2019, o Programa Nacional de Prevenção e Vigilância de Pragas Quarentenária Ausentes (PNPV) para reforçar as

ações de vigilância e pesquisa para evitar a entrada de pragas quarentenárias que não entraram no país.

Nos países onde a doença ocorre, diversas estratégias de gerenciamento foram adotadas (PÉREZ et al., 2018, BAILEY et al., 2018). Dentre elas, tem-se o manejo da cultura, controle químico e biológico e ainda o uso de variedades tolerantes, que se mostram mais promissoras, uma vez que as medidas de controle citadas possuem limitação. O manejo inclui redução das fontes de inóculo como remoção de frutos infectados antes da esporulação, preferencialmente semanal e durante o período de entressafra, para interromper o ciclo da doença; redução da altura da árvore (4 m) e redução da sombra para limitar a umidade (EVANS, 2016a; DE LA CRUZ et al., 2011; PÉREZ, 2018). Os fungicidas aplicados na colheita frequentemente são à base de cobre, mas têm sido ineficazes (EVANS, 2016a; KRAUSS et al., 2010; PÉREZ, 2018). Estudos com micoparasitas e fungos endofíticos, incluindo espécies de *Trichoderma,* mostraram potencial para serem utilizados como estratégias de biocontrole (EVANS et al., 2003b). Portanto, foram sugeridos simbiontes mutualistas que podem aumentar a resistência do hospedeiro aos patógenos (EVANS et al., 2003b). Mais estudos relacionados ao biocontrole de doenças no cacau, com maior atenção para a monilíase, vassoura de bruxa e podridão parda, continuam sendo desenvolvidos e podem fornecer um controle mais efetivo e sustentável da fitopatologia (TEN HOOPEN e KRAUSS, 2016).

O gerenciamento da monilíase, através de medidas de controle integradas, oferecem certas limitações devido aos custos, trabalho intensivo, variação da eficiência do manejo, capacidade de produção, contaminação de fazendas vizinhas mal administradas e vias de dispersão dos esporos (PHILLIPS-MORA E WILKINSON, 2007; KRAUSS et al., 2010; DE LA CRUZ et al., 2011; EVANS, 2016a; BAILEY et al., 2018). Por essas razões, o uso de variedades resistentes oferece o maior potencial para o gerenciamento da doença.

Dessa forma, o Programa de Pesquisa Agrícola Tropical e Centro de Educação Superior – CATIE - da Costa Rica busca identificar e desenvolver o germoplasma R/T (resistente/tolerante) ao *M. roreri* (PHILLIPS-MORA et al., 2013). O Programa de Melhoramento Genético – CATIE -, através de sua extensa diversidade genética presente na Coleção de Germoplasma, produziu variedades de genótipos de cacau altamente produtivas e tolerantes ao *M. roreri,* sendo eles o CATIE-R1, CATIE-R4,

CC-137, ICS-95, PMCT-5 e o CATIE-R6, a maior variedade comercial de R/T conhecida (PHILLIPS-MORA et al., 2013). Estes clones foram disponibilizados para mais de 6000 agricultores em diferentes países e, recentemente, foram introduzidos no México, no Brasil e nos EUA (BAILEY et al., 2018).

Os genótipos de cacau tolerantes ao *M. roreri* mais distribuídos na América do Sul são o ICS-95 e seu clone derivado CCN-51 (Colección Castro Naranjal – 51) (BOZA et al., 2014). O 'CCN 51' tornou-se um dos cultivares mais plantados, principalmente, devido a sua alta produtividade e resistência a doenças. No entanto, este cultivar não é desejado pela indústria de chocolates finos, devido à sua baixa qualidade organoléptica (BOZA et al., 2014).

Alguns estudos moleculares relacionados à interação de *T. cacao* - *M. roreri*, têm sido desenvolvidos a fim de identificar genes potenciais para serem avaliados quanto à superação dos mecanismos de defesa do cacau contra o fungo e assim, auxiliar no desenvolvimento de clones resistentes à doença modificados (editados) molecularmente (BAILEY et al, 2013; BAILEY et al, 2014; MEINHADART et al, 2014; ALI et al, 2014). Além disso, estes estudos podem contribuir para o estabelecimento de estratégias de controle da doença.

Um estudo com abordagem proteômica foi realizado com o micélio e os esporos não germinados do fungo *M. roreri* visando entender melhor os mecanismos de ataque do patógeno. Nesse trabalho, proteínas diferencialmente acumuladas entre esses dois estágios de desenvolvimento. Entre estas proteínas com possíveis funções de patogenicidade e um provável fator de virulência (inibidor de serino-protease) foram identificados (ZUGAIB, 2016). Logo, estudos bioquímicos e funcionais direcionados aos fatores de virulência de *M. roreri* ainda precisam ser realizados para ampliar o conhecimento de como estas moléculas contribuem para a patogenicidade do fungo. Proteases e Inibidores de proteases têm sido estudados devido aos seus papéis fundamentais relacionados à resposta imune e à patogenicidade, já evidenciados durante a interação planta-patógeno (VAN DER HONN, 2008; JASNHI et al., 2015; HOU et al., 2018).

3.2. Proteases

As proteases, também conhecidas como peptidases, proteinases ou enzimas proteolíticas são enzimas que realizam a hidrólise de ligações peptídicas (proteólise),

liberando peptídeos ou aminoácidos (VAN DER HOON, 2008). Essas proteases podem realizar clivagem das ligações peptídicas nas regiões internas, sendo chamadas de endopeptidases ou podem clivar ligações externas, na região N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxipeptidases), e são denominados exopeptidases (SANTOS et al., 2016).

A clivagem proteolítica ocorre devido à quebra de uma ligação cindível na cadeia peptídica (ligação química covalente que pode ser clivada) através do ataque nucleofílico, realizado pelo resíduo principal do sítio ativo da enzima, no grupo carbonil da cadeia peptídica do substrato (VAN DER HOON, 2008; NELSON E COX, 2018). Os resíduos do substrato onde ocorre a clivagem são conhecidos como P1 e P1'. De maneira geral, esses resíduos são localizados na extremidade N-terminal (amino-terminal) do substrato e são numerados P1, P2, P3, e os resíduos em direção à extremidade C-terminal (carboxi-terminal), que corresponde ao lado principal, são numerados P1', P2', P3'.

A bolsa de ligação ao substrato na protease é nomeada de acordo com a posição que o resíduo ocupa no substrato, exceto que o "P" é substituído pelo "S". Sendo assim, a bolsa de ligação S1 acomoda o resíduo P1 e a bolsa de ligação S3' acomoda o resíduo P3' (RAWLINGS et al, 2008, 2016).

O banco de dados MEROPS (RAWLINGS et al, 2018) contém a descrição de diferentes classes de proteases, que foram assim divididas de acordo com o mecanismo catalítico, ou seja, baseado no resíduo de aminoácido principal da tríade catalítica (responsável pelo ataque nucleofílico) (RAWLINGS, 2016; RAWLINGS et al, 2018). Desse modo, atualmente são conhecidas 7 classes de proteases: serino-protease, que possui uma serina no centro do seu sítio ativo, sendo a serina o principal resíduo de aminoácido catalítico; cisteíno-protease, que possui um resíduo de cisteína no sítio ativo; aspártico-protease, que utilizam dois resíduos de ácido aspártico; glutâmico-protease, que possui o glutamato em seu sítio reativo; treonino-protease, possuem uma treonina em seu sítio ativo, próximo a região N-terminal; asparagino-protease possui uma asparagina central no seu sítio ativo e metallo-protease, sendo que, esta última possui íons metálicos (geralmente zinco) em seu sítio catalítico (RAWLINGS et al, 2018). Baseado em evidências evolutivas, similaridade de sequências de aminoácidos dentre estas classes, as proteases estão agrupadas em 268 famílias e, de acordo com a estrutura terciária, estão divididas em 62 clãs

(RAWLINGS et al, 2018). Essas enzimas estão presentes em todos os seres vivos e são responsáveis pela regulação de diversos processos celulares envolvidos em respostas ao desenvolvimento e condições do ambiente (VAN DER HOON, 2008).

Sendo assim, as proteases atuam na degradação e remoção de proteínas não funcionais da célula, podendo também reciclar aminoácidos e possibilitar a realocação de recursos nitrogenados (DIAZ-MENDOZA et al, 2016). Além disso, a clivagem proteolítica pode regular a atividade de outra proteína através da remoção de domínios reguladores ou inibitórios e, consequentemente, contribuir para a geração, transdução e amplificação de sinais moleculares (EHRMANN E CLAUSEN, 2004). Outros processos biológicos nos quais as proteases estão envolvidas são: digestão, coagulação sanguínea, crescimento e proliferação celular e resposta imune do organismo (PAGE E CERA, 2008; HOU et al, 2018; BALAKIREVA et al., 2018; SALGUERO-LINARES E COLL, 2019).

Em plantas, numerosos processos requerem a participação das proteases, incluindo meiose, sobrevivência de gametófitos, embriogênese, formação de revestimento de sementes, deposição de cutícula, destino de células epidérmicas, desenvolvimento de estômatos, senescência de folha e respostas de defesa local e sistêmica (VAN DER HOON, 2008; DIAZ-MENDOZA et al, 2016; HOU et al, 2018; THOMAS E VAN DER HOON, 2018; BALAKIREVA E ZAMYATNIN, 2018; SALGUERO-LINARES E COLL, 2019). Ainda nos vegetais, muitas proteases podem atuar no espaço extracelular (apoplasto), modificando os receptores da superfície e proteínas da matriz extracelular, enquanto outras atuam em diferentes compartimentos celulares como vacúolo, citoplasma, cloroplasto e núcleo, onde clivam outras proteínas do sistema imune da planta para modular a sinalização imunológica ou para ativar a PCD (morte celular programada) (DIAZ-MENDOZA et al, 2016; HOU et al, 2018; BALAKIREVA E ZAMYATNIN, 2018).

Apesar dos papéis fundamentais das proteases para os organismos, a atividade descontrolada destas enzimas pode ser prejudicial, portanto, suas ações precisam ser estritamente controladas (RAWLINGS et al, 2004; LASKOWSKI E QASIM, 2000). Um dos mecanismos de controle acontece por meio da biossíntese dessas proteases como precursores inativos, chamados de zimogênios, que são armazenados e ativados quando necessários. A ativação pode ocorrer por uma ligação peptídica no NH_2-terminal ao sítio catalítico da enzima, o que assegura que a enzima ativa não

pode se formar antes da ativação proteolítica, em razão de todas as proteínas serem biossintetizadas a partir da extremidade do terminal NH_2 (LASKOWSKI E QASIM, 2000). Uma vez ativada, outro mecanismo muito importante que pode controlar a atividade excessiva das proteases se dá através da ação de inibidores proteicos, os quais formam complexos completamente inativos ou menos ativos com suas respectivas enzimas e promove a regulação ou inibição (LASKOWSKI E QASIM, 2000). Devido a sua função, os inibidores de proteases possuem potenciais aplicações na medicina, agricultura e biotecnologia.

3.3. Inibidores de proteases

Baseados em dados sobre interações entre proteases e inibidores encontrados na literatura, bem como parâmetros cinéticos de inibição (Ki), uma classificação referentes aos inibidores permitiu incluí-los ao banco de dados MEROPS em 2004 (RAWLINGS et al, 2004). A partir disso, várias famílias de inibidores proteicos foram identificadas, onde o sistema de classificação é semelhante àqueles usados para classificar as proteases, fundamentado em três níveis principais: inibidor, família e clãs (RAWLINGS et al, 2018). Atualmente são conhecidas 82 famílias (todas identificadas por uma letra e um número) e 39 clãs (RAWLINGS et al, 2018) de proteínas inibidoras de proteases.

Além disso, existem outros inibidores que não são proteínas, incluindo peptídeos e inibidores sintéticos, que foram denominados inibidores de moléculas pequenas (SMIs), os quais são importantes como drogas e reagentes de laboratório usados na caracterização de proteases em diversas pesquisas. Para estes inibidores, no entanto, não há um método para uma classificação específica, portanto, um tópico separado é fornecido sobre eles no MEROPS (RAWLINGS et al, 2018).

De modo geral, o banco de dados MEROPS dispõe de várias informações relevantes sobre os inibidores proteicos e suas proteases-alvo, como os homólogos que compõem uma família, a estrutura química, genoma encontrado, literatura, árvore filogenética e mecanismos inibitórios (RAWLINGS et al., 2018). As maneiras pelas quais os inibidores interagem com suas respectivas enzimas-alvos variam, porém dois tipos gerais de inibição podem ser reconhecidos: reações irreversíveis de

“aprisionamento” e reações reversíveis (interações canônicas) (LASKOWSKI E QASIM, 2000; KROWARSCH et al., 2003).

Nas reações irreversíveis ocorre a clivagem de uma ligação peptídica no sítio ativo do inibidor que desencadeia uma alteração conformacional, de modo que apenas as endopeptidases podem ser capturadas e inibidas (LASKOWSKI E QASIM, 2000; RAWLINGS et al, 2004). Neste tipo de interação, o inibidor não volta a sua conformação original e, portanto, esse tipo de proteína também pode ser descrita como um inibidor do tipo suicida. Inibidores da família das Serpinas, por exemplo, estão entre as proteínas que apresentam este mecanismo de inibição. Nessa forma de interação, a protease-alvo interage com a serpina e uma ligação do tipo canônica, inicialmente, é estabelecida. A partir da primeira interação ocorre uma clivagem no loop reativo do inibidor (RCL), na região C-terminal, e o loop clivado é inserido entre as folhas βA, modificando a estrutura das serpinas e fazendo que a protease seja deslocada em 70Å do local inicial da interação, isto é, para o lado oposto da molécula inibidora. Isto interrompe a estrutura e o local catalítico da enzima, de modo que a hidrólise não prossiga e o complexo covalente persista, inibindo irreversivelmente a protease alvo (HUNTINGTON et al., 2000; GETTINS, 2002).

Nas reações reversíveis, também conhecidas como mecanismo canônico “padrão” de inibição (LASKOWSKI E QASIM, 2000), o inibidor interage com o sítio ativo da protease de maneira semelhante ao substrato. Neste tipo de interação, o inibidor se liga fortemente a fenda catalítica da enzima tornando o complexo enzima-inibidor bem estável e de difícil dissociação. A maioria dos inibidores de serino-proteases apresenta esse tipo de inibição (LASKOWSKI E QASIM, 2000; KROWARSCH et al., 2013). Inibidores do tipo canônicos correspondem ao maior grupo de inibidores de proteases, estão distribuídos em todos os grupos de organismos e compreendem proteínas de 14 a 200 resíduos aminoácidos (KROWARSCH et al., 2013).

A alça (*loop*) de ligação do inibidor à protease-alvo possui sempre uma conformação canônica similar em todas as estruturas de inibidores. Este loop é convexo e se apresenta de forma estendida, exposto ao solvente, sendo perfeitamente complementar ao sítio catalítico côncavo da enzima. O loop de ligação corresponde ao local do sítio ativo do inibidor, que é composto pelos resíduos que abrangem o P3 - P3’, com a posição P1’ contendo o resíduo inibitório principal

(KROWARSCH et al., 2013). Os resíduos que seguem ou precedem o resíduo P1' são denominadas de regiões de contato secundário, influenciam na energia de ligação e potencializam a atividade do inibidor, os quais contribuem para uma maior estabilidade do complexo (BUCZEK et al., 2002; SWEDBERG et al., 2011).

Ao regular ou inibir a atividade das proteases, os inibidores desempenham importantes papéis em diversos mecanismos celulares. Não apenas como regulação no metabolismo intracelular (regulação endógena), inflamação e apoptose, mas também podem atuar contra proteases exógenas em respostas imunes e de patogenicidade (HAQ et al., 2004; VAN DER HOON, 2008; HORGER E VAN DER HONN, 2013). Dessa forma, estes inibidores se destacam como importantes alvos para diversos estudos, principalmente em relação à planta-patógeno, isto porque, há evidências que mostram proteases e inibidores de proteases envolvidas em diversas fitopatologias (VAN DER HOON, 2008; HORGER E VAN DER HONN, 2013; JASHNI et al., 2015; TORUNO et al., 2016).

3.4. Proteases e inibidores de proteases (IPs) na interação planta-patógeno

Durante toda a existência, as plantas sempre estiveram sob o ataque de diversos tipos de microrganismos, permitindo que estas evoluíssem um sistema imune eficiente capaz de reconhecer sinais da presença de patógenos, que por sua vez, apresentam a habilidade de comprometer as moléculas de defesa do hospedeiro e iniciar a infecção (SPOEL E DONG, 2012; DALIO et al., 2014). A interação entre proteases e inibidores (IPs) de plantas e patógenos demostraram ter um papel importante nas duas vias de sinalização de resposta imune de plantas, PTI (*PAMP-Triggered Immunity*) e ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (VAN DER HOORN, 2008; TORUNO et al., 2016; HOU et al., 2018).

A PTI está associada à imunidade desencadeada por PAMPs ou MAMPs (Padrão Molecular Associado a Patógenos ou Micróbios) como por exemplo, oligômeros de quitina liberados a partir de paredes celulares fúngicas, e ETI está associada à imunidade desencadeada por efetores, que evoluiu como resultado da co-evolução de patógenos e plantas (JONES E DANGL, 2006; SPOEL E DONG, 2012). A PTI, considerada a primeira linha de defesa, é induzida através do reconhecimento de PAMPs por proteínas PRRs (*Receptores de Reconhecimento – PAMPs*) localizadas na membrana plasmática, as quais desencadeiam uma cascata

de transdução de sinais ativando o sistema imune do hospedeiro (COUTO E ZIPFEL, 2016; YU et a., 2017). A ETI, por outro lado, consiste em uma segunda linha de defesa acionada pelo reconhecimento intracelular de moléculas efetoras de patógenos por produtos de genes de resistência (R) (Proteínas R) das plantas (JONES E DANGL, 2006; SPOEL E DONG, 2012).

Tanto a PTI quanto a ETI são extensivamente reguladas pelas plantas para potencializar a defesa e, por outro lado, é direcionada por patógenos para desencadear infecções (JASHNI et al, 2015; HOU et al, 2018). As proteases e os Inibidores de Proteases (IPs) são proteínas chaves secretadas pelas plantas durante a infecção, pois atuam por mediar o reconhecimento de moléculas do patógeno, impedindo assim o seu desenvolvimento, uma vez que levam à ativação do sistema imune do hospedeiro (SONG et al., 2009; KASCHANI et al., 2010; JASNHI et al., 2015; HOU et al., 2018). As proteases de plantas atuam tanto em respostas de defesa constitutivas quanto induzidas, tornando-se proteínas de resistência (PR) necessárias para ativar o sistema imune de plantas (SONG et al., 2009).

As proteases apoplásticas secretadas pelo tomate (*Solanum lycopersicum)* como a serino-protease do tipo subtilase (P69) e as cisteíno-proteases RCR3, PIP1 e C14 são requeridas para a resistência a diferentes patógenos (KRUGER et al., 2002; SONG et al., 2009; KASCHANI et al., 2010; BOZKURT et al., 2011). As serino-proteases do tipo subtilases, P69B e P69C, foram encontradas no fluido apoplastico do tomate e caracterizadas proteínas relacionadas à patogênese (R) desempenhando assim função de defesa contra patógenos, principalmente contra *Pseudomonas syringae* (JORDÁ, et al, 1999, 2000). Além disso, AtSBT3.3, um ortólogo do gene da protease P69C do tomate, encontrado em *Arabidopsis,* mostrou regulação positiva nas respostas imunes, contribuindo para a resistência à bactéria *P. seringae* pv. tomate (Pst) DC3000 e sua expressão ativa outros mecanismos de defesa dependentes do ácido salicílico (AS) para o estabelecimento da resposta imune amplificada (RAMÍREZ et al, 2013).

Para a resistência ao *Cladosporium fulvum,* o tomate requer a secreção da cisteíno-protease do tipo papaína, Rcr3, a qual regula a resposta imune (ETI) através do reconhecimento entre a proteína receptora Cf-2 e o efetor Avr2 do patógeno (DIXON et al., 2000; KRUGER et al., 2002). A atividade dessa protease foi confirmada por ser um importante componente de defesa, isto porque, Rcr3 também contribui

para a resistência do tomate ao patógeno *P. infestans* e ao nematoide *Globodera rostochiensis* (SONG et al, 2009; LOZANO-TORRES et al., 2012). As cisteíno-proteases do tomate PIP1 e C14 também são requeridas para a resistência contra *Phytophthora* (TIAN et al, 2007; SHABAB et al., 2008). Além disso, C14 contribui para a resistência da batata e do tabaco (*Nicotiana benthamiana*) contra *Phytophthora infestans* (KASCHANI et al., 2010).

