INIBIDORES DE PROTEINASE DO TIPO BOWMAN-BIRK: EVOLUÇÃO MOLECULAR, EXPRESSÃO NA SUPERFÍCIE DE FAGOS FILAMENTOSOS E SEU PAPEL NA INTERAÇÃO PLANTA-INSETO

MARCIA OMETTO DE MELLO ALVES JOSÉ

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Outubro – 2002

INIBIDORES DE PROTEINASE DO TIPO BOWMAN-BIRK: EVOLUÇÃO MOLECULAR, EXPRESSÃO NA SUPERFÍCIE DE FAGOS FILAMENTOSOS E SEU PAPEL NA INTERAÇÃO PLANTA-INSETO

MARCIA OMETTO DE MELLO ALVES JOSÉ

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **MÁRCIO DE CASTRO SILVA FILHO**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo – Brasil

Outubro – 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

José, Marcia Ometto de Mello Alves
Inibidores de proteinase do tipo Bowman-Birk: evolução molecular, expressão na superfície de fagos filamentosos e seu papel na interação planta-inseto / Marcia Ometto de Mello Alves José. - - Piracicaba, 2002.
108 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Brocas (inseto-nocivo) 2. Controle de pragas 3. Inibidor de proteinase 4. Interação planta-inseto 5. Resistência genética vegetal I. Título

CDD 633.61

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Heitor e Norly, que continuamente me apoiam e incentivam,

OFEREÇO.

Ao meu marido, Luiz Antônio e ao meu filho, João Guilherme, pela compreensão e amor recebidos,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente :

Ao Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho pela orientação, amizade e incentivo durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Aparecida S. Tanaka, do Depto de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina (UNIFESP), pela orientação e amizade.

Ao Dr. Steve Gleddie do "Agriculture and Agri-Food Canada" e a Dra. Letícia Galgaro Nelson, pelo trabalho de expressão em fagos dos derivados do inibidor Bowman-Birk.

Ao Prof. Giancarlo C. X. Oliveira e ao doutorando Phellippe A. S. Marbach, do Departamento de Genética da ESALQ - USP, pela contribuição com as análises filogenéticas e discussões na área de evolução.

Ao Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra e a doutoranda Adriana R. Lopes, do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química - USP, pelo fornecimento da tripsina purificada de *Diatraea saccharalis*.

Aos professores Dra. Helaine Carrer e Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo, e às biólogas Daniela Truffi e Raquel Helena D. Lordello dos

Departamentos de Ciências Biológicas e de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ – USP, pelas análises de seqüenciamento.

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, e à Neide G. Zério do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ – USP, por fornecer as lagartas utilizadas neste trabalho.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pela amizade, ensinamentos e incentivo em todos os momentos.

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ – USP.

Aos funcionários do Setor de Biblioteca Central e do Departamento de Genética da ESALQ – USP, pelos auxílios prestados.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS..... ix