No entanto, como uma forma de adaptação, os fitopatógenos secretam diversos efetores, incluindo proteases e inibidores de proteases no espaço apoplástico, para superar o sistema de defesa da planta, conseguir se instalar e ocasionar a doença (VAN DER HOON, 2008; JASHNI et al., 2015; TORUNO et al., 2016).

Efetores de patógenos secretados como inibidores de proteases têm sido observados em diversas interações planta-patógeno. Por exemplo, *C. fulvum* secreta Avr2, uma pequena proteína efetora rica em cisteína, para inibir as proteases apoplásticas do tomate RCR3 e PIP1, permitindo assim o seu desenvolvimento no hospedeiro (ROONEY et al., 2005; VAN ESSE et al., 2008). Rcr3 também é alvo do efetor VAP1 de *Globodera rostochiensis*, o que permite a detecção do patógeno pela proteína receptora Cf-2 do tomate para desencadear resistência (LOZANO-TORRES et al., 2012). Da mesma forma, *P. infestans* secreta dois inibidores de serino-proteases extracelular (EPI), (EPI1 e EPI10), que têm como alvo a subtilase apoplástica P69B (TIAN et al., 2004 e 2005). Além disso, este patógeno secreta ainda EPIC1 e EPIC2B, que têm como alvos seletivo as cisteíno-proteases RCR3, Pip1 e C14 da batata e tomate (TIAN et al., 2007; SONG et al., 2009; KASCHANI et al., 2010).

Além de IPs, a capacidade de adaptação dos fitopatógenos permite que estes também expressem diferentes tipos de proteases como mecanismos de contra-defesa essenciais para o desenvolvimento da doença (JASHNI et al., 2015, HOU et al., 2018). As proteases fúngicas possuem como alvos principais as quitinases e as β-1,3-glucanases secretadas pelas plantas para degradarem componentes da parede celular fúngica (SLAVOKHOTOVA et al., 2014; JASHNI et al., 2015). Por exemplo, *Fusarium verticillioides* secreta uma metaloprotease, a Fungalisina que degrada quitinases de plantas e demonstrou ter papel importante no desenvolvimento de fungos (SLAVOKHOTOVA et al., 2014). Porém, esta fungalisina foi inibida por peptídeos antimicrobianos de trigo (WAMPs) produzidos recombinantemente *in vitro,*

e consequentemente inibiram a degradação de quitinases (SLAVOKHOTOVA et al., 2014).

Em resposta a ação de diversas proteases fúngicas, as plantas induzem a expressão de diferentes tipos de IPs para suprimir o crescimento de patógenos fúngicos e consequentemente controlar o processo de infecção (HAQ et al, 2004; HABIB E FAZILI, 2007; PIROVANI et al, 2010). Logo, proteases e seus inibidores desempenham um papel importante na “corrida armamentista evolucionária” entre esses organismos (JASNHI et al., 2015;) demonstrando assim potenciais alvos para o desenvolvimento de estratégias para o controle de doenças fúngicas que atacam culturas de importância econômica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Análise da sequência primária de MrSPI2

As sequências dos inibidores de serino-protease do fungo *Moniliophthora roreri* foram localizadas através de pesquisa no banco de dados do National Center for Biotechnology Information - NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) utilizando como palavras chave “protease inhibitor” AND “roreri’’. A busca por sequências similares foi realizada usando o algoritmo blastp do NCBI. A sequência mais dissimilar do primeiro inibidor do fungo caracterizado MrSPI1 (inibidor de serino-protease 1) foi selecionada e denominada MrSPI2 (Código de acesso NCBI: ESK88376.1). A partir da sequência de aminoácidos no formato fasta foi realizado algumas análises de bioinformática para o conhecimento prévio de propriedades da proteína em estudo. Para tanto, as análises foram predição de Peptídeo Sinal realizada através do Programa SignalP 4.1 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), predição do ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (Mw) realizada utilizando o Compute Pi/MW (http://web.expasy.org/cgibin/compute_pi/pi_tool) e ainda através do banco de dados Pfam 32.0 (https://pfam.xfam.org/) (EL-GEBALI et al, 2019) foi feito uma busca pelo domínio da proteína.

4.2. Alinhamento de MrSPI2 com sequências homólogas e construção do dendograma

Para as análises de alinhamento e comparação das sequências homólogas obtidas no NCBI, foi utilizado o programa Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) (SIEVERS et al., 2011). A partir do alinhamento Blastp, realizado no banco de dados do NCBI, foram selecionadas outras sequências de espécies diferentes de fungos para a construção do dendograma. As sequências foram alinhadas segundo o clustalW e o dendograma final contendo as sequências foi realizado através do programa Mega7 (KUMAR et al., 2016). A história evolutiva foi realizado segundo o método de Neighbor-joining (SAITOU E NEI, 1987), com 1000 bootstraps (FELSENSTEIN, 1985). Para a construção do dendograma foram utilizadas 25 sequências de resíduos de aminoácidos, e todas as posições contendo lacunas e dados ausentes foram eliminados. As sequências homólogas acima de 30% de identidade foram escolhidas para a construção do dendograma, além disso, foram incluídas ainda mais seis sequências de *M. roreri* anotadas como inibidores de serino-proteases. Para a construção do dendograma, foram utilizadas 25 sequências sendo quatro sequências de *Coprinopsis cinerea* (PIC1 ou Cospin - 3VWC_A; ACX48485.1; XP_001840917.1; XP_001840926.1), uma sequência de *Clitocybe nebulares* (Cnispin - ACK87034.1), duas sequências de *Hypsizygus marmoreus* (RDB24465.1 e RDB24458.1), uma de *Phlebia centrifuga* (THG95045.1), uma de *Laccaria bicolor* (XP_001889170.1), duas de *Dendrothele bispora* (THU82752.1 e THU89587.1), oito de *M. roreri* (MrSPI2- ESK88376.1; MrSPI1- ESK81379.1; ESK81379.1; ESK86407.1; ESK88377.1; ESK87050.1; ESK87035.1; ESK87036.1), quatro de *L. edodes* (LeSPI -P81639.1; GAW08179.1; GAW08177.1; GAW08178.1), duas de *M. perniciosa* (EEB99241.1 e EEB89032.1).

4.3. Modelagem por homologia de MrSPI2 e da serino-protease do tipo subtilase SBT1 de *T. cacao*

A predição da estrutura tridimensional (3D) de MrSPI2 (inibidor de protease do *M. roreri*) e de uma serino-protese do *Theobroma cacau* foram realizadas baseadas na homologia da proteína, a partir da similaridade com o modelo-alvo, utilizando o

servidor Swiss–Model (https://swissmodel.expasy.org/interactive) (ARNOLD et al., 2006).

A modelagem de MrSPI2 foi realizada utilizando como molde a estrutura cristalografada de um inibidor de serino-protease do fungo *Coprinopsis cinerea* (Código PDB: 3VWC). A modelagem de uma serino-protease do *T. cacao*, a subtilase SBT1.7 (Código Tc01v2_p005970.1), cuja sequência foi obtida no banco de dados do Cocoa GenDB, foi realizada segundo o molde cristalografado de uma protease de *Solanum lycopersicum*, a SBT3 (Código PDB 3I74.1.A).

A qualidade estereoquímica dos modelos obtidos foi avaliada utilizando os programas Procheck (LASKOWSKI et al., 1993) e ProSA (https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php) (WIEDRSTEIN & SIPPL, 2007). A visualização dos modelos gerados foi feita com os programas PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.) e Discovery Studio 4.0.

4.4. *Docking* entre MrSPI2 e serino-proteases

Para a realização do acoplamento (*docking*) entre os modelos 3D de MrSPI2 (receptor) e as moléculas-alvo (ligantes) foram selecionadas dois alvos, sendo uma estrutura cristalografada obtida no banco de dados PDB (https://www.rcsb.org/), a tripsina de *Sus scrofa* (PDB 1LDT) e a subtilase de *T. cacao* (Código de acesso Tc01v2_p005970.1) modelada a partir do molde da SBT3 de *Solanum lycopersicum* (PDB 3I74). Para a realização do *docking* molecular, as estruturas tridimensionais foram preparadas retirando-se os resíduos de água, utilizando o software Discovery Studio 4.0. O acoplamento do inibidor com as proteases alvos foi obtido utilizando o ClusPro 2.0 (http://cluspro.bu.edu/), um programa de ancoragem de proteínas (KOZAKOV et al., 2017). O *docking* foi feito através do upload do arquivo PDB de MrSPI2 (Inibidor de serino-protease do *M. roreri*) e das serino-proteases alvos. Para as análises dos acoplamentos foi considerado a estimativa de níveis de energia (van der Walls, forças eletrostáticas e hidrofóbicas), o tamanho de cada cluster gerado pelo programa e as interações presentes no sítio ativo das proteínas envolvidas. A visualização e as análises dos modelos gerados (Receptor-Ligante) foram realizadas

através dos programas PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.) e Discovery Studio 4.0.

4.5. Indução, expressão e purificação da proteína rMrSPI2

A ORF codificadora da proteína MrSPI2 (GenBank: ESK88376.1) foi otimizada com códons para expressão em *E. coli* e sintetizada pela FastBio (www.fastbio.com.br). A ORF *mrspi2* foi inserida no vetor pET-28a (Figura 11) utilizando as enzimas de restrição *XhoI* e *NdeI* para gerar o plasmídeo recombinante pET-28a:mrspi2. Posteriormente, para expressão da proteína MrSPI2, o plasmídeo foi inserido por choque térmico em células competentes da estirpe de *E. coli Rosetta* (*DE_3*), conforme Sambrook et al., (2006).

A cultura de *E. coli Rosetta (DE_3)* transformada com o plasmídeo recombinante foi cultivada em meio LB (Luria-Bertani), incubado a 37 ºC sob agitação de 180 rpm até atingir OD (densidade ótica) entre 0,7-1,0 ηm de ABS (absorvância). A expressão foi induzida mediante a adição de 0,4 mmol L^{-1} de IPTG (Isopropil Beta-D-Tiogalactosídeo) por 4 horas a 37 ºC sob agitação. Após a etapa de indução a cultura de células foi centrifugada a 11000 rpm por 20 minutos a 4 ºC. Para a purificação da proteína, o precipitado foi ressuspenso em tampão de lise contendo lisozima 50 µg. ml^{-1}, deixando a temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, esse extrato bacteriano foi submetido ao aparelho ultrassônico (pGEX 30) com pulsos de 10 segundos intercalado com 25 segundos em repouso no gelo para resfriamento, utilizando o parâmetro amplitude 70 % para rompimento total das membranas e até a redução da viscosidade. O material lisado foi centrifugado à rotação de 14000 rpm, 4 ºC por 20 min, o sobrenadante foi utilizado para purificação da proteína por cromatografia de afinidade no cromatógrafo Akta Puriffy (GeHealthcare) utilizando a coluna de Cobalto (Co^{+1}) HisTrap TALON FF crude (GeHealthCare). A purificação foi realizada utilizando as solução de Binding 1X (250 mol L^{-1} de NaCl, 20 mmol L^{-1} de Tris pH 7,4 e 5 mmol L^{-1} de Imidazol) e Elute 1X (500 mmol L^{-1} de NaCl, 20 mmol L^{-1} de Tris pH 7,4 e 500 mmol L^{-1} de Imidazol). A proteína recombinante com cauda de histidina foi eluída com o aumento da concentração de imidazol. As análises para verificação da expressão e purificação da MrSPI2 foram realizadas em SDS-PAGE e corado com 0,01 % de Comassie blue G-250. As frações coletadas foram submetidas

à diálise contra tampão Tris-HCL (10 mmol L-1, pH 7,0). A proteína purificada foi quantificada pelo método de Bradford (1976), usando albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

4.6. Análise de Dicroísmo Circular de rMrSPI2

O espectro de CD (Dicroísmo Circular) da proteína recombinante rMrSPI2 purificada de extratos de *E. coli* foi obtido através do espectropolarímetro de modelo J-815 Jasco). Para análise do espectro CD a proteína foi dialisada em tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1}, pH 7, sendo obtida 0,180 µg μL^{-1}.

Para analisar o comportamento da estrutura secundária sob variação de temperatura, a proteína foi condicionada em cubetas de quartzo de 1 mm de caminho óptico em intervalos de 0.5 ηm seg. Os espectros foram apresentados como uma média de 6 escaneamentos em intervalos de 190 a 240 ηm nas temperaturas de 25 ºC e 95 ºC. Os dados foram coletados com velocidade de varredura de 50 ηm min^{-1} utilizando o software Spectra Measurement (JASCO). Os espectros submetidos a uma análise no programa K2D3, que calcula o conteúdo de estrutura da proteína a partir dos dados experimentais de elipticidade obtidos (LOUIS-JEUNE et al., 2012).

A análise de varredura indicou uma diferença de sinal dos espectros CD nas temperaturas de 25 ºC e 95 ºC. Dessa forma, fez-se necessário a análise *unfolding* (desenovelamento da proteína por aumento da temperatura de 25-95ºC) e *refolding* (re-enovelamento da proteína por diminuição da temperatura de 95-25ºC) para avaliação da estrutura secundária de rMrSPI2, variando-se 5 ºC a cada 1 minuto. A análise de desenovelamento e re-enovelamento de MrSPI2 foi caracterizada medindo as alterações da estrutura secundária da proteína em 223 ηm no pH 7. As análises de *unfolding* e *refolding* foram realizadas em triplicatas e a média dos sinais das triplicatas foram utilizadas para análise da estrutura secundária sob variação de temperatura.

4.7. Análise da atividade inibitória de rMrSPI2

A determinação da atividade inibitória de MrSPI2 contra tripsina suína foi testada em triplicata em placa de Elisa, utilizando o substrato BapNA (N-alfa-Benzoila-DL-arginina-4-nitroanilida). Em cada poço foi pipetado alíquotas decrescente do

inibidor (0,286 µg µL^{-1}) de 90 µL, 70 µL, 50 µL, 30 µL e 10 µL, partindo-se de 92 ηg até 10,2 ηg de inibidor por reação, utilizando a seguinte equação: $\boldsymbol{V}\ (\mathbf{\mu L}) * [\ \mathbf{I}\ ]/\mathbf{VF,}$ em que *V*= volume de inibidor, *[I]*=Concentração do inibidor e *VF*= volume final da reação.

Na reação foi adicionado 10 µL de tripsina suína (1,25 mg mL^{-1}) seguido de 180 µl do substrato BApNA 1,25 mmol L^{-1} e para completar um volume final de 280 µL foi adicionado volumes crescentes de tampão Tris-HCL 50 mmol L^{-1} pH 7,5. A atividade residual da enzima foi medida através da hidrólise do substrato cromogênico (BapNA) com leitura a 410 ηm, a cada 5 min para detecção da ρ-nitroanilina liberada, durante 1 h, 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 os demais volumes do inibidor foi revelada em detrimento do controle.

4.8. Extração de proteínas totais da casca do fruto de *T. cacao*

A extração de proteínas nativas totais da casca do fruto de *Theobroma cacao* foi realizada utilizando 1 g de material vegetal macerado e ressuspendido em 5 mL de Tampão de Extração (Tris-HCl 10 mmol L-1 pH 7,5, Triton X-100 1 %). As amostras foram agitadas em vórtex por 10 min, sonicadas (8 pulsos de 3 s, com intervalos de 10 s, amplitude 70%) e centrifugadas (5000 rpm por 20 min, 4 ºC). O precipitado resultante da etapa anterior foi submetido a uma segunda extração. Ao sobrenadante obtido foram adicionados 0,4 volumes de *tert*-Butanol; 1/10 de NaAc, 3 mol L^{-1}, pH 4,5. Posteriormente, as amostras foram mantidas em gelo por 30 minutos, sendo agitadas a cada 10 minutos em vórtex e centrifugadas a 5000 rpm por 10 min, 4 ºC (PIROVANI et al., 2008). As amostras contendo proteínas totais foram estocadas em 4 ºC para posterior captura por sepharose ativada com CNBr acoplada com rMrSPI2 recombinante.

4.9. Armadilha para captura da protease por CNBr-Sepharose

Para montagem do sistema de captura da protease-alvo foi realizado o acoplamento de rMrSPI2 recombinante à SepharoseTM 4 Fast Flow ativada por CNBr

(GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. A partir do acoplamento do inibidor foi realizada a captura da protease-alvo. O extrato da casca de *T. cacao* foi incubado com a resina contendo o inibidor acoplado por 40 minutos em temperatura ambiente, sob leve agitação, na presença de tampão de atividade (tampão fosfato de potássio, 50 mmol L^{-1}, pH 6,0). Após a captura das proteases presentes no extrato da casca, a resina foi lavada 3 vezes com tampão de atividade contendo NaCl 0,5 mmol L^{-1}. As proteases que, possivelmente, interagiram com o inibidor (rMrSPI2) foram eluídas com 50 µL de glicina, 50 mmol L^{-1}, pH 2,9, por 5 minutos, alternando para volume igual de Tris-base de 10 mmol L^{-1}, para equilíbrio, até um volume total de 200 µL. Entre cada etapa, a resina foi recuperada por centrifugação (3000 rpm, por 30s, temperatura 4 ºC). Os passos mediante a captura das proteínas foram realizados segundo adaptações de Pirovani et al (2010).

4.10. Obtenção Do Soro Imune À Proteína rMrSPI2

A produção do anticorpo policlonal em camundongo foi feita obedecendo aos procedimentos exigidos por Duarte, 2007 e em conformidade com o Protocolo 006/2018, aprovado pelo CEUA/UESC. O antígeno utilizado para a imunização dos camundongos foi a proteína rMrSPI2. Para a imunização dos camundongos foi aplicado 100 µL da proteína com aproximadamente 0,119 µg μL^{-1}. Para a produção do anticorpo foram utilizados dois camundongos da raça Black C57**,** sendo adotado estratégia de produção do anticorpo diferente para cada camundongo. Em um camundongo (camundongo A) foram feitas três imunizações e um Booster, e em outro camundongo (camundongo B) apenas três imunizações. O Booster consiste na última imunização realizada 48h antes da sangria total dos camundongos, onde é utilizado o dobro do volume de antígeno em relação as imunizações anteriores (sem adjuvante), para um reforço da resposta imunológica.

As coletas do antissoro foram feitas com o intervalo de 21 dias após a 1ª imunização e com intervalos de 10 dias após a 2ª e 3º imunização. A sangria total foi feita com 48h após o Booster no camundongo A e no camundongo B a sangria total foi feita após 10 dias da 3ª imunização. Antes da primeira imunização foi coletado o soro pré-imune (controle).

Para a primeira imunização, 100 µL da solução de proteína foi homogeneizada com igual volume de adjuvante “Freund’s” completo (Sigma) e para as imunizações

posteriores, foi utilizado o adjuvante “Freund’s” incompleto (Sigma). As imunizações foram feitas por meio de injeções intraperitoneais, região ventral do animal. As coletas do sangue para isolamento do soro foram feitas com pequena incisões na região da cauda. As frações dos antissoros coletadas foram testadas por meio de ‘’dot blotting’’ contra o antígeno recombinante.

4.11. Avaliação do (Titulação) do anticorpo anti-rMrSPI2 por Dot blot

Para titulação dos anticorpos policlonais produzidos para detecção da proteína recombinante MrSPI2, utilizamos a técnica de Dot-blot. A membrana de nitrocelulose (MN) (BIO-RAD com poro de 0,45 µm) utilizada na análise foi dividida em linhas e colunas de referências de 1 cm. As linhas foram referentes às diferentes concentrações do antígeno diluído e as colunas, enumeradas de 1 a 5, correspondendo aos antissoros policlonais que serão utilizados para titulação do anticorpo. Em seguida, o sistema Bio-Dot SF (BIO-RAD) foi montado: primeiro, a MN marcada e 6 folhas de papel filtro foram imersas em Tampão de transferência 10X (Glicina 400 mmol L^{-1}, Tris-base 500 mmol L^{-1} e SDS 13 mmol L^{-1}), posteriormente foram colocadas sobre o aparelho de Bio-Dot de 48 poços. Um teste para verificar se a montagem do sistema ocorreu de forma correta foi realizado. Em cada poço, 20 µL do tampão de transferência foi aplicado, em seguida, foi observado se o líquido estava descendo sem aplicação do vácuo, averiguando que não estava acontecendo isso, seguiu-se com o experimento.

Com o sistema Bio-Dot SF (BIO-RAD) já montado, a membrana de nitrocelulose marcada foi saturada com o antígeno diluído em tampão PBS (tampão fosfato salino, pH 7.4) nas proporções de 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 µg/poço. Feito isso, o sistema foi desmontado para a retirada da membrana. As colunas enumeradas de 1 a 5 da MN foram cortadas em 5 tiras, as quais foram utilizadas para a titulação dos diferentes anticorpos. As tiras da membrana saturada com diferentes concentrações do antígeno foram bloqueadas por 30 min sob agitação com 50 mL de uma solução de bloqueio (TBS 1X – Tris base 10 mmol L^{-1}, NaCl 140 mmol L^{-1} – com adição de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado), para bloquear os sítios de ligação de proteína na membrana. Em seguida, as tiras da MN foram lavadas com tampão TBS-T 1X e incubadas com os diferentes antissoros a serem titulados. Cada

fita de MN foi colocada em tubos falcons contendo o antissoro correspondente diluídos 1:500 em TBS-T 1X por 2 horas sob agitação em temperatura ambiente. Para cada camundongo foi coletado 4 antissoros e um soro pré-imune como controle, sendo identificados como fita 1 a 5 para o camundongo A e fita 1' a 5' para o camundongo B. Especificamente, a fita 1 e fita 1' corresponde ao pré-soro (amostra sem imunização – para os 2 camundongos), a fita 2 e 2' corresponde ao antissoro 1 (21 dias após a 1ª imunização - para os 2 camundongos), fita 3 e 3' corresponde ao antissoro 2 (10 dias após a 2ª imunização - para os 2 camundongos), fita 4 e 4' corresponde ao antissoro 3 (21 dias após a 2ª imunização – para os 2 camundongos), fita 5 e 5' corresponde ao antissoro 4 (48 horas após a 4ª imunização – sangria total do camundongo A; 10 dias após a 3ª imunização – sangria total do camundongo B). Posteriormente, as tiras foram retiradas dos tubos e lavadas três vezes com tampão TBS-T 1X (3 vezes de 5 minutos). Em seguida, as tiras de MN foram submetidas ao mesmo anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina, diluído na proporção de 7,5: 20000 mL^{-1} em TBS 1X, por 1h em temperatura ambiente sob agitação. Após a incubação, as mesmas foram lavadas três vezes com TBS-T 1X (Uma vez de 15 minutos e duas vezes de 5 minutos).

A revelação das tiras de MN foi feita utilizando os substratos BCIP (nitro-blue tetrazolium chloride) e NBT (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt). Primeiramente, as tiras de MN foram incubadas por 10 minutos com 40 mL de tampão de revelação (Tris-HCl 100 mmol L^{-1}, pH 9,8, MgCl2 5 mmol L^{-1} e NaCl 100 mmol L^{-1}, posteriormente o tampão foi retirado. Em seguida, as tiras de MN foram reveladas numa solução contendo 15 µL de NBT e 7,5 µL BCIP, em 5 mL de tampão de revelação. A revelação teve duração de 10 minutos, posteriormente, água destilada foi adicionada para evitar que as tiras de MN fossem queimadas pela ação dos resíduos gerados e, consequentemente, a revelação foi bloqueada.

4.12. Purificação do anticorpo anti-rMrSPI2 por imunoadsorção ao antígeno rMrSPI2

Para a purificação do anticorpo, foi recortada uma membrana de nitrocelulose (MN) de 2 x 2 cm (4 cm^2), com uma pipeta de 200 µL, foi aplicado o antígeno na membrana (80 microgramas por cm^2) até saturar. Posteriormente foi feito o bloqueio

de sítios inespecíficos da membrana por 30 minutos com uma solução de caseína (leite 2,5 g) diluído em 50 mL de TBS-T 1X. Em seguida, lavou-se a membrana com TBS-T 1x, três vezes por 15 minutos cada lavagem, e incubou a MN por 1 hora em uma solução de 50 µL de antissoro em 5 mL de TBS-T 1X. Lavou-se novamente a membrana, três vezes de 15 minutos cada, após esse procedimento, os IgG's foram eluídos da membrana com 20 mL de glicina (0,05 Molar), pH 2,9 e incubando sobre agitação por 30 minutos. Posteriormente recolheu a solução de glicina e adicionou-se 4 mL de TBS 10X, aferido o pH em seguida para 7,4 utilizando hidróxido de sódio 5 mol L^{-1}. Logo após adicionou-se 40 µL de Tween 20 e, para preservar o anticorpo foi adicionado azida sódica na solução de glicina para uma concentração final de 0,02 %. Para armazenar a membrana utilizada na purificação do anticorpo, lavou-a três vezes com TBS-T 1X e estocou na geladeira nesta mesma solução de lavagem contendo azida sódica 0,02%.

4.13. Imunodetecção da proteína rMrSPI2 em extratos de *E. coli*

A imunodetecção de rMrSPI2 presente nos extratos de *E. coli* foi feita com o anticorpo sem purificar, para testar sua eficiência de detecção, e com o anticorpo purificado. As análises foram feitas com as frações solúveis do extrato total bacteriano. Para as análises de Western blot foi utilizado 30 µL de proteínas totais do extrato de *E. coli Rosetta* (*DE_3*) expressando rMrSPI2 e como controles foi utilizado 30 µL de proteínas totais do extrato de *E. coli Rosetta* (*DE_3*) apenas com o vetor pET-28a sem o inserto e extratos de *E. coli* sem adição de IPTG (Isopropil Beta-D-Tiogalactosídeo). As amostras foram separadas por 12,5 % de SDS-PAGE e electroblotadas em suporte de Nitrocelulose.

As membranas foram coradas com vermelho de ponceau para conferência da transferência e normalização das amostras. Em seguida a membrana foi bloqueada 30 min com 5 % de caseína em tampão TBS-T (Tris-HCL 20 mmol L^{-1}, pH 7,6, NaCl 0,8 mmol L^{-1}, Tween 20) e lavada com TBS-T e posteriormente incubada com anticorpo primário anti-MrSPI2 purificado durante 1h à temperatura ambiente, sob

agitação. Após esse tempo, a membrana foi lavada novamente com TBS-T e incubada com anticorpo secundário anti-mouse IgG (diluição 7,5: 20000) durante 2h. O sistema de detecção foi feito com NBT/BCIP (Promega). Para uma melhor visualização do resultado desta técnica, é realizado outro gel de poliacrilamida 12,5 % de SDS-PAGE para ser utilizado como gel de referência.

5. RESULTADOS

5.1. Análise da sequência primária de MrSPI2

A proteína denominada MrSPI2 foi encontrada no banco de dados do NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/), com número de acesso ESK88376.1, e está anotada como um inibidor de serino-protease do fungo *M. roreri.*

A região codificadora de MrSPI2 com 423 pb codifica uma proteína com 141 resíduos de aminoácidos. A proteína possui massa molecular estimada de 16,3 kDa e ponto isoelétrico (pI) 4,76 como mostrado na tabela 1. A proteína possui similaridade de sequência de resíduos de aminoácidos com os inibidores de serino-protease fúngicos pertencentes à família I66 da classificação MEROPS, sendo 33,33 % de identidade com Cospin (PIC1) de *Coprinopsis cinerea* (SABOTIC et al, 2012), 30,37 % com Cnispin de *Clitocybe nebularis* (AVANZO et al, 2009), 37,96 % com LeSPI de *Lentinula edodes* (ODANI et al,1999) e 37,78 % com MrSPI1 de *M. roreri* (MENEZES, 2017), sendo assim atribuído à família. A análise com a ferramenta SignalP 4.1 não revelou a presença de peptídeo sinal.

Tabela 1. Predição de parâmetros de MrSPI2. Número de resíduos de aminoácidos, peso molecular, ponto isoelétrico, peptídeos sinal.

MrSPI2	Nº de resíduos de aminoácidos	kDa	PI	PS
Inteira	141	16,3	4,76	A

kDa – Peso molecular; PI – Ponto Isoelétrico; PS – Peptídeo Sinal; A - Ausente

5.2. Alinhamento entre MrSPI2 e sequências homólogas

O nível de conservação da sequência dos resíduos de aminoácidos da proteína MrSPI2 com sequências homólogas de dois representantes da família I66 da classificação MEROPS, PIC1 (GenBank ACX48485.1) e Cnispin (GenBank ACK87034.1) foi avaliado por meio de alinhamentos para avaliar diferenças e/ou semelhanças das regiões de domínio e sítio ativo entre os inibidores. As sequências alinhadas foram obtidas através da ferramenta Blastp do NCBI.

O alinhamento demonstrou maior conservação de resíduos (indicados em vermelho) entre as folhas β2 e β3, além de vários resíduos similares entre as sequências (indicados em amarelo), os quais pertencem ao mesmo grupo químico. Dentre os resíduos conservados encontra-se a arginina (R) na posição 21, um dos resíduos principais do sítio ativo dos inibidores de serino-protease do tipo tripsina. Arg^{27} e $Lisina^{127}$ correspondem aos resíduos do sítio ativo de Cospin e Cnispin, respectivamente, e MrSPI2 possui Arg^{41} como possível resíduo do sítio ativo (Figura 3).

Para avaliar a relação entre a sequência primária de MrSPI2 e sequências primárias de proteínas de outros fungos basidiomicetos, foi realizado um múltiplo alinhamento entre as sequências obtidas no banco de dados NCBI (Figura 4). Similaridade de sequência significativa foi encontrada com as proteínas hipotéticas anotadas no genoma dos basidiomicetos. MrSPI2 exibiu maior identidade de sequência (60 %) com uma proteína hipotética com sequência parcial anotada no genoma de *Moniliophthora perniciosa* (MONDEGO et al., 2008). Além desta, *M. perniciosa* contém ainda mais quatro sequências similares a MrSPI2, com cerca de 30-38 % de identidade com MrSPI2.

MrSPI2 exibiu ainda 39% de identidade de sequência com uma proteína não caracterizada presente no genoma de *Phlebia centrifuga* (GRANCHI et al., 2018) e 30,6% de identidade com uma proteína predita no genoma de *Laccaria bicolor* (MARTIN et al., 2008). A busca por sequências similares mostrou também que MrSPI2 possui 51,4 % e 48,5 % de identidade com duas sequências anotadas como um inibidor de serino-protease de *Dendrothele bispora* (VARGA et al., 2019).

A análise de agrupamento (Dendograma) com as sequências de proteínas de outros fungos basidiomicetos mostra que as sequências referentes aos inibidores de

serino-proteases se agruparam em três ramos diferentes (Figura 5). MrSPI2 se agrupou em um ramo distinto de outros inibidores de serino-protease de *T. cacao,* onde está incluído o inibidor MrSPI1. Em relação aos homólogos da família I66, MrSPI2 se agrupa no mesmo ramo em que está o inibidor LeSPI, e não foi agrupado no ramo em que PIC (Cospin) e Cnispin estão presentes.

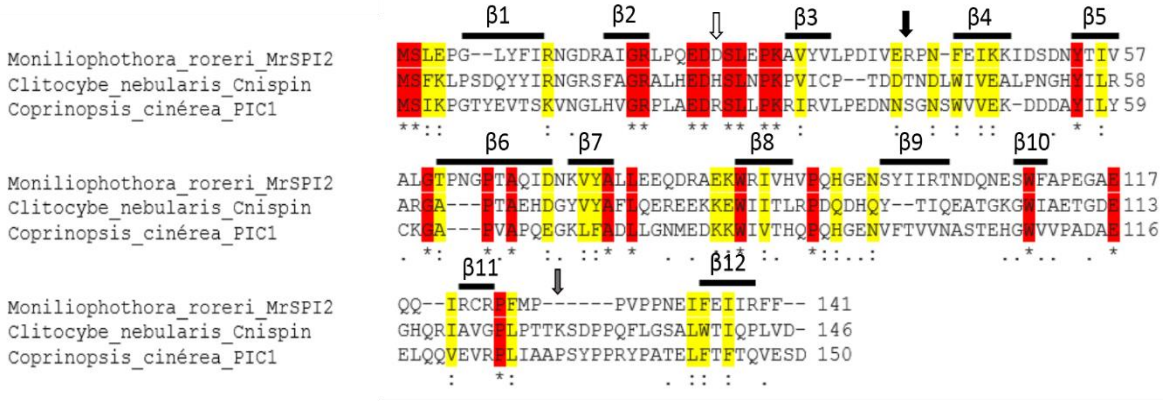

Figura 3. Alinhamento dos inibidores de tripsina fúngicos com estrutura β-trefoil pertencentes à família I66 da classificação MEROPS. As Sequências de aminoácidos de MrSPI2, Cnispin e PIC (cospin) foram alinhadas com Clustal Omega. Os resíduos de aminoácidos idênticos estão sombreados em vermelho (*) e corresponde aos aminoácidos com características básicas, ácidas ou neutras conservadas, e os resíduos de aminoácidos com características químicas semelhantes estão em amarelo (:). As cadeias β da estrutura secundária de rMrSPI2 estão indicadas por linhas acima das sequências. As setas indicam o resíduo P1 reativo à tripsina em MrSPI2 (preto), Cnispin (cinza) e PIC1 (Cospin) (branco). Código do GenBank: MrSPI2, ESK88376.1; PIC, GenBank ACX48485.1 e Cnispin GenBank ACK87034.1

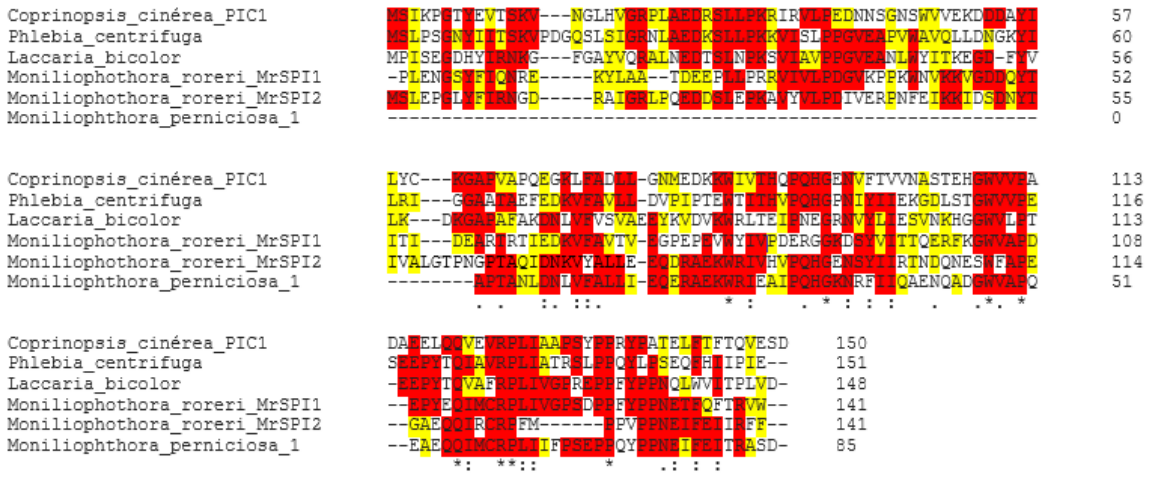

Figura 4. Alinhamento de sequência de aminoácidos de inibidores de serino proteases de diferentes basidiomicetos. As sequências de aminoácidos de MrSPI1 (GenBank ESK81379.1) e MrSPI2 (GenBank ESK88376.1) estão alinhadas com a sequência do inibidor de serino-prorease de *Coprinopsis cinerea* (SABOTIC *et al*, 2012) (PIC1 – Cospin, PDB 3N0K), e as sequências anotadas

como proteína não caracterizadas no genoma de *Phlebia centrifuga* (GenBank: PSR87359.1), genoma de *Laccaria bicolor* (GenBank DS547153) e genoma de *Moniliophthora perniciosa* (GenBank EEB87837). Os resíduos de aminoácidos idênticos são mostrados em vermelho e os resíduos de aminoácidos similares estão em amarelo.

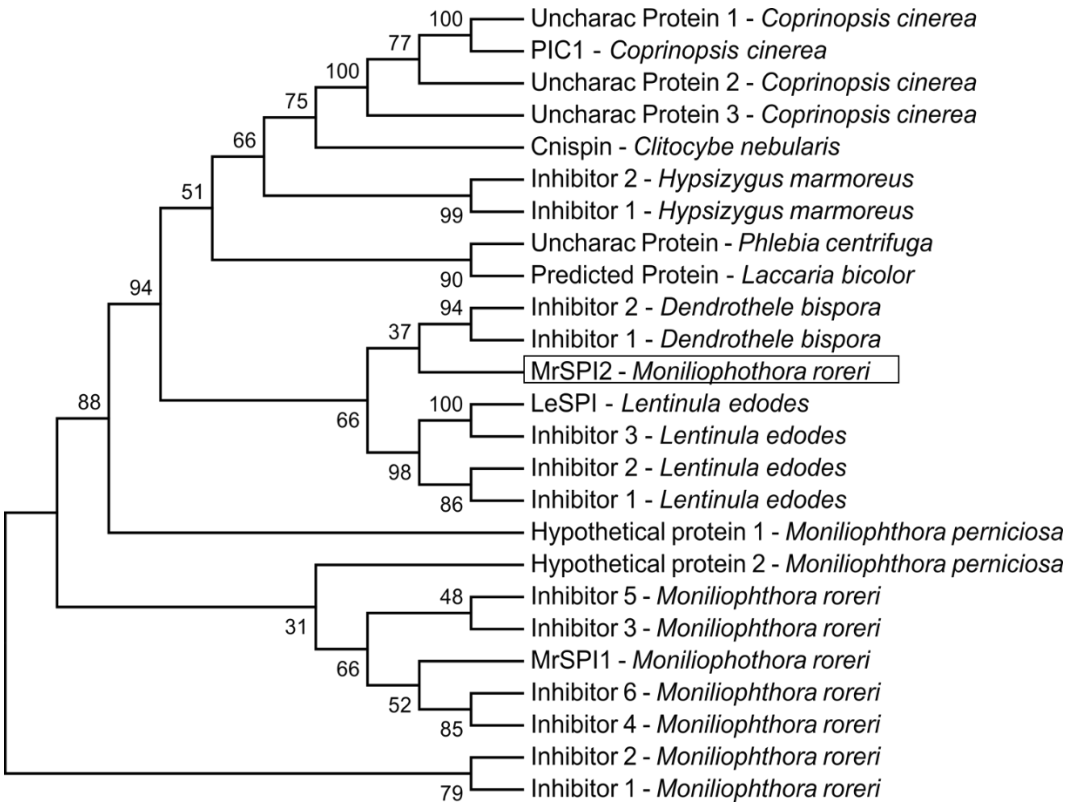

Figura 5. Dendograma construído de acordo com a similaridade de MrSPI2 com outro inibidores homólogos de basidiomicetos. No retângulo se encontra destacado MrSPI2.

5.3. Análise da estrutura tridimensional de MrSPI2 e a serino-protease SBT1 de *T. cacao*

A modelagem da estrutura tridimensional de MrSPI2 foi realizado no servidor Swiss Model online. O modelo 3D foi obtido (Figura 6) segundo o molde da estrutura cristalografada de um inibidor de serino-protease do fungo *Coprinopsis cinerea* (3VWC.1 PDB) com 32,59% de identidade e 96% de cobertura, o que possibilitou a obtenção do modelo 3D de MrSPI2 (Figura 6A e B). A estrutura tridimensional da proteína apresenta predominância de folhas betas, duas alfa hélices e várias regiões de alças típicas de proteínas com estrutura beta-trefoil. O modelo das estruturas de

proteínas com folhas betas-trefoil ricas em alças está representado na figura 14. No modelo 3D mostrado na figura 6A está em destaque os resíduos Arg^{41}, o possível sítio ativo de MrSPI2.

A validação do modelo 3D, segundo o gráfico de Ramachandran (Figura 7a), mostrou que a maioria dos resíduos de aminoácidos está em regiões favoráveis. Para o modelo de MrSPI2 os resíduos de aminoácidos estão distribuídos em 86,2% em regiões mais favoráveis; 10,3% em regiões mais permitidas; 2,6% em regiões generosamente permitidas e apenas 0,9% dos resíduos em regiões desfavoráveis. Dessa forma, o modelo da proteína possui cerca de 99,1 % de confiabilidade. A análise de validação através do programa ProSA mostra que o modelo 3D de MrSPI2 gerado apresenta o Z-score de -5,35 (Figura 7b).