RESUMO..... x

SUMMARY..... xii

1 INTRODUÇÃO..... 1

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 4

2.1 Interação planta X inseto com ênfase nos inibidores de proteinase..... 4

2.2 Inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk..... 8

2.3 Evolução dos inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk..... 11

2.4 Expressão na superfície de fagos filamentosos..... 14

2.5 Expressão de inibidores na superfície de fagos filamentosos e construção de bibliotecas..... 18

2.6 A cana-de-açúcar e a broca-da-cana..... 20

3 MATERIAL E MÉTODOS..... 22

3.1 Identificação das seqüências de inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk..... 22

3.2 O banco de dados do SUCEST..... 23

3.3 Identificação de inibidores de serino proteinases do tipo Bowman -Birk putativos de cana-de-açúcar..... 23

3.4 Análise da expressão assistida por computador..... 24

3.5 Cepa bacteriana e meios de cultura..... 24

3.6 Expressão dos inibidores na superfície de fagos filamentosos..... 25

3.7 Construção das bibliotecas de inibidores..... 28

3.7.1 Síntese dos iniciadores degenerados..... 28
3.7.2 Amplificação dos iniciadores degenerados e clonagem dos fragmentos..... 30
3.7.3 Preparo de células competentes e transformação por eletroporação..... 31
3.7.4 Análise dos transformantes (“Screening por PCR”)..... 31
3.7.5 Seqüenciamento dos transformantes..... 33
3.8 Seleção das bibliotecas TRI-NNB e QUI-NNB contra a tripsina purificada e extrato intestinal de *D. saccharalis* e contra a tripsina bovina.... 34
3.8.1 Criação das lagartas de *D. saccharalis* em laboratório..... 34
3.8.2 Preparo do homogeneizado intestinal..... 34
3.8.3 Obtenção dos fagos das bibliotecas..... 35
3.8.4 Seleção..... 35
4 RESULTADOS..... 38
4.1 Alinhamento múltiplo das seqüências de inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk..... 38
4.2 Comparação das seqüências de inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk de cana-de-açúcar..... 42
4.3 Filogenia dos inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk de plantas superiores..... 43
4.4 Análise da expressão dos inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk de plantas superiores assistida por computador..... 48
4.5 Construção das bibliotecas de inibidores de proteinases..... 50
4.6 Seleção das bibliotecas de inibidores de proteinases..... 51
5 DISCUSSÃO..... 56
5.1 Evolução molecular dos inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk em plantas superiores..... 56
5.2 Construção e seleção das bibliotecas de expressão na superfície de fagos filamentosos..... 60
6 CONCLUSÕES..... 69

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 70
APÊNDICE..... 85

LISTA DE ABREVIATURAS

BBI = inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk

BPTI = inibidor de tripsina pancreático

cDNA = DNA complementar

cfu = unidades formadoras de colônias

dNTP = deoxiribonucleotídeo trifosfato

$D.O._{600nm}$ = densidade ótica à600 nanômetros

EST = seqüências expressas (“Expressed Sequence Tag”)

kDa = kilo Dalton

K_i = constante de dissociação

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS = tampão fosfato salino

PCR = Reação da polimerase em cadeia

PEG = polietileno glicol

PI = inibidores de proteinases

(p/v) = peso/volume

QUI = inibidor de quimotripsina derivado do inibidor IBB-1 de soja

RP = iniciador reverso ("reverse primer")

rpm = rotações por minuto

SDS = sódio dodecil sulfato

SUCEST = Projeto Transcriptoma da Cana-de-açúcar

TRI = inibidor de tripsina derivado do inibidor IBB-1 de soja

Tween = polioxietilenosorbitol

UP = iniciador universal ("universal primer")

INIBIDORES DE PROTEINASE DO TIPO BOWMAN-BIRK: EVOLUÇÃO MOLECULAR, EXPRESSÃO NA SUPERFÍCIE DE FAGOS FILAMENTOSOS E SEU PAPEL NA INTERAÇÃO PLANTA-INSETO

Autora: MARCIA OMETTO DE MELLO ALVES JOSÉ
Orientador: Prof. Dr. MÁRCIO DE CASTRO SILVA FILHO

RESUMO

Os inibidores inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk (BBI) possuem dois sítios ativos e são encontrados em plantas das famílias Fabaceae e Poaceae. Neste trabalho foi apresentada a estrutura primária e o padrão de expressão de 14 seqüências expressas (EST, *expressed sequence tags*) de BBI putativos encontradas no banco de dados do "Projeto Transcriptoma da Cana-de-açúcar" (SUCEST). Estas quatorze seqüências foram utilizadas em conjunto com outras 87 seqüências de BBI previamente descritas e depositadas no banco de dados "GenBank" para a construção de árvores filogenéticas da família BBI. A análise filogenética mostrou que os BBI de monocotiledôneas e dicotiledôneas podem ser claramente separados em diferentes grupos e a topologia das árvores filogenéticas sugere um padrão evolutivo diferente das famílias de BBI em plantas. Os inibidores de

dicotiledôneas são bem conservados e acumularam diferenças sutis durante a evolução. Em contrapartida, os inibidores de monocotiledôneas são altamente variáveis, indicando a ocorrência de um processo evolutivo interessante, baseado em eventos de duplicação intragênica e mutação.

Dois inibidores de serino proteinases, um de tripsina e outro de quimotripsina, derivados do gene que codifica o inibidor Bowman-Birk de soja, foram expressos na superfície do fago filamentoso M13 e utilizados para a construção de bibliotecas de variantes. Para tal foram feitas mutações em quatro aminoácidos do sítio ativo destes inibidores e duas bibliotecas de expressão na superfície de fagos filamentosos foram construídas. Posteriormente, estas bibliotecas foram utilizadas para a seleção de variantes que melhor interagiam com a tripsina bovina e de *Diatraea saccharalis* e com as enzimas digestivas presentes no extrato intestinal desta praga. Os variantes selecionados foram seqüenciados, analisados e caracterizados. Os resultados mostraram que a técnica de expressão na superfície de fagos filamentosos foi eficiente para selecionar novos inibidores. Além disto, com as mutações realizadas, foi possível transformar a alça de inibição de quimotripsina em uma alça de inibição de tripsina.