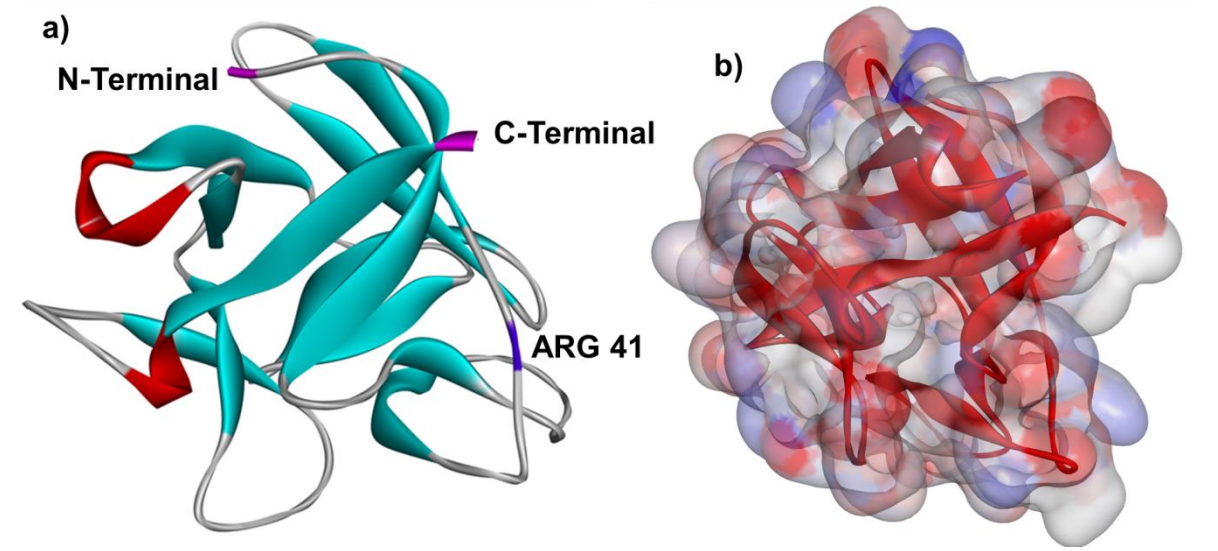

Figura 6. Estrutura tridimensional de MrSPI2 a partir do molde de um inibidor de protease de *Coprinopsis cinerea* (3VWC.1 PDB). Em a está representado a estrutura 3D de MrSPI2, mostrando em destaque as regiões C-terminal e N-terminal (roxo), folhas beta (azul claro), alfa hélice (vermelho) a arginina 41 (Arg^{41}). Em b, estrutura em forma de superfície.

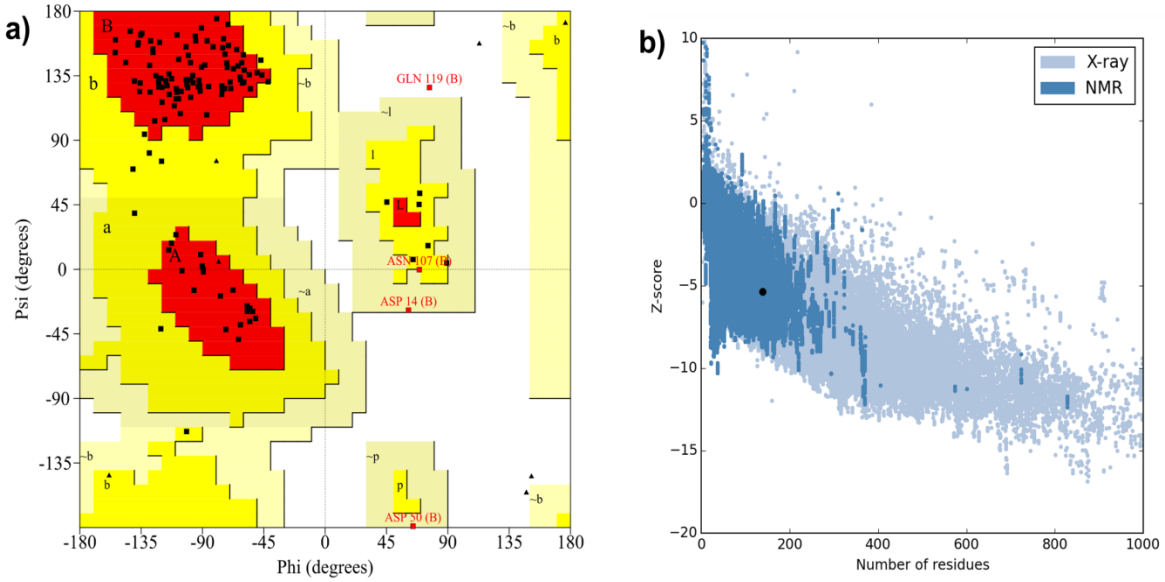

Figura 7. Validação do modelo tridimensional de MrSPI2 predito. Em a, gráfico de Ramachandran indicando a distribuição dos resíduos em regiões favoráveis e desfavoráveis; e em b, gráfico do ProSA mostrando que o modelo (pontilhado preto) está adequado.

A estrutura 3D de uma possível serino-protease alvo presente no fluido apoplasto de folhas de *T. cacao* foi obtida. A modelagem da estrutura da serino-protease do tipo subtilase do cacaueiro (SBT1.7) (código de acessso Tc01v2_p005970.1) foi obtida a partir do molde de uma subtilase de *Solanum lycopersicum* (Código PDB 3I74) com identidade de 42.79 % e cobertura de 82% para a SBT1.7 (Figura 8). A validação do modelo da protease através do software Procheck, gerou um diagrama de Ramachandram com 99,4% dos resíduos de aminoácidos em regiões energicamente favoráveis, demonstrando que o modelo 3D é confiável e adequado (Figura 9).

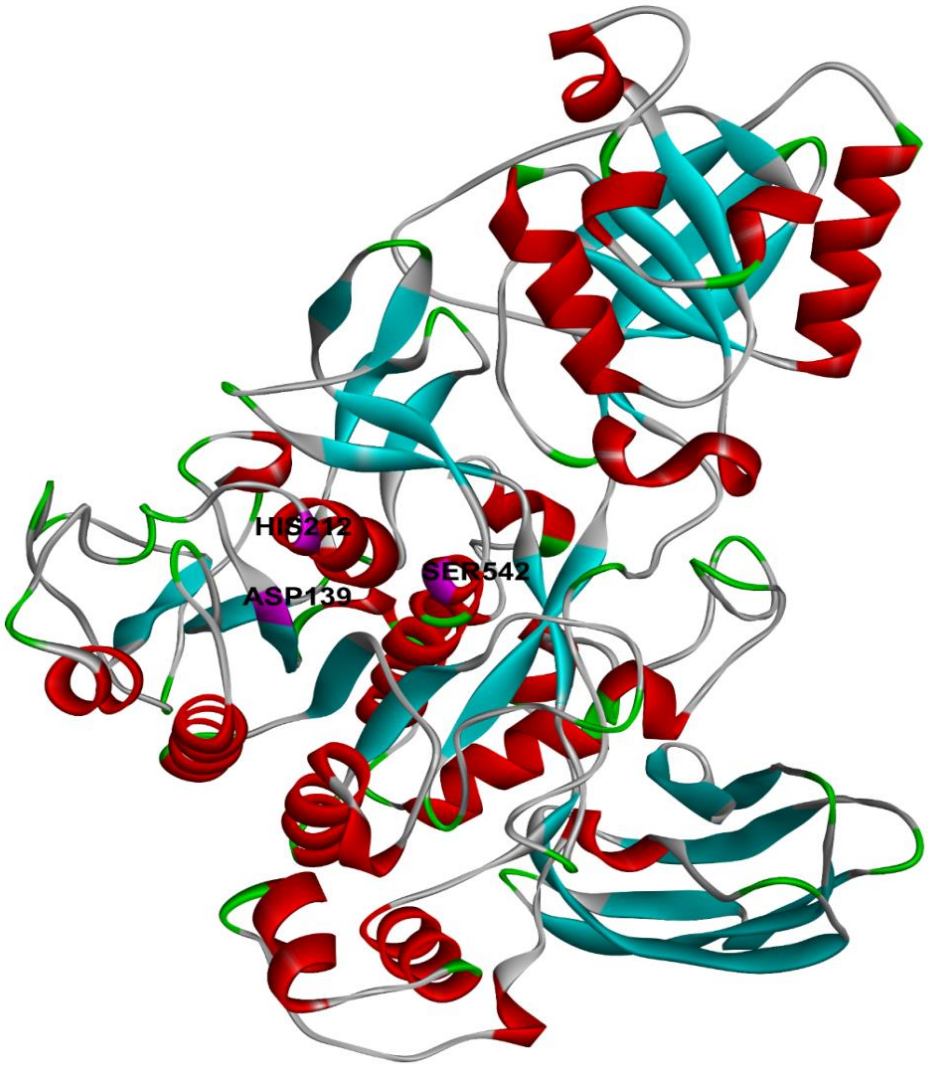

Figura 8. Estrutura tridimensional da serino-protease de *T. cacao,* SBT1.7. Em A, o modelo 3D da SBT1.7 segundo o molde de uma subtilase de *Solanum lycopersicum* (Código PDB 3I74) demonstrando os resíduos da tríade (HIS 212, ASP 139, SER 142);

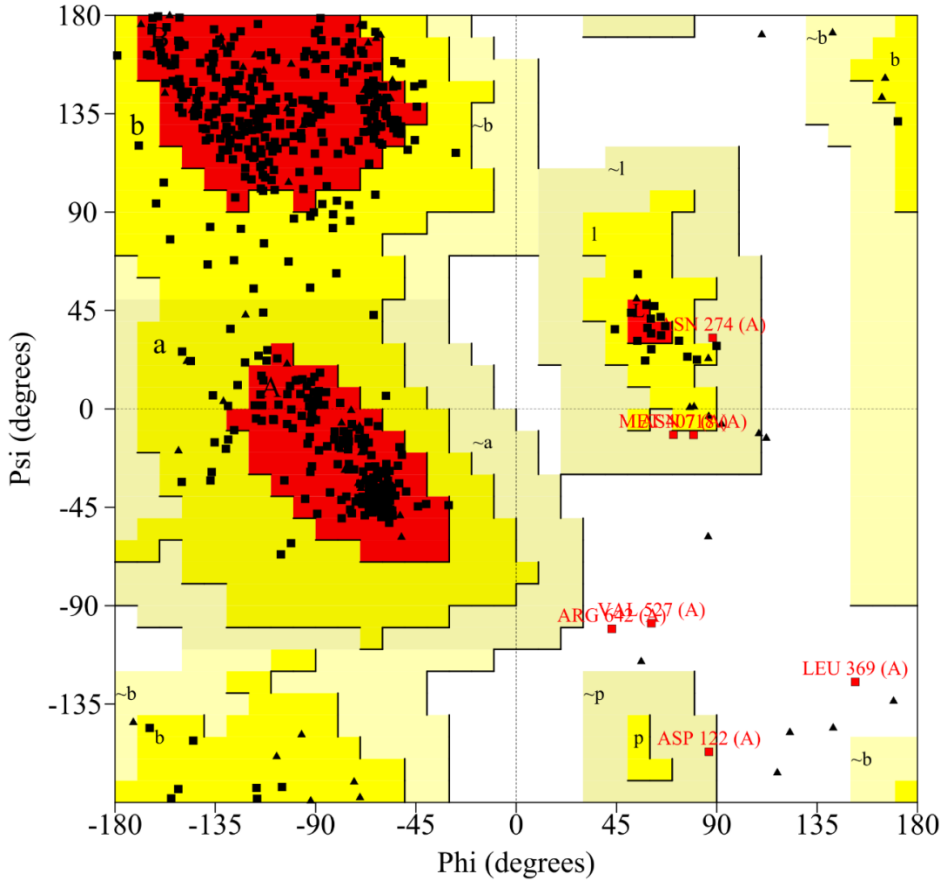

Figura 9. Validação da estrutura tridimensiional de SBT1.7 predita. O gráfico de Ramachandram demonstra os resíduos em regiões energicamente favoráveis e a qualidade do modelo.

5.4. *Docking* molecular entre MrSPI2 e as serino-proteases do tipo tripsina e subtilase

O acoplamento (*docking*) foi realizado entre MrSPI2 e a estrutura cristalografada da tripsina de *Sus scrofa* (Código PDB 1LDT), disponível no banco de dados PDB (https://www.rcsb.org/), e resultou em 10 conformações possíveis, sendo escolhido somente a estrutura avaliada segundo estimativas dos níveis de energia, tamanho do cluster e locais de sítio ativo do inibidor e da protease.

Os modelos obtidos de acoplamento mostram que MrSPI2 se ajustou ao sítio reativo da serino protease do tipo tripsina (Figura 10A e B). As principais interações ocorrem entre os resíduos de serina 195 (Ser^{195}) e glicina 192 (Gln^{192}) da enzima com a Arginina 41 (Arg^{41}) e glutamato 40 (Glu^{40}) do inibidor, sendo (Ser^{195}-Arg^{41}) e (Gln^{192}-Glu^{40}), respectivamente (Figura 11). A tríade catalítica da protease (SER^{195}, HIS^{57} e

ASP[102]) e os resíduos do sítio ativo do inibidor estão em destaque, assim como as ligações de hidrogênio envolvidas na interação (tracejado verde) (Figura 11)

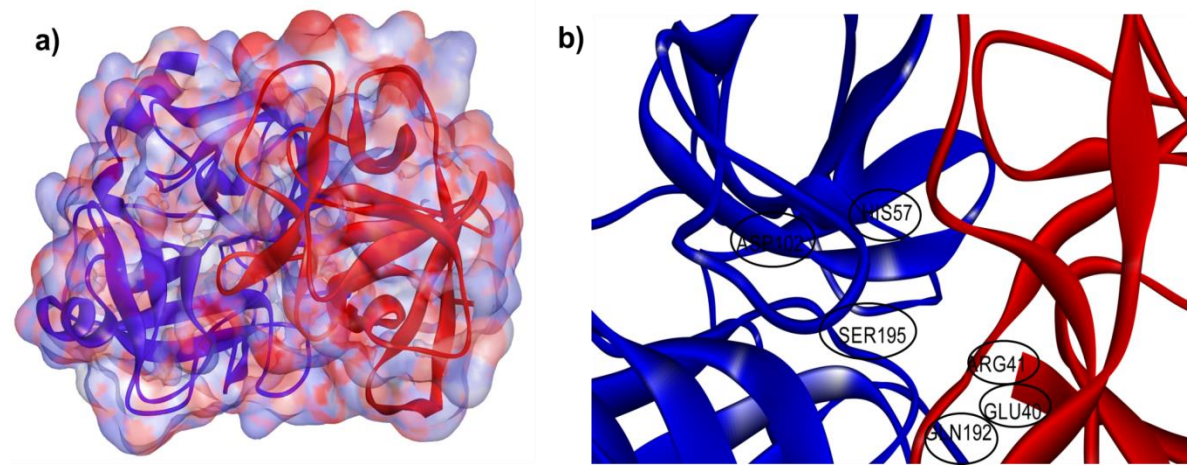

Figura 10. *Docking* entre MrSPI2 e a tripsina suína: Em a, imagem total do acoplamento entre as duas proteínas e em b, a região de interação ampliada. As imagens em vermelho mostram o inibidor e em azul a tripsina. Em destaque os resíduos do sítio ativo do inibidor e da enzima.

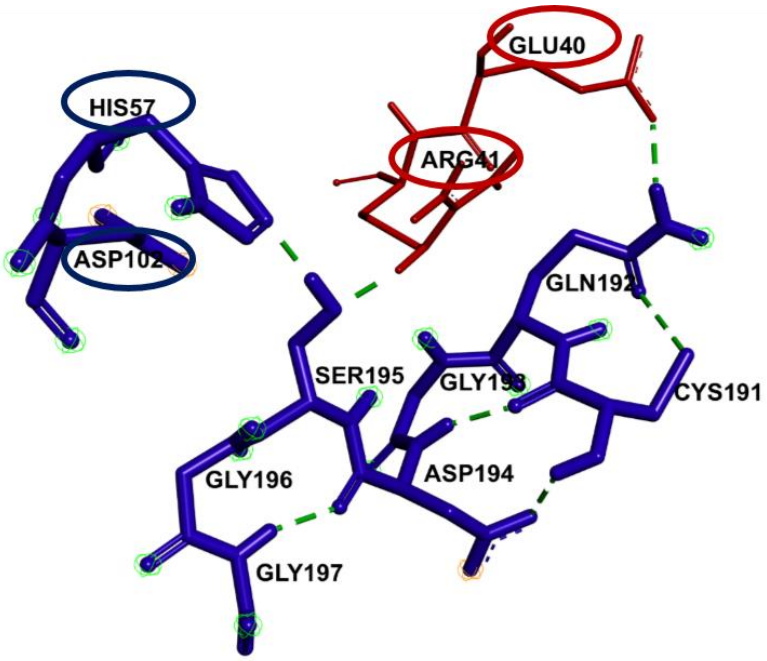

Figura 11. Principais resíduos envolvidos durante a interação de MrSPI2 e a Tripsina de *Sus scrofa* (PDB 1LDT). A região de interação em destaque mostra os resíduos de aminoácidos envolvidos na interação e em verde mostra as ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos do sítio ativo do inibidor e da protease. As imagens em vermelho mostram o inibidor e em azul a tripsina. Em destaque os resíduos do sítio ativo do inibidor.

Com base na literatura, foram selecionadas algumas serino-proteases da classe das Subtilases, encontradas no fluido apoplasto de folhas de *T. cacao* (BARBOSA et al., 2018), as quais estão relacionadas a mecanismos de defesa em plantas, e que podem ser possíveis alvos para o inibidor em estudo. Dentre as serino-proteases selecionadas, a análise de acoplamento foi realizada com a subtilase SBT1, a qual foi possível obter a estrutura 3D para que fosse realizado o *docking* molecular.

No acoplamento entre o inibidor MrSPI2 e a subtilase do cacau (Figura 12) todas as interações avaliadas demonstraram maior afinidade na região de alça do inibidor. A figura 12A mostra o principal local de interação entre a subtilase e MrSPI2. No acoplamento é possível visualizar a arginina 41 do inibidor envolvida na interação com dois resíduos de aminoácidos da tríade da protease, a serina 542 e a histidina 212 (Figura 12B). Um outro resíduo do inibidor, que também interage com a enzima, é o Aspartato 37 (ASP^{37}) (Figura 13). As interações do tipo ligações de hidrogênio (pontilhado verde) estão presentes entre a região P1 do inibidor e a serina 542, e da histidina 212 do sítio catalítico da subtilase (Figura 13).

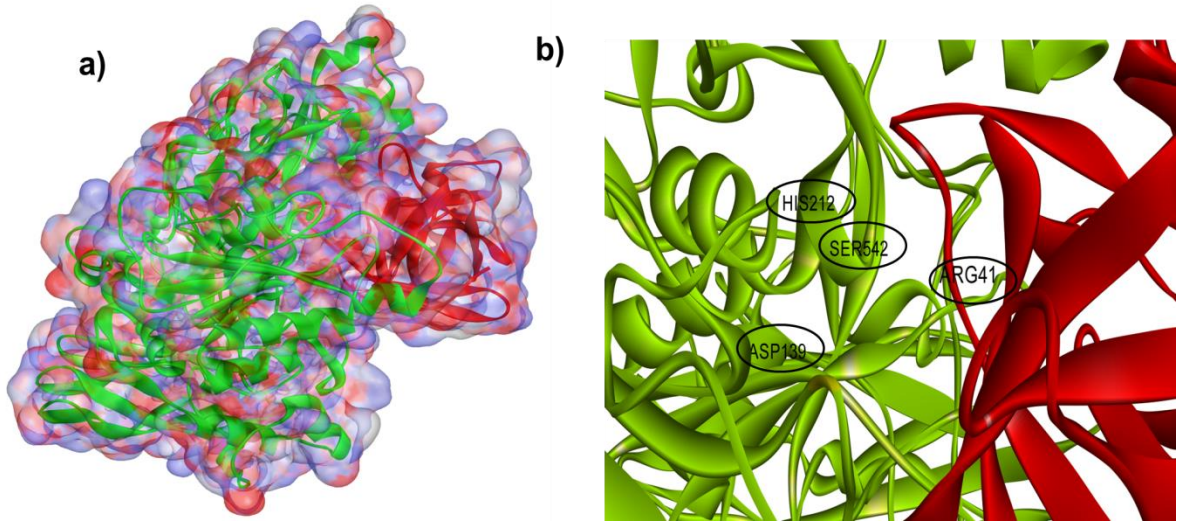

Figura 12. *Docking* entre MrSPI2 e uma Subtilase de *Theobroma cacao* (Tc01v2_p005970.1). Em A, imagem total do acoplamento entre as duas proteínas; em B, região de interação ampliada. Os resíduos envolvidos na interação estão destacados na imagem para uma melhor visualização do local de acoplamento. Em vermelho mostram o inibidor e em verde a subtilase do cacau.

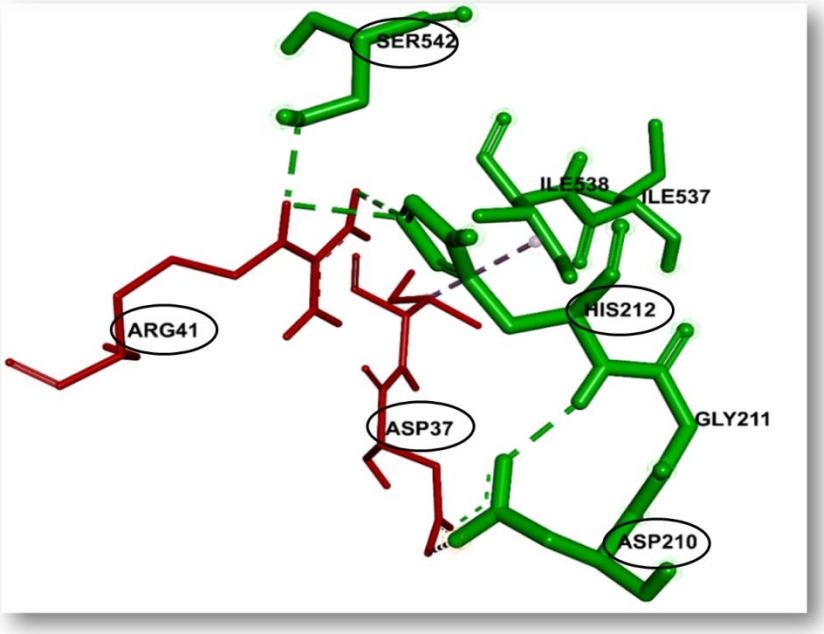

Figura 13. Interação entre MrSPI2 e uma Subtilase de *Theobroma cacao* (Tc01v2_p005970.1). Em destaque está mostrando os principais resíduos de aminoácidos envolvidos na interação. Em vermelho mostram o inibidor e em verde a subtilase, SBT1.7, do cacau. Todos os resíduos envolvidos na interação estão destacados na imagem para uma melhor visualização do local de acoplamento.

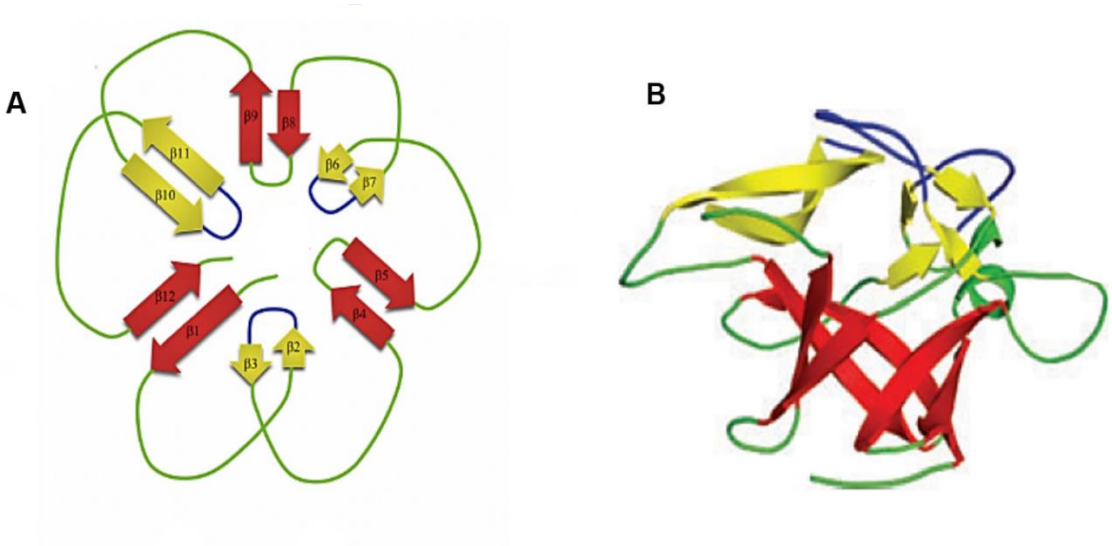

Figura 14. Representação esquemática da dobra β-trefoil envolvidas na inibição das proteases (A) e representação da estrutura β-trefoil (B) (ZURGA et al, 2015). A estrutura assemelha a uma árvore, composta por 12 folhas β conectadas por 11 alças. O tronco e a região da coroa é formado por 6 folhas β cada, duas alças formam a região da raiz, e mais 9 alças formam duas camadas na região da coroa, sendo 6 na camada inferior e 3 na superior. As folhas que compõem o tronco são mostradas em vermelho e as folhas da região da coroa estão em amarelo. A camada inferior da coroa é mostrada em verde e a superior em azul.

5.5. MrSPI2 é expressa na fração solúvel e insolúvel do extrato bacteriano

Para caracterizar a proteína MrSPI2, o plasmídeo recombinante pET-28a contendo o gene sintético (Figura 15) com códons otimizados para expressão em *E. coli* foi adquirido por meio da empresa FastBio e a proteína foi obtida por meio de expressão em *E. coli*.

A indução de rMrSPI2 em *E. coli* por 4 horas, à 37 ºC, com 0,4 mmol L^{-1} de IPTG revelou uma banda diferencial em comparação com o extrato proteico das células transformadas com o plasmídeo pET28 sem o gene, com o peso molecular de aproximadamente 18 kDa no extrato proteico total (ET) (Figura 16 A). A proteína recombinante (rMrSPI2) é expressa nas frações solúvel (FS) e insolúvel (FI) do extrato bacteriano (Figura 16 A – linha FI e FS). Porém, a proteína foi purificada a partir da fração solúvel por meio de cromatografia de afinidade da cauda de histidina (HisTag) à coluna de Níquel, a qual exibiu uma única banda em SDS-PAGE sob condições desnaturantes (Figura 16 A - 1 e 2). A proteína rMrSPI2 foi tratada com trombina (Figura 16 B), para a clivagem da cauda His-Tag da região N-terminal, exibindo portanto uma massa molecular de aproximadamente 16,3 kDa. Essa massa encontram-se de acordo com o peso molecular calculado a partir do preditor pi/Mw e mostra a existência de apenas uma banda proteica MrSPI2 recombinante na fração solúvel.

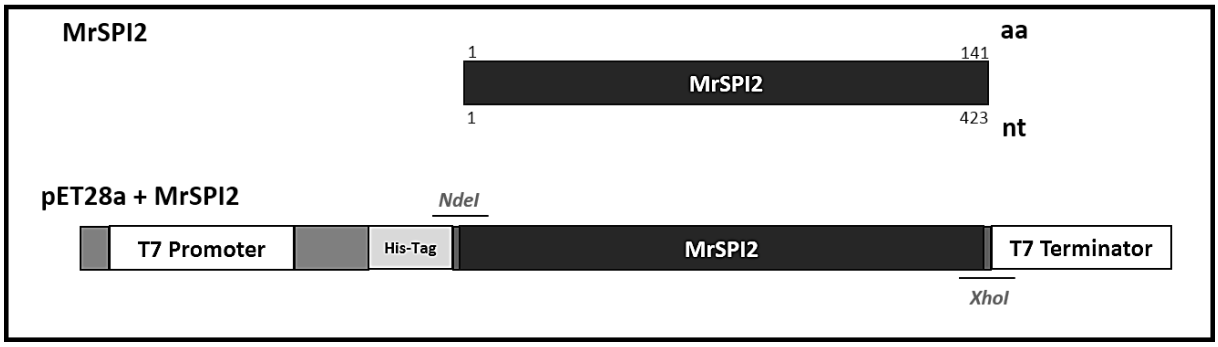

Figura 15. Mapa físico da estratégia de clonagem de MrSPI2. A sequência completa de MrSPI2 indica um fragmento de 423pb. Esse fragmento foi inserido no sítio de clonagem do vetor pET 28a. *NdeI* e *XhoI* correspondem às enzimas de restrição; His-Tag, corresponde às histidinas inseridas para facilitar a purificação.

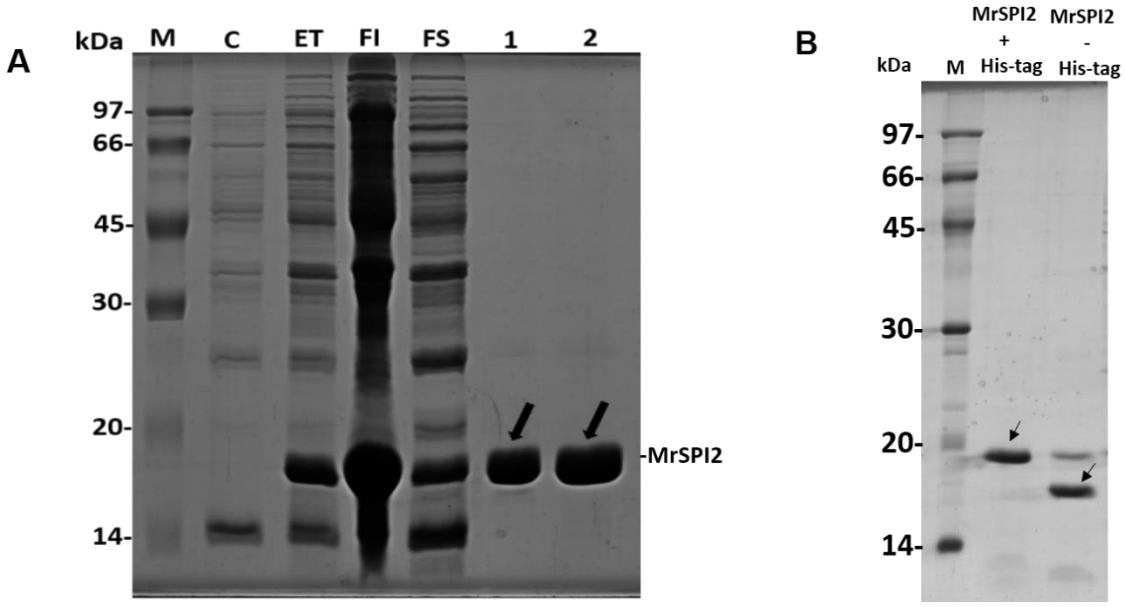

Figura 16. Expressão e purificação de rMrSPI2. (A) Análise de expressão e (B) rMrSPI2 tratada com trombina. Análise SDS-PAGE de rMrSpI2 sob condições redutoras. Na imagem A: M, padrão de massa molecular; C, controle negativo (pET-28a sem o gene); ET, extrato total; FI, fração insolúvel; FS, fração solúvel; 1 e 2 rMrSPI2 purificada com 225 mmol L^{-1} de Imidazol. E na imagem B: M, padrão de massa molecular; 1, rMrSPI2 não tratada e 2, rMrSPI2 tratada com trombina.

5.6. O Espectro de CD mostra que MrSPI2 é uma proteína termoinstável

A espectroscopia de CD da proteína apresentou curvas de elipticidade diferentes nas temperaturas de 25º e 95ºC durante a análise de escaneamento, o que indica alteração na estrutura secundária, caracterizando MrSPI2 como uma proteína termoinstável. Esta alteração é identificada devido a diferença de sinal dos espectros de CD à 25ºC (-10,71) e 95ºC (-17,89) no comprimento de onda de 223 ηm (Figura 17). Os resultados das análises dos espectros pelo programa K2D3 foram que a proteína é composta por 4,37 % de α-hélice e 28,9 % de folhas β.

Devido à diferença de sinal, a estrutura secundária de MrSPI2 foi monitorada fixando-se o comprimento de onda em 223 ηm e variando-se a temperatura para análise de *unfolding* (25º-95ºC) e *refolding* (95º-25ºC) (Figura 18). Durante o *refolding* foi observado que a proteína não retorna completamente à sua conformação, mantendo, portanto, 80% desnaturada (Figura 18), ou seja, durante o *refolding* recupera somente 20% de estrutura.

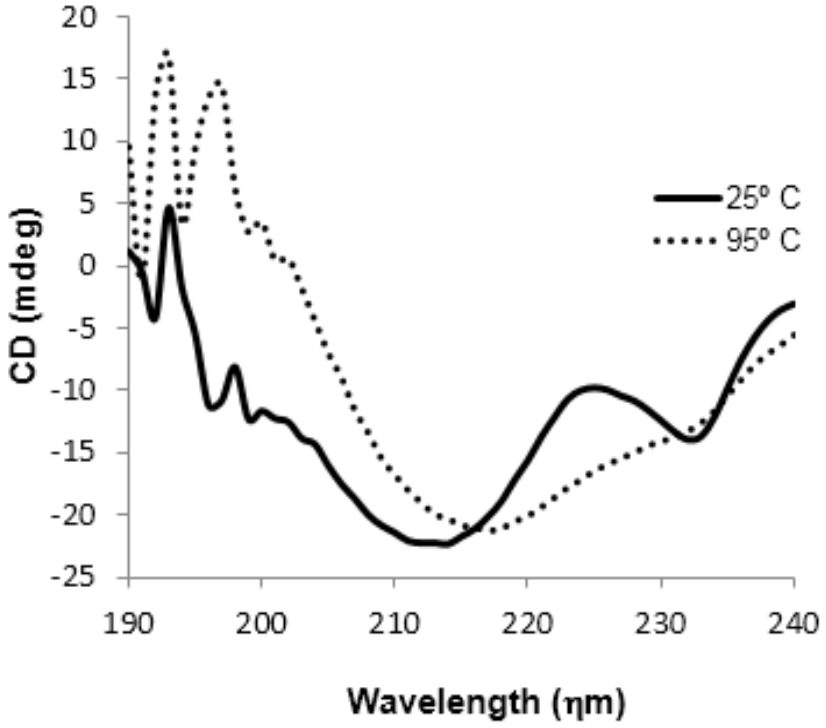

Figura 17. Avaliação dos espectros da estrutura secundária de rMrSPI2. As linhas preta e pontilhada do gráfico, mostram o comportamento da estrutura secundária da proteína à 25°C e 95°C, respectivamente, com a variação do comprimento de onda entre 190 a 240nm.

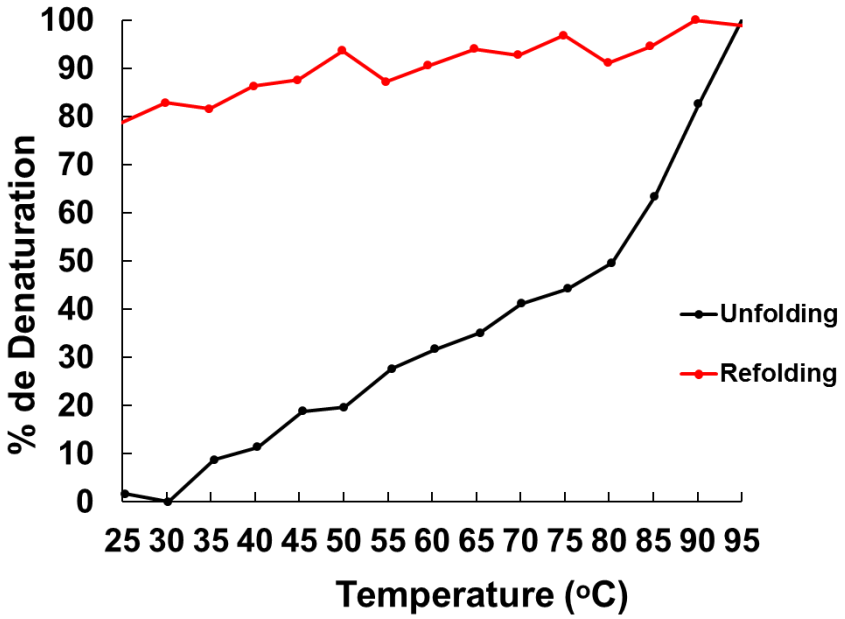

Figura 18. *Unfolding* e *Refolding* de rMrSPI2 em pH 7. O gráfico mostra a % de desnaturação da proteína de acordo com a variação da temperatura. A linha preta mostra o percentual de desnaturação com o aumento da temperatura de 25-95°C e a linha vermelha o percentual de manutenção da desnaturação com a diminuição da temperatura de 95-25°C. O comprimento de onda foi fixado em 224 ηm.

5.7. rMrSPI2 é ativo e inibe a tripsina suína

A proteína rMrSPI2 demonstrou atividade inibitória contra a tripsina suína (*Sus scrofa*). Para o ensaio da capacidade inibitória, o inibidor recombinante de *M. roreri* foi incubado em concentrações variadas (0,092 µg μL^{-1} a 0,010 µg μL^{-1}) com a tripsina (Sigma) por 10 min antes da adição do substrato cromogênico (BApNA 1,25 mM). rMrSPI2 apresentou atividade inibitória de até 38% contra a tripsina a uma concentração de 0,092 µg μL^{-1}. A capacidade inibitória é reduzida de forma acentuada com a diminuição da concentração do inibidor (Figura 19).

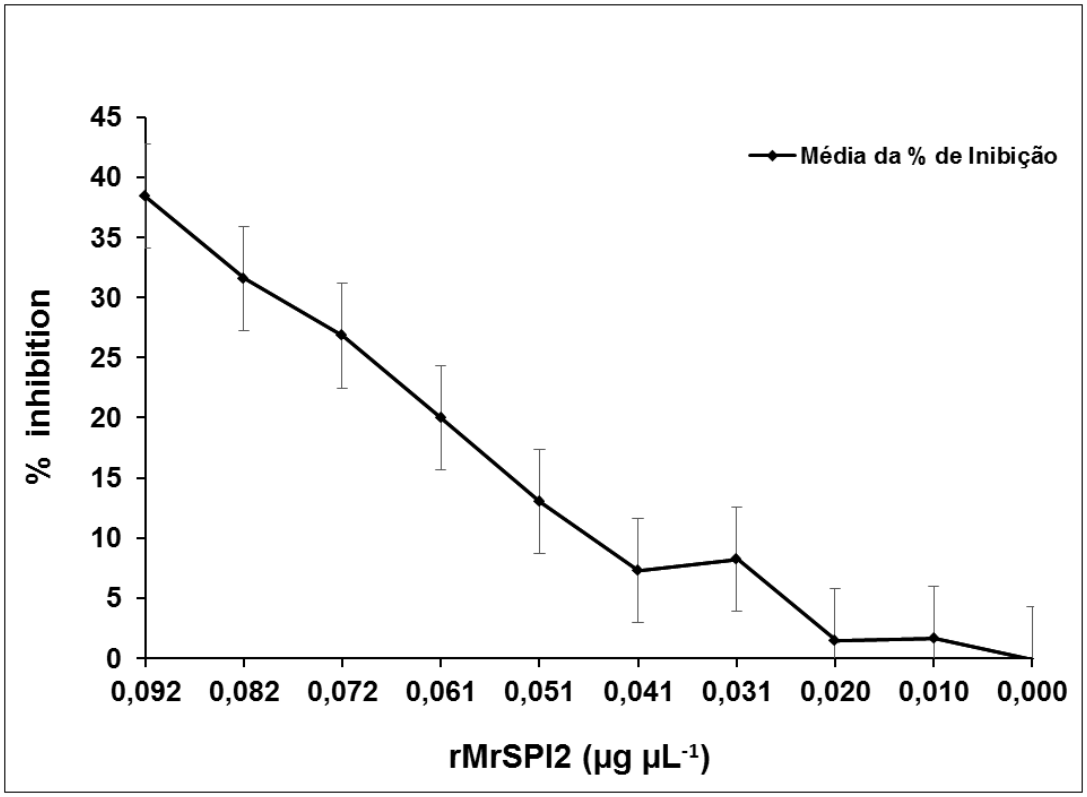

Figura 19. Teste de atividade inibitória de rMrSPI2 contra a tripsina suína. O eixo X mostra as concentrações do inibidor em µg μL^{-1} e o eixo Y, o percentual de inibição após 25 minutos de interação entre o inibidor e a protease.

5.8. Análise da capacidade de ligação do anticorpo anti-rMrSPI2 e Imunodetecção de rMrSPI2 em extratos de *E. coli*

Para a análise da capacidade de ligação do anticorpo policlonal, produzido em camundongo contra a proteína rMrSPI2, foi realizado uma diluição dos antissoros de 1:500. Apesar das bandas da proteína estarem com intensidade baixa, os antissoros dos dois camundongos imunizados foram capazes de identificar rMrSPI2, exceto o antissoro 1 do camundongo A. Mesmo que alguns antissoros não tenham sido capazes de identificar a proteína em todas concentrações, o anticorpo anti-rMrSPI2 é capaz de se ligar à proteína rMrSPI2 (Figura 20). A tabela 2 mostra de forma mais clara quais antissoros e quais concentrações de proteína foram visualizadas na revelação.