BOWMAN-BIRK PROTEINASE INHIBITORS: MOLECULAR EVOLUTION, PHAGE-DISPLAY AND ITS ROLE ON PLANT-INSECT INTERACTIONS

Author: MARCIA OMETTO DE MELLO ALVES JOSÉ
Adviser: Prof. Dr. MÁRCIO DE CASTRO SILVA FILHO

SUMMARY

The Bowman-Birk inhibitors (BBIs) are double headed inhibitors of serine proteinase found in plants from Fabaceae and Poaceae families. We describe the primary structure and the gene expression profile of 14 putative BBIs from the sugarcane expressed sequence tag (SUCEST) database and show how we used these newly discovered sequences together with 87 previously described BBI sequences from the “GenBank” database to construct phylogenetic trees for the BBI family. Phylogenetic analysis revealed that BBI-type inhibitors from monocotyledonous and dicotyledonous plants could be clearly separated into different groups, while the overall topology of the BBI tree suggests a different pattern of evolution for BBI families in flowering plants. We also found that BBI proteinase inhibitors from dicotyledonous plants were well conserved, accumulating only slight differences during their evolution. In addition, we found that BBIs from monocotyledonous plants were highly variable, indicating an

interesting process of evolution based on internal gene duplications and mutation events.

Two serine-type proteinase inhibitors, a trypsin and a chymotrypsin, both derived from the soybean Bowman-Birk inhibitor, were expressed on the surface of a filamentous phage. Site mutations were made in four positions of the reactive sites of these inhibitors and two phage-display libraries were constructed. Later, these libraries were used to select better ligands to the bovine and *Diatraea saccharalis* trypsin and to the midgut enzymes of this insect pest. The selected variants were sequenced, analyzed and characterized. The results showed that the phage-display technique is efficient to select new proteinase inhibitors. Furthermore, it was possible to modify the chymotrypsin loop into a trypsin loop using the library constructed by the insertion of a degenerated primer.

1 INTRODUÇÃO

As plantas contêm uma variedade de inibidores de serino proteinases os quais podem ser divididos em dezesseis classes (Ryan, 1990). Os inibidores de tripsina do tipo Kunitz de soja, os inibidores Bowman-Birk e os inibidores dos tipos I e II de batata são as quatro classes mais bem estudadas. Os inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk (BBI) foram isolados e caracterizados pela primeira vez em sementes de soja (Bowman, 1946; Birk, et al., 1963) sendo mais tarde encontrados em outras leguminosas (Norioka & Ikenaka, 1983; Tanaka et al., 1997) e em gramíneas (Odani et al., 1986). Um inibidor cíclico de 14 aminoácidos foi recentemente isolado de sementes de girassol e sua caracterização sugere que este é o mais potente inibidor homólogo aos BBI já descrito na literatura (Korsinczky et al., 2001).

O significado fisiológico dos BBI está associado com suas três principais funções nas plantas: regulação das proteinases endógenas, reserva de aminoácidos sulfurados e defesa contra o ataque de patógenos e insetos. No último caso, os BBI parecem atuar inibindo a atividade proteolítica das enzimas digestivas dos insetos, interferindo em seu desenvolvimento e reprodução (Tanaka et al., 1996; Pompermayer et al., 2001; Tiffin & Gaut, 2001). Reafirmando as evidências do seu papel na defesa de plantas, inibidores de tripsina induzidos por ferimento ou herbivoria pertencentes a família dos BBI foram isolados e caracterizados em milho (Rohrmeier & Lehle, 1993), alfafa (McGurl et al., 1995) e arroz (Rakwal et al., 2001).

Levando-se em consideração o efeito antinutricional destes inibidores, a avaliação da sua eficiência na produção de plantas resistentes a pragas de

importância econômica tem atraído o interesse de pesquisadores em todo o mundo. Porém, a eficácia do controle de uma determinada praga dependerá do grau de vulnerabilidade do inseto em relação ao inibidor e isto se baseia na importância da proteína alvo para o ciclo de vida da praga, na eficiência de inibição dessa proteína alvo pelo inibidor e na capacidade adaptativa da praga em resposta ao inibidor (Koiwa et al., 1998). A adaptação de insetos a inibidores de proteinases tem sido observada e os mecanismos envolvidos neste processo vêm sendo estudados com ênfase nos últimos anos (Jongsma et al., 1995; Michaud, 1997; Paulillo et al., 2000; ; Brito et al., 2001; Patankar et al., 2001). Broadway (1996) destaca que os insetos se adaptam aos inibidores de tripsina presentes em seus hospedeiros secretando enzimas resistentes a estes inibidores, as quais podem ser as mesmas enzimas já secretadas normalmente ou podem ser enzimas secretadas após a ingestão destes inibidores. Além disto, os insetos podem estar pré-adaptados a inibidores de proteinases específicos de plantas não hospedeiras que pertencem a mesma família da planta hospedeira do inseto. Neste aspecto, a importância desta pré-adaptação à herbivoria está relacionada com o número de famílias diferentes de inibidores de proteinase na planta hospedeira e da distribuição destas famílias entre as espécies de plantas. Segundo o autor, levando estes aspectos em consideração, vários inibidores são necessários para se conferir resistência contra insetos herbívoros a uma planta.

Além dos problemas de adaptação, a utilização de inibidores de proteinases com função inseticida imporá ao inseto uma pressão de seleção que poderá levar a evolução de proteinases com baixa afinidade ao inibidor. Consequentemente, o emprego de técnicas que permitam a seleção de melhores inibidores para o controle da praga de interesse torna tal estratégia viável, eficaz e geneticamente durável.

A técnica de expressão de proteínas na superfície de fagos filamentosos e a construção de bibliotecas de proteínas possibilitam a obtenção de uma série de variantes que podem ser selecionados de acordo com a especificidade de

formação do complexo inibidor-proteinase (Koiwa et al., 1998). Vários inibidores de proteinase foram expressos na superfície de fagos filamentosos e bibliotecas destes inibidores foram obtidas e selecionadas de forma rápida e eficiente contra diversos organismos alvo de interesse (Jongsma et al., 1995, 1996; Tanaka et al., 1999; Kiczak et al., 1999, 2001). Após o processo de seleção, a técnica permite o resgate da seqüência gênica da proteína selecionada, a qual pode ser clonada em outros vetores, tais como plasmídeos de agrobactérias, possibilitando o uso do gene clonado na obtenção de plantas transgênicas resistentes àpraga de interesse.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Interação planta X inseto com ênfase nos inibidores de proteinase

Nos ecossistemas naturais, as plantas e os insetos são apenas alguns dos organismos vivos que estão continuamente interagindo de uma forma complexa. As várias atividades benéficas desempenhadas pelos insetos em relação as plantas como a polinização e a defesa e pelas plantas em relação aos insetos como prover abrigo, local para oviposição e alimento, mostram a estreita associação entre estes dois organismos (Panda & Khush, 1995). Por outro lado, os insetos podem atacar as plantas e, dependendo do nível da herbivoria, estes podem ser extremamente prejudiciais, levando-as até mesmo a morte.

Com o objetivo de diminuir o ataque dos insetos, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa que incluem barreiras físicas e químicas, além de complexas vias de sinalização (Falco et al., 2001). Dentre elas estão a indução de proteínas de defesa (Haruta et al., 2001), a liberação para o ambiente de compostos voláteis que atraem predadores dos insetos herbívoros (Birkett et al., 2000), a síntese de metabólitos secundários (Baldwin, 2001; Kliebenstein et al., 2001) e o aumento da densidade de tricomas em folhas e caules (Fordyce & Agrawal, 2001) (Figura 1). Em contrapartida, os insetos desenvolveram estratégias para superar tais barreiras impostas pelas plantas. Estas estratégias incluem a metabolização e seqüestro de compostos tóxicos (Scott & Wen, 2001; Nishida, 2002), mecanismos de fuga (Zangerl,

1990) e alteração nos padrões de expressão gênica (Silva et al., 2001) (Figura 1).

Figura 1 – Interações entre plantas e insetos.

Fonte: Mello & Silva-Filho (2002)

As plantas podem sintetizar de forma constitutiva compostos químicos que repelem os herbívoros por serem tóxicos ou reduzirem a digestibilidade dos tecidos vegetais. Uma outra estratégia utilizada pelas plantas é a indução da síntese destas substâncias em resposta a injúrias causadas pelo ataque dos herbívoros. Estes dois mecanismos de defesa são responsáveis por prevenir a maioria dos ataques, embora exista um número reduzido de insetos que são capazes de se adaptarem de forma específica causando danos às plantas.