Os antissoros que apresentaram melhor titulação, ou seja, aqueles que detectaram a proteína recombinante em sua menor concentração foram escolhidos

para a purificação do anticorpo e utilizados para a imunodetecção de rMrSPI2. No entanto, antes da purificação, para testar a eficiência do anticorpo policlonal, foi realizado um western blot com as frações solúveis do extrato total bacteriano. O anticorpo sem purificação revelou a presença de rMrSPI2 purificada e nos extratos de *E. coli* (Figura 21). Além disso, foi revelado simultaneamente proteínas de *E. coli* uma vez que o anticorpo não estava purificado e outro fator importante é o reconhecimento de diferentes epítopos por ser anticorpo policlonal.

A expressão de rMrSPI2 foi analisada usando a fração proteica solúvel dos extratos de *E. coli* (Figura 22A). Além da banda correspondente à rMrSPI2, o anticorpo purificado foi capaz de identificar proteínas de *E. coli*, cuja banda pode ser vista com maior intensidade na membrana do que as bandas de rMrSPI2 (Figura 22B).

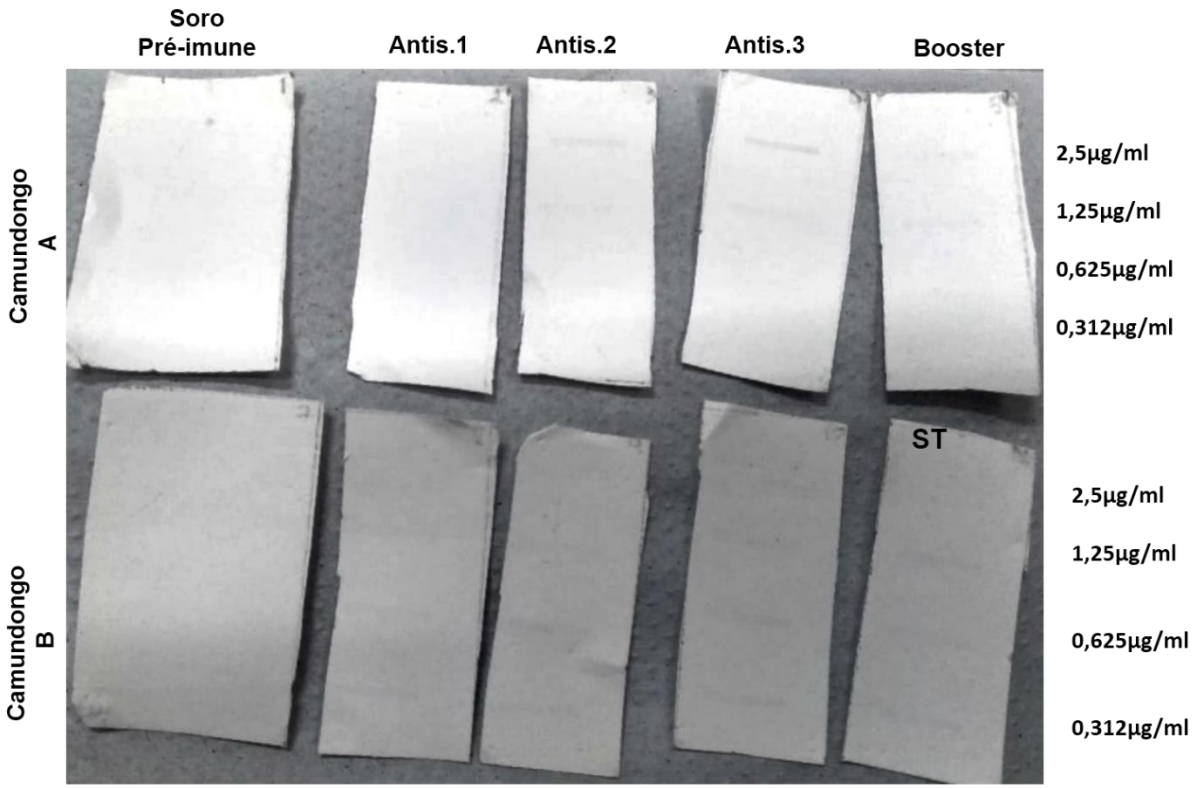

Figura 20. Análise da titulação dos antissoros. Os dois camundongos imunizados foram identificados como A e B. O soro pré-imune (coleta de sangue antes da primeira imunização); Antissoro 1 (primeira coleta após a 1ª imunização); Antissoro 2 (primeira coleta após a 2ª imunização); Antissoro 3 (segunda coleta após a 2ª imunização); Booster (antissoro 4 coletado 48h após a 4ª imunização do camundongo A); Sangria Total (antissoro 4 coletado após a 3º imunização do camundongo B). As concentrações de rMrSPI2 estão indicadas do lado direito da imagem. Apenas o antissoro 1 coletado do camundongo A não foi capaz de se ligar à proteína em nenhuma concentração.

Tabela 2. Análise da titulação dos antissoros por imunoadsorção (Dot blot).

Camundongos	Soro Pré-imune	Antissoro 1	Antissoro 2	Antissoro 3	Antissoro 4	Concentração do antígeno (rMrSPI2)* µg/mL
Camundongo A	-	-	+	+	+	2,5
	-	-	+	+	+	1,25
	-	-	-	-	-	0,625
	-	-	-	-	-	0,312
Camundongo B	-	+	+	+	+	2,5
	-	+	+	+	+	1,25
	-	+	+	+	+	0,625
	-	+	+	+	+	0,312

*MrSPI2 recombinante

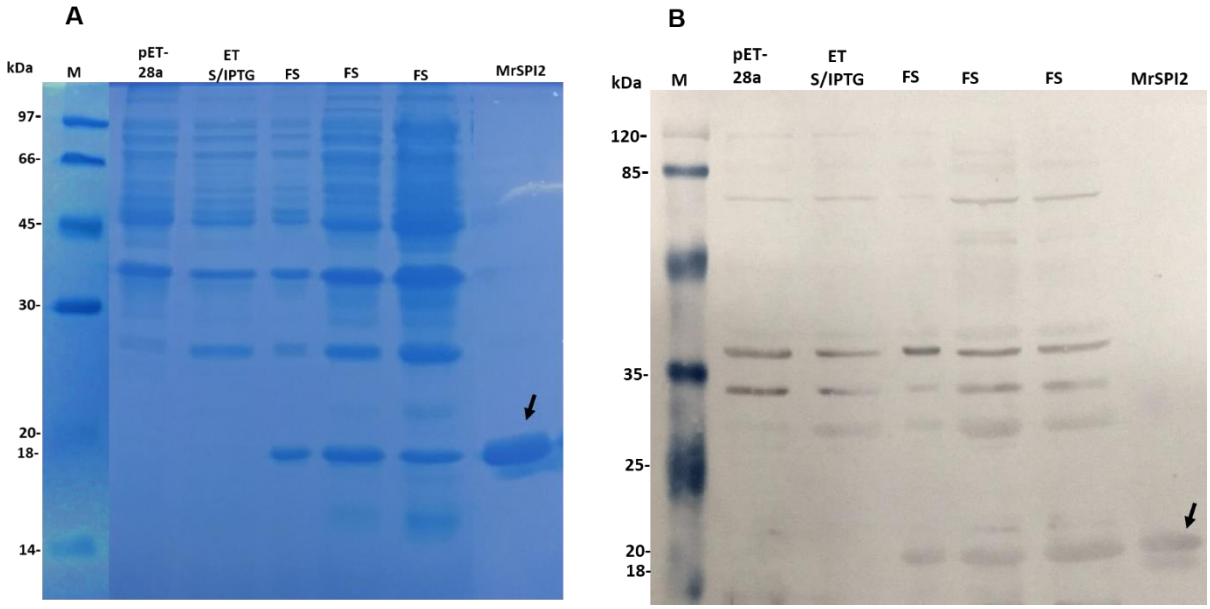

Figura 21. Imundetecção de rMrSPI2 nos extratos de *E. coli* utilizando anticorpo anti-rMrSPI2 sem purificar. A imagem A corresponde ao gel SDS-PAGE 12,5% (gel de referência/espelho do western) mostrando rMrSPI2 (indicado com a seta) nas frações solúveis do extrato bacteriano. A imagm B mostra a imunodetecção de rMrSPI2 com anticorpo policlonal anti-rMrSPI2 sem purificar. FS (fração solúvel); pET-28A (vetor sem o inserto) e ET S/ IPTG (extrato total sem o indutor IPTG).

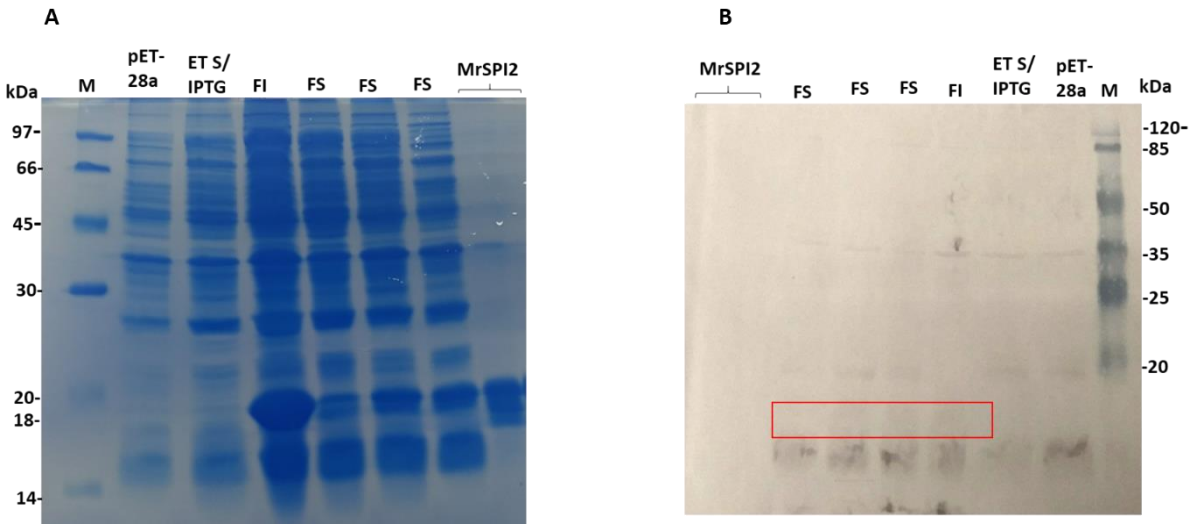

Figura 22. Imunodetecção do inibidor de tripsina, rMrSPI2, em extratos proteico de *E. coli* com o anticorpo anti-rMrSPI2 purificado. A imagem A corresponde ao gel SDS-PAGE 12,5% (gel de referência/espelho do western) mostrando rMrSPI2 nas frações solúveis do extrato bacteriano. A imagm B mostra a imunodetecção de rMrSPI2 com anticorpo policlonal anti-rMrSPI2. FS (fração solúvel); FI (fração insolúvel); pET-28A (vetor sem o inserto) e ET S/ IPTG (extrato total sem o indutor IPTG).

6. DISCUSSÃO

O estudo com inibidores de serino-protease do fungo *M. roreri*, causador da monilíase no cacaueiro, inicou-se depois que os resultados da pesquisa proteômica de Zugaib (2016) revelou a presença de inibidores em esporos não germinados de *M. roreri,* sugerindo-o como um fator de virulência. Isso porque em uma interação planta-patógeno, a secreção de proteases e inibidores de proteases desempenham papeis cruciais na “corrida armamentista” ao contribuir para a defesa e/ou invasão (HORGER E VAN DER HOORN., 2013; JASNHI et al., 2015; TORUNO et al., 2016; BALAKIREVA E ZAMYATNIN, 2018; HOU et al., 2018). Muitos fungos patogênicos empregam uma gama de efetores que atuam como inibidores de proteases para superar o sistema imune do hospedeiro, mediado por proteases de resistência, muitos dos quais atuam como fator de virulência (JASNHI et al., 2015; TORUNO et., 2016).

A sequência de aminoácidos do inibidor de serino-protease de *M. roreri* foi encontrada no banco de dados NCBI, depositado após análises de sequenciamento do genoma e estudos transcriptômicos relacionados aos mecanismos moleculares da fase biotrófica e necrotrófica realizados por (Meinhardt et al., 2014).

A proteína MrSPI2 possui 141 resíduos de aminoácidos e devido à alta similaridade de sequência foi atribuída à família I66. Os inibidores pertencentes a essa família são pequenas proteínas com peso molecular de 16, 18 e 16,4 kDa, respectivamente, possuindo pontos isoelétricos ácidos e exibem perfis inibitórios muito semelhantes.

O inibidor MrSPI2, presente no genoma de *M. roreri* (isolado MCA 2997) foi clonado e caracterizado em níveis moleculares. MrSPI2 exibe propriedades bioquímicas semelhantes a estes inibidores, possuindo ponto isoelétrico de 4,76 e massa molecular de 16,3 kDa. Os inibidores dessa família são todos inibidores de serino-proteases denominados micospins (SABOTIC et al., 2016). As funções desses inibidores fúngicos envolvem mecanismo de defesa direcionado contra proteases exógenas, protegendo-o de pragas e patógenos, assim como a regulação de proteases endógenas contribuindo para o desenvolvimento do corpo de frutificação (AVANZO et al., 2009; SABOTIC et al., 2012; DUNAEVSKY et al., 2014).

A proteína MrSPI2 não possui peptídeo sinal (PS) para a secreção através do retículo endoplasmático, o que pode indicar que a proteína, provavelmente, não é endereçada para a rota secretora através da via de secreção convencional. No entanto, existem as vias alternativas de secreção de proteínas chamadas UPS (secreção não convencional de proteína) (RABOUILLE et al. 2012; RABOUILLE, 2017). Existem duas categorias de proteínas que são secretadas de forma não convencional. A primeira compreende proteínas citoplasmáticas sem PS que atravessam a membrana e são ativas no meio extracelular, apesar de não ter PS ou domínio transmembrana (RABOUILLE et al. 2012; RABOUILLE, 2017). Além disso, as proteínas sem peptídeo sinal podem ter outras características necessárias para a secreção e direcionamento para as células hospedeiras (RIDOUT et al., 2006; CATANZARITI et al., 2006; RABOUILLE, 2017).

Da mesma forma, as proteínas efetoras Avra10 e Avrk1 do ascomiceto patogênico *Blumeria graminis* pv. *hordei* (Bgh), que causa infecções na cevada (oídeo da cevada), não são codificadas com peptídeo sinal no N-terminal para a secreção (RIDOUT et al., 2006). Porém, são reconhecidas pelas proteínas intracelulares de resistência da cevada quando expressas transientemente em planta e, além disso, em plantas suscetíveis, a infecção é aumentada, sendo proposto uma via alternativa de secreção não-endomembranar (RIDOUT et al., 2006). Outras proteínas fúngicas que

funcionam como efetores são secretadas de forma não convencional (NOMBELA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008; GIRALDO et al., 2012).

A análise de sequência entre os dois representantes da família I66 indicou alguns resíduos conservados, incluindo o resíduo Arginina (R^{21}) da posição 21. Os inibidores de Tripsina possuem arginina ou lisina como resíduos principais do sítio ativo (resíduo P1'), os quais conferem especificidade à enzima (LAKOWSKI E QASIM, 2000). Os inibidores de serino-protease do tipo tripsina, Cospin de *C. cinerea* e Cnispin de *C. nebularis,* possuem Arg^{27} (R^{27}) e a Lys^{127} (K^{127}) como principais resíduos do sítio ativo, respectivamente, os quais são responsáveis pela atividade inibitória das proteases alvo (AVANZO et al., 2014 e 2009; SABOTIC et al., 2012). Apesar de MrSPI2 possuir uma arginina na posição 21, esta não corresponde ao resíduo do sítio ativo, e sim a arginina da posição 41 (Arg^{41}) que interage com o sítio ativo da protease como mostrado no resultado de acoplamento molecular.

As análises de similaridade de sequência foram realizadas com outros basidiomicetos, *C. cinerea, P. centrifuga*, *L. bicolor* e *M. perniciosa* que exibem adaptações ambientais diferentes, sendo dois cogumelos saprofíticos, um ectomicorriza que produz cogumelo e um patógeno de planta, respectivamente (refs). MrSPI2 apresenta uma alta identidade de sequência com uma proteína hipotética anotada no genoma de *M. perniciosa* e com outras proteínas com domínios de inibidores de serino-protease presente em outros basidiomicetos. A alta identidade de sequência entre *M. roreri* e *M. perniciosa* sustenta a relação taxonômica entre as duas espécies (MEINHARDT et al., 2014; BAILEY et al., 2018) e a relação deste fungo com outros basidiomicetos, incluindo o fungo saprofítico *D. bispora* (VARGA et al., 2019).

A análise do dendograma mostra que, apesar da similaridade de sequência significativa de MrSPI2 com outros inibidores de serino-protease do fungo *M. roreri* e de outras espécies de Basidiomicetos, as pequenas variações nas sequências agrupam essas proteínas em ramos diferentes (Figura 5). MrSPI2 se encontra em um ramo separado dos demais inibidores de serino-protease do mesmo gênero *M. roreri,* incluindo MrSPI1, confirmando assim a dissimilaridade de sequência entre as duas, a qual foi um dos critérios inicialmente adotados para a escolha da sequência de estudo, MrSPI2. As pequenas variações entre as sequências de inibidores de *M. roreri* pode ser uma das estratégias de adaptação que evoluíram para um mecanismo de regulação ou inibição mais eficiente e variável. Essa variação pode contribuir para

uma diversificação da atividade do inibidor, de modo que um conjunto de diferentes classes de proteases podem ser reguladas/inibidas (HOGER E VAN DER HOORN, 2013; DONG et al., 2015). Logo, os resíduos variantes podem afetar a especificidade da interação do inibidor com as proteases alvos.

A estrutura tridimensional do inibidor predita por homologia de sequência, mostra um bom modelo para análises *in silico*, uma vez que a maioria dos resíduos de aminoácidos encontra-se em regiões favoráveis (energeticamente adequadas) segundo o gráfico de validação Ramachandran gerado para a estrutura predita. Em uma modelagem por homologia, um bom modelo de estrutura 3D deve ter acima de 90% de resíduos em regiões favoráveis (LASKOWSKI *et al*., 1993).

Em outra análise da validação através do ProSA, a estrutura tridimensional (3D) de MrSPI2 apresenta o Z-score de -5,35 (qualidade geral do modelo baseado nas estruturas de proteínas determinadas por cristalografia de raio-X ou Ressonância Magnética Nuclear-RMN que estão depositadas no banco de dados PDB) e, portanto, se encontra dentro dos grupos das estruturas de proteínas nativas determinadas por raio-X e RMN (Ressonância Magnética Nuclear) depositadas no banco de dados PDB (WIEDERSTEIN e SIPPL, 2007).

A estrutura da proteína apresenta predominância de folhas betas, duas alfa hélice e várias regiões de alças, típicas de proteínas com estrutura β-trefoil (RENKO et al., 2010 e 2012). Os inibidores fúngicos da família I66 (Micospins), I48 (Clitocipin de *Lepista nebularis*) e I85 (Macrocipin de *Macrolepiota procera*) (SABOTIC et al, 2007 e 2009; SABOTIC et al., 2016), as proteínas do tipo lectinas e os inibidores de tripsina de soja do tipo Kunitz da família I3 apresentam esse tipo de estrutura (RENKO et al., 2012; ZURGA et al., 2015). A dobra β-trefoil é composta por 12 folhas β dobradas em três unidades semelhantes a um trevo de três folhas (Figura 14A). A estrutura β-trefoil assemelha-se a uma árvore (Figura 14B) (ZURGA et al., 2015).

Dentre as 12 folhas β antiparalelas, conectadas por alças, três pares formam uma estrutura de barril (tronco) e os outros três pares em um disposição triangular que cobre o barril formando a região da coroa (Figura 14B) (RENKO et al 2010, 2012). As alças são referidas pelas folhas β às quais estão ligadas, por exemplo, a alça que conecta as folhas β1 e β2 é chamada de alça β1-β2. O número total de alças presentes nas estruturas β-trefoil são 11, sendo 9 na região da coroa (6 posicionadas no nível

mais baixo da coroa e 3 no topo da coroa) e 2 estão na região abaixo do barril, formando a raiz (RENKO et al., 2012; ZURGA et al., 2015).

Os inibidores de protease com dobra β-trefoil podem utilizar suas alças de várias maneiras para a inibição de suas proteases, os quais podem conferir inibição da mesma protease através de diferentes alças e inibição de diferentes proteases através da mesma alça (RENKO et al, 2012; AVANZO et al, 2014). O possível sítio reativo de MrSPI2 (Arg^{41}) está localizado entre as alças β3 e β4, de acordo com o alinhamento feito com dois homólogos bem caracterizados da família I66 (Figura 3).

A Arg41 corresponde ao resíduo P1' de MrSPI2 devido a sua interação com as serino-proteases do tipo tripsina e subtilase no *docking* realizado no presente trabalho. MrSPI2 utiliza uma alça diferente (β3-β4) para a inibição da tripsina em comparação com os outros inibidores com dobras beta-trefoil, incluindo os homólogos Cospin (PIC1) e Cnispin, que possuem o resíduo P1', Arg^{27} e Arg^{127}, localizados nas alças β2–β3 e β11-β12, respectivamente (SABOTIC et al, 2012; AVANZO et al, 2014). Em outros inibidores fúngicos (família I48 e I85 - Micocipins) o resíduo P1' está localizado nas alças β1- β2, β3- β4, β5–β6 (SABOTIC et al., 2016). Os inibidores de origem vegetal também apresentam estrutura do tipo dobra β-trefoil, nos quais diferentes alças estão envolvidas na inibição das proteases alvos (SONG E SULL, 1998; BAO et al., 2009; MICHEELSEN et al., 2008).

No complexo enzima-inibidor formado durante a análise *in silico* de acoplamento molecular, o resíduo Arg^{41} de MrSPI2, se ajustou bem à fenda catalítica da tripsina de *Sus scrofa.* A Arg^{41} interage com o resíduo Ser195 do sítio ativo da tripsina suína. Além disso, o resíduo Glu^{40} presente na alça de ligação também interage com a Gln^{192} da enzima. Essa interação pode contribuir para a formação do complexo e para a rigidez estrutural da alça de ligação (KOJIMA et al., 1999; SWEDBERG et al, 2011; RENKO et al., 2012). Em Cospin, além da Arg^{27}, outros resíduos como o aspartato (Asp^{26}), leucina (Leu^{29}) e glutamato (Glu^{25}) contribuem para a interação do inibidor com a enzima (SABOTIC et al, 2012). Estes resíduos podem sofrer alteração corformacional e se ligar ao sítio ativo da enzima estabilizando a ligação enzima-inibidor (SABOTIC et al, 2012).

A interação de MrSPI2 com a tripsina suína foi observada também *in vitro* através da redução da atividade catalítica da enzima. A capacidade inibitória diminuiu proporcionalmente com a diminuição da concentração do inibidor, sendo assim, a

estratégia de clonagem e expressão resultaram na produção de uma proteína ativa. Como a redução da atividade da enzima não foi tão alta (apenas 38%), podemos sugerir que MrSPI2 não é um forte inibidor e não forma um complexo tão estável com a tripsina, ao contrário dos seus homólogos Cospin e Cnispin. Estes inibem fortemente a tripsina com elevada especificidade e uma Ki na faixa picomolar e nanomolar, respectivamente, enquanto uma inibição mais fraca da subtilisina, calicreína e elastase foi observada (AVANZO et al., 2014; SABOTIC et al., 2012). Logo, sugerimos que MrSPI2 pode não ter evoluído para inibir proteases de origem animal.

O perfil inibitório contra a tripsina apresentado pelos inibidores da família I66, I85 e I48 revela que estes são inibidores canônicos clássicos (mecanismo padrão de inibição) que se liga ao sitio ativo de forma semelhante ao substrato, formando um complexo estável e firme com a tripsina (AVANZO et al., 2014; SABOTIC et al., 2012). De maneira geral, os inibidores de proteases da família S1 (tripsina e quimotripsina) atuam de acordo com o mecanismo padrão de inibição pois, todos exibem uma alça de ligação à protease com uma conformação canônica característica. A conformação da alça consiste em ligações dissulfeto, hidrogênio e interações hidrofóbicas que envolvem tanto os resíduos da alça quanto os resíduos do barril e da coroa do inibidor com dobras β-trefoil (LASKOWSKI E QASIM, 2000; KROWRSCH et al., 2003).

A busca por serino-proteases do tipo tripsina no genoma de *T. cacao* revela que estas enzimas consistem em proteínas oligoméricas que pertencem à família S1C do MEROPS, nomeadas de DegP protease, as quais não foram caracterizadas. Em *Arabidopsis* estão no lúmen do tilacoide dos cloroplastos, atuando no reparo eficiente do fotosistema II (PSII) sob estresse luminoso (SUN et al., 2007; KATO et al., 2012). As tripsinas de *T. cacau* ainda não foram caracterizadas e, o seu possível local de atuação, baseado nas proteases DegP de *Arabidopsis,* sugerem que estas não são alvos de inibidores exógenos de patógenos como MrSPI2 de *M. roreri.*

No entanto, as serino-proteases do tipo subtilase, pertencentes à família S8 do MEROPS, foram encontradas no fluido apoplasto de folhas de *T. cacao* (BARBOSA et al, 2018). As subtilases possuem o mecanismo e a tríade catalítica (Aspartato-D, Histidina-H e Serina-S) semelhantes às serino-proteases do tipo tripsina (DODSON E WLODAWER,1998). Por estarem envolvidas em mecanismos de defesa em plantas (FIGUEIREDO et al., 2016 e 2018), podem ser possíveis alvos para o inibidor MrSPI2, reduzindo a ação dessas enzimas durante a infecção. A subtilase SBT1.7 de *T. cacao*,

escolhida após predição da estrutura tridimensional e análise de acoplamento molecular, foi indicada para ser o alvo do inibidor. Isto porque MrSPI2 interage com a subtilase SBT1.7 através da Arg^{41} que se ajustou bem ao sítio reativo da enzima.

No acoplamento com a subtilase do *T. cacao* (SBT1.7), Arg^{41} de MrSPI2 se ligou ao sítio ativo da enzima com os dois resíduos de aminoácidos da tríade da protease, a serina 542 e a histidina 212, e portanto possui uma maior interação com a SBT1 de *T. cacao* do que com a tripsina de *Sus scrofa.* O mapa de interação mostra que as ligações entre os principais resíduos do sítio ativo do inibidor realizam ligações de hidrogênio. Estas ligações são típicas da interação protease-inibidor, as quais permitem a estabilização e contribuem para a rigidez estrutural e consequentemente aumenta a afinidade de ligação à enzima (KROWARSCH et al, 2003; SWEDBERG et al, 2011). Essa interação corrobora com a facilidade de inibição demonstrada pelos inibidores clássicos de serino-protease em afetar a atividade da subtilase de *A. thaliana*, ARA12 (HAMILTON et al., 2003).

Assim, MrSPI2 utiliza a mesma alça inibitória para interagir com dois tipos de serino-proteases, a tripsina e a subtilase, demonstrando versatilidade da sua alça. Esta característica está presente em outros inibidores com dobra β-trefoil, onde a mesma alça inibitória pode ter como alvos diferentes proteases dependendo do resíduo P1 (ARAÚJO et al., 2005; RENKO et al., 2010).

Assim como sugerido para a SBT1 de *T. cacao*, outras subtilases caracterizadas em plantas demonstraram estar envolvidas em processos de reconhecimento de patógenos, indução de vias de sinalização de sistema de defesa e morte celular programada, limitando assim o desenvolvimento de patógenos (RAMIREZ et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2014; SCHALLER et al., 2018). No entanto, as subtilases são alvos de efetores de patógenos, dentre estes, inibidores de protease são cruciais para a supressão eficaz das defesas de plantas (TIAN et al., 2004, 2005; VAN DER HOORN, 2008; GINDRO et al., 2012).

Para comprovar a interação de MrSPI2 com a subtilase, foi realizado uma captura em resina CNBr-Sepharose das proteínas presentes no fluido apoplástico de *T. cacao*. Adicionalmente, também foi realizado a extração de proteínas totais da casca do fruto do cacau para captura de possíveis serino-proteases alvos de MrSPI2. No entanto, os resultados da captura das proteases alvos ainda não foram obtidos até o momento.

O dicroísmo circular (CD) mostrou espectro característico para uma proteína estruturada, sendo portanto possível deduzir através da análise dos espectros a estrutura secundária de rMrSPI2 e correlaciona com a análise de modelagem da estrutura tridimensional da proteína (Figura 6A). Esse tipo de estrutura é típico de inibidores de serino-protease com dobras β-trefoil (SABOTIC et al., 2009; RENKO et al., 2010 e 2012; AVANZO et al., 2014). A região de alça da estrutura confere flexibilidade aos inibidores β-trefoil para inibir enzimas de diferentes classes (AVANZO et al., 2014; RENKO et al., 2010 e 2012).

Durante o monitoramento da estrutura tridimensional do inibidor foi observado que esta não se mantém à tratamentos de altas temperaturas e não apresenta potencial para retornar à sua conformação original por completo com a diminuição da temperatura (re-enovelar), uma vez que recupera somente 20% de sua estrutura, mantendo-se assim 80% desnaturada. Dessa forma, MrSPI2 possui um comportamento diferente dos inibidores com estrutura β-trefoil, os quais possuem alta estabilidade térmica, nos quais as diferentes alças permitem a exibição de diferentes funções bioquímicas (RENKO et al., 2010; AVANZO et al., 2009; SABOTIC et al., 2009 e 2012; SABOTIC et al., 2016).

A fim de identificar uma proteína de alta identidade (60%) com MrSPI2 em extratos de micélio do fungo *M. perniciosa* e propormos o estágio de desenvolvimento em que o inibidor é expresso, produzimos anticorpos anti-MrSPI2 em camundongos (*Mus musculus*), raça Black-C57. Ao longo da produção do anticorpo foi observado que a proteína MrSPI2, utilizada como antígeno, possui baixa capacidade imunogênica, uma vez que o anticorpo anti-MrSPI2 foi produzido em baixa concentração pelo camundongo, sendo necessário portanto uma concentração alta de proteína para a titulação. Adicionalmente, o processo de purificação do anticorpo não foi eficiente e portanto não podemos prosseguir com as análises posteriores.

7. CONCLUSÃO

Mediante os resultados expostos, MrSPI2 possui similaridade de sequência com outros inibidores de Basidiomicetos , é uma proteína termoinstável e inibe a tripsina suína. Devido a interação *in silico* com a subtilase SBT1 do cacaueiro, MrSPI2 pode estar relacionado a mecanismos de ataque, atuando como fator de virulência de *M.*

roreri, e possivelmente é secretado para inibição de proteases exógenas relacionadas à defesa em *T. cacao.* Assim, este pode ser considerado como alvo para o desenvolvimento de estrátegias de controle da monília e auxiliar no entendimento do mecanismo de ataque de *M. roreri* contra o cacaueiro.

8. PERSPECTIVAS

Os resultados sobre o potencial de captura de possíveis serino-proteases e de outras subtilases imobilizadas na resina ainda serão obtidos após identificadas por espectrometria de massas.

Anticorpos policlonais contra a proteína recombinante, que foram produzidos em camundongos, serão utilizados para analisar a presença de um inibidor homólogo à proteína MrSPI2 nos micélios de *M. perniciosa* para que seja sugerido o estágio de desenvolvimento do fungo que a proteína é expressa.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIME, M.C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97: 1012-1022. 2005.

ARAÚJO, A. P. U.; HANSEN, D.; VIEIRA, D. F.; de OLIVEIRA, C.; SANTANA, L. A.; BELTRAMINI; L. M.; OLIVA, M. L. V. Kunitz type Bauhinia bauhinioides inhibitors devoid of disulfide bridges: isolation of the cDNAs, heterologous expression and structural studies. **Biological chemistry**, v. 386, n. 6, p. 561-568, 2005.

ARANZAZU, F.; CASTILLO, J. L.; ZULUAGA, L. Escoba de bruja en Colombia su impacto económico y manejo. In: MEJÍA, A.; ARGUELLO, C. O. **Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao**. Bucaramanga, Colombia: Corpoica - Ministerio de Agricultura, 2000.

AVANZO, P.; SABOTIČ, J., ANŽLOVAR, S., POPOVIČ, T., LEONARDI, A., PAIN, R.; KOS, J.; etBRZIN, J. Trypsin-specific inhibitors from the basidiomycete Clitocybe nebularis with regulatory and defensive functions. **Microbiology**, v. 155, n. 12, p. 3971-3981, 2009.

AVANZO, C. P.; RENKO, M.; TURK, D.; KOS, J.; AND SABOTIC, J. Fungal β-trefoil trypsin inhibitors cnispin and cospin demonstrate the plasticity of the β-trefoil fold**.** **Biochimica Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 10, p. 1749-1756, 2014.

ALI, S. S.; MELNICK, R. L.; CROZIER, J.; PHILLIPS-MORA, W.; STREM, M. D.; SHAO, J.; ZHANG, D.; SICHER, R.; MEINHARDT, L.; BAILEY, B.A. Successful pod infections by Moniliophthora roreri result in differential Theobroma cacao gene expression depending on the clone's level of tolerance. **Molecular plant pathology**, v. 15, n. 7, p. 698-710, 2014.

BARROS, O. Avances en la represión de la moniliasis del cacao. Proceedings of the Eighth International Cocoa Research Conference. In: **Proceedings of the Eighth International Cocoa Research Conference**. 8th., 1981, Cartagena, Colômbia. Proceedings. Lagos, Nigeria: Cocoa Producers' Allliance, 1982. p. 401-405.

BARBOSA, IVINA DE OLIVEIRA. Proteínas apoplásticas de genótipos contrastantes de cacau envolvidas na defesa contra *Moniliophthora perniciosa*. 2018.p.98. . Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, Ilhéus.

BALAKIREVA, A. V; ZAMYATNIN, A. A. Indispensable role of proteases in innate plant immunity. **Revista internacional de ciências moleculares**, v. 19, n. 2, p. 629, 2018.

BAILEY, B. A. et al. Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri.* **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 81, p. 84-96, 2013.

BAILEY, B. A.; MELNICK, R. L.; STREM, M.D.; CROZIER, J.; SHAO, J.; SICHER, R.; PHILLIPS-MORA, W.; ALI, S. S.; ZHANG, D.; MEINHARDT, L**.** Differential gene expression by *Moniliophthora roreri* while overcoming cacao tolerance in the field. **Molecular plant pathology**, v. 15, n. 7, p. 711-729, 2014.

BAILEY, B. A.; EVANS, H. C.; PHILLIPS-MORA, W.; ALI, S. S.; MEINHARDT, L. W. *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. **Molecular plant pathology**, v. 19, n. 7, p. 1580-1594, 2018.

BAO, R.; ZHOU, C. Z.; JIANG, C.; LIN, S. X.; CHI, C. W.; CHEN, Y. The ternary structure of the double-headed arrowhead protease inhibitor API-A complexed with two trypsins reveals a novel reactive site conformation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 39, p. 26676-26684, 2009.

BOZKURT, T. O. et al. *Phytophthora infestans* effector Avr blb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 108, n. 51, p. 20832-20837, 2011.

BUCZEK, O.; KOSCIELSKA-KASPRZAK, K.; KROWARSCH, D.; DADLEZ, M.; OTLEWSKI, J. Analysis of serine proteinase-inhibitor interaction by alanine shaving. **Protein science**, v. 11, n. 4, p. 806-819, 2002.

BOZA, E. J.; MOTAMAYOR, J. C.; AMORES, F. M.; CEDENO-AMADOR, S.; TONDO, C. L.; LIVINGSTONE, D. S.; SCHNELL, R.; GUTIERREZ, A. O. Genetic

characterization of the cacao cultivar CCN 51, its impact and significance on global cacao improvement and production. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 139, n. 2, p. 219-229, 2014.

COUTO, D.; ZIPFEL, C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 537, 2016.

CAGLIČ, P. A.; RENKO, M.; TURK, D.; KOS, J.; SABOTIC, J. Fungal β-trefoil trypsin inhibitors cnispin and cospin demonstrate the plasticity of the β-trefoil fold. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 10, p. 1749-1756, 2014.

CATANZARITI, ANN-MAREe et al. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. **The Plant Cell**, v. 18, n. 1, p. 243-256, 2006.

CLEMENTE, M.; CORIGLIANO, M. G.; PARIANI, S. A.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. F.; SANDER, V. A.; RAMOS-DUARTE, V. A. Plant Serine Protease Inhibitors: Biotechnology Application in Agriculture and Molecular Farming. **International journal of molecular sciences,** v. 20, n. 6, p. 1345, 2019.

CURSINO-SANTOS, J. R.; DEFINA, T. P. A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Os segredos das plantas e de seus patógenos na era molecular**.** Ribeirão Preto, 41 p., 2003.

DE LA CRUZ, M.T., GARCIA, C.O., ORTIZ, D.T., AGUILERA, A.M. AND DIAZ, C.N. (2011). Temporal progress and integrated management of frosty pod rot (Moniliophthora roreri) of cocoa in Tabasco, Mexico. **Journal of Plant Pathology**, p. 31-36, 2011.

DALIO, D; RONALDO, J. **Deciphering mechanisms of pathogenicity and resistance induction in the interaction between *Phytophthora* spp*.* and European beech (*Fagus sylvatica* L.)***.** 2013. Ph.D. Thesis. Technische Universitaet Muenchen (TUM), Freising, Germany, 2013.

DALIO, R. J. D.; MAGALHÃES, D. M.; ATÍLIO, L. B.; RODRIGUES, C. M.; BRETON, M. C.; PICHI, S.; PASCHOLATI, S. F.; MACHADO, M. A. Efetores na interação planta-patógeno. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.22, p. 25-68, 2014.

DE JONGE, R. et al. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. **Science**, v. 329, n. 5994, p. 953-955, 2010.

DIAZ-MENDOZA, M.; VELASCO-ARROYO, B.; SANTAMARIA, M. E.; GONZÁLEZ-MELENDI, P.; MARTINEZ, M.; DIAZ, I. Plant senescence and proteolysis: Two processes with one destiny. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 329-338, 2016.

DODSON, GUY; WLODAWER, ALEXANDER. Catalytic triads and their relatives. **Trends in biochemical sciences**, v. 23, n. 9, p. 347-352, 1998.

DUARTE, K. M. R. Protocolos e normas para uso de animais de laboratório para produção de anticorpos e soros. **Boletim de Indústria Animal, Nova Odessa (SP)**, v. 2, n. 64, p. 167-177, 2007.

DATTAGUPTA, J. K.; PODDER, A.; CHAKRABARTI, C.; SEN, U.; MUKHOPADHYAY, D.; DUTTA, S. K.; SINGH, M. Refined crystal structure (2.3 A) of a double-headed winged bean alpha-chymotrypsin inhibitor and location of its second reactive site**. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 35, n. 3, p. 321-331, 1999.

DIXON, M. S.; GOLSTEIN, C.; THOMAS, C. M.; VAN DER BIEZEN, E. A., JONES, J. D. G. Genetic complexity of pathogen perception by plants: the example of Rcr3, a tomato gene required specifically by Cf-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 8807-8814, 2000.

DUNAEVSKY, Y. E. POPOVA, V. V., SEMENOVA, T. A., BELIAKOVA, G. A., E BELOZERSKY, M. A. Fungal inhibitors of proteolytic enzymes: Classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use. **Biochimie**, v. 101, p. 10-20, 2014.

EVANS, H. C. et al. Pod rot of cacao caused by Moniliophthora (Monilia) roreri. **Phytopathological papers**, n. 24, 1981.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; PHILLIPS, W.; WILKINSON, M. J**.** What's in a name: *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa? **Mycologist**, v. 16, p. 148-152, 2002.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; REID, A. P. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. **Plant Pathology**, v. 52, p. 476-485, 2003.

EVANS, H. C. Cacao diseases – The trilogy revisited**. Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1640-1643, 2007.

EVANS, H. C.; BEZERRA, J. L.; BARRETO, R. W. Of mushrooms and chocolate trees, aetiology and phylogeny of witches' broom and frosty pod diseases of cacao. **Plant Pathology**, v. 62, n. 4, p. 728-740, 2013.

EVANS, Harry C. Frosty pod rot (Moniliophthora roreri). In: **Cacao Diseases**. Springer, Cham, 2016. p. 63-96.

ENRÍQUEZ, G.; SUÁREZ, C. Monilia disease of cacao in Costa Rica. **Turrialba Turrialba**, v. 28, n. 4, p. 339-340, 1978.

EHRMANN, M.; CLAUSEN, T. Proteolysis as a regulatory mechanism. **Annu. Rev. Genet**., v. 38, p. 709-724, 2004.

EL-GEBALI, S.; MISTRY, J.; BATEMAN, A; EDDY, S. R.; LUCIANI, A.; POTTER, S. C.; QURESHI, M.; RICHARDSON, L. J.; SALAZAR, G. A.; SMART, A.; SONNHAMMER, E. L. L.; HIRSH, L.; PALADIN, L.; PIOVESAN, D.; TOSATTO, S. C.

E.; FINN, R. D**.** The Pfam protein family. **Nucleic Acids Research**, v. 47, p. 427-432, 2019.

FIGUEIREDO, J.; COSTA, G. J.; MAIA, M.; PAULO, O. S.; MALHÓ, R.; SOUSA SILVA, M.; FIGUEIREDO, A. Revisiting Vitis vinifera subtilase gene family: a possible role in grapevine resistance against Plasmopara viticola**. Frontiers in plant science**, v. 7, n. 1783, 2016.

FIGUEIREDO, A.; MONTEIRO, F.; SEBASTIANA, M. Subtilisin-type proteases in the recognition of plant pathogens and immune priming: a perspective. **Frontiers in plant science**, v. 5, n. 739, 2014.

FIGUEIREDO, Joana et al. Revisiting Vitis vinifera subtilase gene family: a possible role in grapevine resistance against *Plasmopara viticola*. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1783, 2016.

FIGUEIREDO, J.; SOUSA SILVA, M.; FIGUEIREDO, A. Subtilisin-like proteases in plant defence: The past, the present and beyond. **Molecular plant pathology**, v. 19, n. 4, p. 1017-1028, 2018.

FIORIN, G. L. et al. Suppression of plant immunity by fungal chitinase-like effectors. **Current Biology,** v. 28, n. 18, p. 3023-3030. e5, 2018.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

GARCÍA, C. O.; TORRES, M.; HERNÁNDEZ, S. Comparación de dos sistemas de manejo del cultivo del cacao, en presencia de *Moniliophthora roreri*, en México. **Revista fitotecnia mexicana**, v. 38, n. 2, p. 191-196, 2015.

GETTINS, P. G. Serpin structure, mechanism, and function. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4751-4804, 2002.

GRIFFITH, G. W.; NICHOLSON, J.; NENNINGER, A.; BIRCH, R. N.; HEDGER, J. N. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 423-435, 2003.

GIRALDO, M. C.; DAGDAS, Y. F.; GUPTA, Y. K.; MENTLAK, T. A.; YI, M.; MARTINEZ-ROCHA, A. L.; SAITOH, H.; TERAUCHI, R.; TALAUT, N. J.; VALENTB. Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus Magnaporthe oryzae**. Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2013.

GINDRO, K.; BERGER, V.; GODARD, S.; VOINESCO, F.; SCHNEE, S.; VIRET, O. E.; ALONSO-VILLAVERDE, V. Protease inhibitors decrease the resistance of Vitaceae to Plasmopara viticola. **Plant physiology and biochemistry**, v. 60, p. 74-80, 2012.

HAQ, S. K., ATIF, S. M., & KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 431, n. 1, p.145-159, 2004.

HABIB, H.; FAZILI, K. M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 2, n. 3, p. 68-85, 2007.

HAMILTON, JOHN MU; SIMPSON, D. J., HYMAN, S. C., NDIMBA, B. K., & SLABAS, A. R. Ara12 subtilisin-like protease from Arabidopsis thaliana: purification, substrate specificity and tissue localization. **Biochemical Journal**, v. 370, n. 1, p. 57-67, 2003.

HOU, S.; JAMIESON, P.; HE, P. The cloak, dagger, and shield: proteases in plant–pathogen interactions. **Biochemical Journal**, v. 475, n. 15, p. 2491-2509, 2018.
HUNTINGTON, J. A.; READ, R. J.; CARRELL, R. W. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. **Nature**, v. 407, n. 6806, p. 923-926, 2000.

HÖRGER, A. C.; VAN DER HOORN, R. A. The structural basis of specific protease-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. **Current opinion in structural biology,** v. 23, n. 6, p. 842-850, 2013.

International Plant Protection Convention (IPPC). (2016) **Detection of Frosty Pod Rot in Jamaica** (Report No. JAM-09/02). Rome: IPPC.

JASHNI, M. K.; MEHRABI, R.; COLLEMARE, J.; MESARICH, C. H.; DE WIT, P. J. The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant–pathogen interactions. **Frontiers in plant science**, v. 6, n. 584, 2015.

JORDÁ, L.; COEGO, A.; CONEJERO, V.; VERA, P. A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 4, p. 2360-2365, 1999.

JORDÁ, L.; CONEJERO, V.; VERA, P. Characterization of P69E and P69F, two differentially regulated genes encoding new members of the subtilisin-like proteinase family from tomato plants. **Plant Physiology**, v. 122, n. 1, p. 67-74, 2000.

JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences**, v. 8, n. 3, p. 275-282, 1992.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.

KOJIMA, S.; TAKAGI, N.; MINAGAWA, T.; FUSHIMI, N.; MIURA, K. I. Effects of amino acid replacements around the reactive site of chicken ovomucoid domain 3 on the inhibitory activity toward chymotrypsin and trypsin. **Protein engineering**, v. 12, n. 10, p. 857-862, 1999.

KATO, Y.; SUN, X.; ZHANG, L.; E SAKAMOTO, W. Cooperative D1 degradation in the photosystem II repair mediated by chloroplastic proteases in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 159, n. 4, p. 1428-1439, 2012.

KOZAKOV, D.; HALL, D. R.; XIA, B.; PORTER, K. A.; PADHORNY, D.; YUEH, C.; BEGLOV, D.; VAJDA, S. The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature protocols**, v. 12, n. 2, p. 255-278, 2017.

KROWARSCH, D.; CIERPICKI, T.; JELEN, F.; OTLEWSKI, J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. **Cellular and molecular life sciences CMLS**, v. 60, n. 11, p. 2427-2444, 2003.

KASCHANI, F.; SHABAB, M.; BOZKURT, T.; SHINDO, T.; SCHORNACK, S.; GU, C.; ILYAS, M.; WIN, J.; KAMOUN, S.; VAN DER HOORN, R. A. An effector-targeted protease contributes to defense against *Phytophthora infestans* and is under diversifying selection in natural hosts**. Plant physiology**, v. 154, n. 4, p. 1794-1804, 2010.

KRÜGER, J.; THOMAS, C. M.; GOLSTEIN, C.; DIXON, M. S.; SMOKER, M.; TANG, S.; MULDER, L.; JONES, J. D. G. A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. **Science**, v. 296, n. 5568, p. 744-747, 2002.

KRAUSS, U.; HIDALGO, E.; BATEMAN, R.; ADONIJAH, V.; ARROYO, C.; GARCIA, J.; CROZIER, J.; BROWN, N. A.; TEN HOOPEN, G. M.; HOLMES, K. A. Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot *(Moniliophthora roreri) in cocoa (Theobroma cacao).* **Biological Control**, v. 54, n. 3, p. 230-240, 2010.

KUMAR S.; STECHER G.; TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of applied crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

LASKOWSKI, M.; QASIM, M. A. What can the structures of enzyme–inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme–substrate complexes? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1-2, p. 324-337, 2000.

LÓPEZ, G. M. A.; ENRÍQUEZ, V. O. **Presencia de Monilia roreri Cif. e Par. en el cacao, Theobroma cacao L. en la frontera de Costa Rica, Nicaragua.** Ministerio de Desarrollo Agropecuario, Laboratorio de Fitopatología, Managua (Nicaragua), 1980, 150f.

LOZANO-TORRES, J. L. et al. Dual disease resistance mediated by the immune receptor Cf-2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 25, p. 10119-10124, 2012.

LOUIS-JEUNE, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; PEREZ-IRATXETA, C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived

spectra. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 80, n. 2, p. 374-381, 2012.

MARTIN, F. et al. A. The genome of Laccaria bicolor provides insights into mycorrhizal symbiosis. **Nature**, v. 452, n. 7183, p. 88-92, 2008.

MEINHARDT, L. W. et al. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, Moniliophthora roreri, which causes frosty pod rot disease of cacao, mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. **Bmc Genomics**, v. 15, n. 1, p. 164, 2014.

MENEZES, F.V. **Caracterização in silico e in vitro de um Inibidor de Serino-Protease do fungo *Moniliophthora roreri.*** 2017*,* p.73. Dissertação (Mestrado em Biologia e Biotecnologia de Micro-organismos), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus.

MONDEGO, J. M. et al. A genome survey of Moniliophthora perniciosa gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 548, 2008.

MICHEELSEN, P. O.; VEVODOVA, J.; DE MARIA, L.; OSTERGAARD, P. R.; FRIIS, E. P.; WILSON, K.; SKJOT, M. Structural and mutational analyses of the interaction between the barley α -amylase/subtilisin inhibitor and the subtilisin savinase reveal a novel mode of inhibition. **Journal of molecular biology**, v. 380, n. 4, p. 681-690, 2008.

MUELLER, A. N; ZIEMANN, S.; TREITSCHKE, S.; ASSMANN, D.; DOEHLEMANN, G**.** Compatibility in the *Ustilago maydis*–maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 2, 2013.

NORERO, N. S.; CASTELLOTE, M. A.; DE LA CANAL, L.; FEINGOLD, S. E. Genome-wide analyses of subtilisin-like serine proteases on Solanum tuberosum. **American journal of potato research**, v. 93, n. 5, p. 485-496, 2016.

NOMBELA, César; GIL, Concha; CHAFFIN, W. LaJean. **Non-conventional protein secretionin yeast**. Trends in microbiology, v. 14, n. 1, p. 15-21, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2018. 1272 p.

ODANI, S.; TOMINAGA, K.; KONDOU, S.; HORI, H.; KOIDE, T.; HARA, S.; ISEMURA, M.; TSUNASAWA, S. The inhibitory properties and primary structure of a novel serine proteinase inhibitor from the fruiting body of the basidiomycete, Lentinus edodes. **The FEBS Journal**, v. 262, n. 3, p. 915-923, 1999.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 7-8, p. 1220-1236, 2008.

PIROVANI CP, CARVALHO HAS, MACHADO RCR, GOMES DS, ALVIM FC, et al. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs

infected by Moniliophthoraperniciosa, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**. v. 29, n. 11, p. 2391-2401, 2008.

PIROVANI, C. P.; DA SILVA, A. S.; DOS SANTOS, L. S.; MICHELI, F.; MARGIS, R.; MATTOS CASCARDO, J. C. *Theobroma cacao* cystatins impair *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth and are involved in postponing cell death symptoms. **Planta**, v. 232, n. 6, p. 1485-1497, 2010.

PHILLIPS-MORA, W. Origin, Biogeography, Genetic Diversity and Taxonomic Affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al. as Determined Using Molecular, Phytopathological and Morpho-Physiological Evidence**.** 2003. 349 p. **Tesis (Ph. D.) – University of Reading**, Reading (RU), 2003.

PHILLIPS-MORA, W. 2006. La moniliasis del cacao: un enemigo que podemos y debemos vencer. En: Taller regional andino de aplicación tecnológica en el cultivo de cacao. Quevedo, Ecuador. p. 21-25

PHILLIPS-MORA, W.; COUTIÑO, A.; ORTIZ, C. F.; LÓPEZ, A. P.; HERNÁNDEZ, J.; AIME, M. C. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (= moniliasis disease) of cacao in Mexico. **Plant pathology**, v. 55, n. 4, p. 584-584, 2006.

PHILLIPS-MORA, W.; CAWICH, J.; GARNETT, W.; AIME, M. C. First report of frosty pod rot (= moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. **Plant Pathology**, v. 55, n. 4, p. 584, 2006.

PHILLIPS-MORA, W.; WILKINSON, M. J.; Frosty Pod of Cacao: A Disease with a Limited Geographic Range but Unlimited Potential for Damage. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1644-1647, 2007.

PHILLIPS-MORA, W.; BAQUEROS, F.; MELNICK, R.; BAILEY, B. First report of frosty pod rot caused by Moniliophthora roreri on cacao in Bolivia. **New Disease Reports,** v. 31, n. 29, p. 2044-0588, 2015.

PHILLIPS-MORA, W. **Catalogue of Cacao Clones Selected by: CATIE for Commercial Plantings**. 1. ed. Turrialba, C.R: CATIE, 2012, 68p.

PHILLIPS-MORA, W.; TEN HOOPEN, M. **Frosty Pod Rot in Jamaica**. Available at http://incocoa.org/data/INCOPED_FPR_Jamaica.pdf.

PÉREZ, L. *Moniliophthora roreri* H.C. Evans et al. y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo. **Revista de Protección Vegetal**, v. 33, n. 1, p. 00-00, 2018.

PLOETZ, R. C. The impact of diseases on cacao production: a global overview. In: BAILEY B.; MEINHARDT L. **Cacao Diseases**. Switzerland: Springer, Cham, 2016, p. 33-59.

RENKO, M.; SABOTIC, J.; MIHELIC˘, M.; BRZIN, J.; KOS, J.; TURK, D. Versatile loops in mycocypins inhibit three protease families. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 1, p. 308-316, 2010.

RENKO, M.; SABOTIČ, J.; TURK, D. Beta-trefoil inhibitors — from the work of Kunitz onward**. Biological chemistry**, v. 393, n. 10, p. 1043-1054, 2012.

RIOS-RUIZ, R. A. **Epidemiologia e manejo da monilíase do cacaueiro no Peru**. 2004. 80 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2004.

ROONEY, H. C. E.; VAN'TKLOOSTER, J. W.; VANDERHOORN, R. A. L.; JOOSTEN, M. H. A. J.; JONES, J. D. G.; DEWIT, P. J. Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2- dependent disease resistance. **Science**, v. 308, n. 5729, p. 1783-1786, 2005.

RAMÍREZ, V.; LÓPEZ, A.; MAUCH-MANI, B.; GIL, M. J.; VERA, P. An extracellular subtilase switch for immune priming in Arabidopsis. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, p. e1003445, 2013.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; THOMAS, P. D.; HUANG, X.; BATEMAN, A.; FINN, R. D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D624-D632, 2017.

RAWLINGS, NEIL D; Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., & Finn, R. D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D624-D632, 2018.

ROUX, F.; VOISIN, D.; BADET, T.; BALAGUÉ, C.; BARLET, X.; HUARD-CHAUVEAU, C.; ROBY, D.; RAFAELLE, S. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map**. Molecular plant pathology**, v. 15, n. 5, p. 427-432, 2014.

RABOUILLE, C.; MALHOTRA, V.; NICKEL, W. Diversity in unconventional protein secretion. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 22, p.5251-5255, 2012.

RABOUILLE, Catherine. **Pathways of unconventional protein secretion**. Trends in cell biology, v. 27, n. 3, p. 230-240, 2017.

RIDOUT, C. J.; SKAMNIOTI, P.; PORRITT, O.; SACRISTAN, S.; JONES, J. D.; BROWN, J. K. Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. **The Plant Cell**, v. 18, n. 9, p. 2402-2414, 2006.

RODRIGUES, M. L.; NAKAYASU, E. S.; OLIVEIRA, D. L.; NIMRICHTER, L.; NOSANCHUK, J. D.; ALMEIDA, I. C.; CASADEVALL, A. Extracellular vesicles produced by Cryptococcus neoformans contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.

SABOTIČ, J.; GALEŠA, K.; POPOVIČ, T.; LEONARDI, A.; BRZIN, J. Comparison of natural and recombinant clitocypins, the fungal cysteine protease inhibitors. **Protein expression and purification**, v. 53, n. 1, p. 104-111, 2007.

SABOTIČ, J.; BLEULER-MARTINEZ, S.; RENKO, M.; CAGLIČ, P. A.; KALLERT, S.; ŠTRUKELJ, B.;TURK, D.; AEBI, M.; KOS, J.; KÜNZLER, M. Structural basis of trypsin inhibition and entomotoxicity of cospin, serine protease inhibitor involved in defense of Coprinopsis cinerea fruiting bodies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 6, p. 3898-3907, 2012.

SABOTIČ, J.; OHM, R. A.; KÜNZLER, M. Entomotoxic and nematotoxic lectins and protease inhibitors from fungal fruiting bodies**. Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 91–111, 2016.

SAITOU, Naruya; NEI, Masatoshi. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987

SHABAB, M.; SHINDO, T.; GU, C.; KASCHANI, F.; PANSURIYA, T.; CHINTHA, R.; HARZEN, A.; COLBY, T.; KAMOUN, S.; VAN DER HOORN, R. A. Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related Cys proteases of tomato. **The Plant Cell**, v. 20, n. 4, p. 1169-1183, 2008.

SALGUERO-LINARES, JOSE; COLL, NÚRIA S. Plant proteases in the control of the hypersensitive response. **Journal of experimental botany**, v. 70, n. 7, p. 2087-2095, 2019.

SANTOS, A. F. et al. Peptidases em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. In.: Biotecnologia aplicada a agroindústria: fundamentos e aplicações. v. 4. São Paulo: Blucher, 2016. Cap. 11, p. 381-437

SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nature reviews immunology**, v. 12, n. 2, p. 89, 2012.

SÁNCHEZ CUEVAS, MARÍA CLAUDIA; JARAMILLO AGUILAR, EDWIN EDISON; RAMÍREZ MORALES, IVÁN EDUARDO. Enfermedades del cacao. 2015.

SWEDBERG, J. E.; DE VEER, S. J.; SIT, K. C.; REBOUL, C. F.; BUCKLE, A. M.; HARRIS, J. M. Mastering the canonical loop of serine protease inhibitors: enhancing potency by optimising the internal hydrogen bond network. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e19302, 2011.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega**. Molecular systems biology**, v. 7, n. 539, p. 1, 2011.

SONG, H. K.; SUH, S. W. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited. Refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction

between a homologous inhibitor from Erythrina caffra and tissue-type plasminogen activator. **Journal of molecular biology**, v. 275, n. 2, p. 347-363, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W.; SAMBROOK, J. **The condensed protocols: from molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.

SONG, J.; WIN, J.; TIAN, M.; SCHORNACK, S.; KASCHANI, F.; ILYAS, M.; KAMOUN, S. Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 5, p. 1654-1659, 2009.

SUN, X.; PENG, L.; GUO, J.; CHI, W.; MA, J.; LU, C.; ZHANG, L. Formation of DEG5 and DEG8 complexes and their involvement in the degradation of photodamaged photosystem II reaction center D1 protein in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 19, n. 4, p. 1347-1361, 2007.

SLAVOKHOTOVA, A. A.; NAUMANN, T. A.; PRICE, N. P.J.; ROGOZHIN, E. A.; ANDREV, Y. A.; VASSILEVSKI, A. A.; ODINTSOVA, T. I. Novel mode of action of plant defense peptides-hevein-like antimicrobial peptides from wheat inhibit fungal metallo-proteases. **The FEBS journal**, v. 281, n. 20, p. 4754-4764, 2014.

THOMAS, E. L.; VAN DER HOORN, R. A. L. Ten prominent host proteases in plant-pathogen interactions. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 639, p. 1-12, 2018.

TIAN, M.; BENEDETTI, B.; KAMOUN, S. A second Kazal-like protease Inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interact ts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69b of tomato. **Plant physiology**, v. 138, n. 3, p. 1785-1793, 2005.

TIAN, M.; HUITEMA, E.; DA CUNHA, L.; TORTO-ALALIBO, T.; KAMOUN, S. A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* Targets the tomato pathogenesis-related protease P69b. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 25, p. 26370-26377, 2004.

TIAN, M.; WIN, J.; SONG, J.; VAN DER HOORN, R.; VAN DER KNAAP, E.; KAMOUN, S. A. *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. **Plant physiology**, v. 143, n. 1, p. 364-377, 2007.

TEN HOOPEN, G. M.; KRAUSS, U. Biological control of cacao diseases. In: BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W. **Cacao Diseases**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 511–566.

TORUÑO, T. Y.; STERGIOPOULOS, I.; COAKER, G. Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. **Annual review of phytopathology**, v. 54, p. 419-441, 2016.

VARGA, T. et al. Megaphylogeny resolves global patterns of mushroom evolution. **Nature ecology & evolution**, v. 3, n. 4, p. 668-678, 2019.

VAN DER HOORN, R. A. L. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. **Annu. Rev. Plant Biol**., v. 59, p. 191-223, 2008.

VAN ESSE, H. P.; VAN'T KLOOSTER, J. W.; BOLTON, M. D.; YADETA, K. A.; BAARLEN, P. V.; BOEREN, S.; VERVOORT, DE WIT, P. J. G. M.; THOMMA, B. P. H. The Cladosporium fulvum virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. **The Plant Cell**, v. 20, n. 7, p. 1948-1963, 2008.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 2, p. W407-W410, 2007.

YU, X.; FENG, B.; HE, P.; SHAN, L. From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. **Annual review of phytopathology**, v. 55, p. 109-137, 2017.

ZUGAIB, M. C. M. **Análise proteômica de esporos não germinados e do micélio do fungo *Moniliophthora roreri*.** 2016. p.65. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, Ilhéus.

ŽURGA, S.; POHLEVEN, J.; KOS, J.; SABOTIČ, J. β-Trefoil structure enables interactions between lectins and protease inhibitors that regulate their biological functions. **The Journal of Biochemistry**, v. 158, n. 1, p. 83-90, 2015.