Uma classe de substâncias que está intimamente relacionada a defesa das plantas, é a dos inibidores de proteinases (PI). Os níveis destes PI em folhas são normalmente baixos podendo ser rapidamente induzidos a níveis elevados quando as plantas são atacadas por insetos, sofrem danos mecânicos ou são expostas a fitohormônios (Rakwal et al., 2001). Além da síntese de PI induzida no local do ataque, foi demonstrado que sinais específicos originários dos tecidos danificados são transportados via floema e estimulam a síntese de PI por toda a planta (Jongsma & Bolter, 1997). Estes inibidores de plantas funcionam como substratos específicos das proteinases digestivas dos insetos, formando um complexo estável no qual a proteólise é limitada e extremamente lenta (Tiffin & Gaut, 2001). Em última instância, os PI atuam causando uma deficiência em aminoácidos que influencia o crescimento e desenvolvimento dos insetos, podendo eventualmente causar a sua morte devido a inibição das proteinases digestivas ou devido a produção maciça destas enzimas, reduzindo a disponibilidade dos aminoácidos essenciais para a síntese de outras proteínas (Jongsma & Bolter, 1997; Pompermayer et al., 2001). Ao tornarem mais lento o desenvolvimento dos herbívoros, estes inibidores prolongam o período em que predadores poderiam ser atraídos para as plantas atacadas por meio de compostos voláteis liberados por elas, contribuindo de forma indireta no controle dos insetos (Baldwin, 2001).

Neste aspecto, durante a evolução, plantas e insetos desenvolveram mecanismos ecológicos, fisiológicos e bioquímicos para diminuir os efeitos negativos desta interação. As plantas desenvolveram mecanismos

extraordinários contra as proteinases dos insetos tais como o aumento da atividade de inibidores nos tecidos (Rakwal et al., 2001), a síntese de uma gama enorme de inibidores que possuem atividade contra várias enzimas (Christeller et al., 1998), a produção de inibidores bifuncionais que atuam contra amilases e proteinases (Roy & Gupta, 2000), o aumento da complexidade dos inibidores com propriedades bioquímicas diferentes por meio da produção de isoinibidores (Tiffin & Gaut, 2001), a expressão de inibidores altamente específicos para as enzimas dos insetos (Falco et al., 2001) e a síntese de inibidores resistentes a proteólise e ativos sob várias condições de pH do trato digestivo de insetos (Christeller et al., 1998). Em contrapartida, os insetos desenvolveram maneiras de superar os efeitos negativos causados pelos PI presentes em suas plantas hospedeiras. Estas incluem o aumento da atividade das enzimas do trato digestivo e a síntese de enzimas menos sensíveis (Paulillo et al., 2000), a modificação do espectro ou atividade relativa de várias hidrolases digestivas (Patankar et al., 2001), a quebra de inibidores via proteinases (Girard et al., 1998) e a diminuição da sensibilidade das enzimas aos inibidores (Brito et al., 2001) via formação de oligômeros de alto peso molecular insensíveis aos PI.

Patankar e colaboradores (2001) mostraram que lagartas de *Helicoverpa armigera* eram capazes de superar os efeitos de vários PI de plantas hospedeiras alterando a composição das enzimas do trato digestivo após a ingestão destes PI. O mesmo foi observado para *Agrotis ipsilon*, *Helicoverpa zea* (Mazumdar-Leighton & Broadway, 2001a, b) e *Heliothis virescens* (Brito et al., 2001). Recentemente, Mazumdar-Leighton e Broadway (2001a) mostraram que insetos da ordem Lepidoptera apresentavam tripsinas constitutivas e tripsinas induzidas após a ingestão de PI que eram insensíveis aos inibidores. Resultados semelhantes foram descritos para as quimotripsinas (Mazumdar-Leighton & Broadway, 2001b) e para as α-amilases (Silva et al., 2001). Além disto, a produção de proteinases que digerem os PI permite aos insetos

superarem tais defesas das plantas e utilizarem os inibidores digeridos como fonte de aminoácidos (Girard et al., 1998).

2.2 Inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk

Inibidores de proteinase são encontrados em várias plantas, principalmente naquelas pertencentes às famílias Fabaceae, Poaceae e Solanaceae. Eles desempenham várias funções importantes, incluindo a regulação de proteinases endógenas dentre as quais aquelas relacionadas aos processos de dormência e germinação, o acúmulo de proteínas de reserva ricas em aminoácidos sulfurados e a proteção das plantas contra o ataque de insetos e microrganismos (Hammond et al., 1984; Baek et al., 1994).

Os BBI são encontrados em plantas da família Fabaceae (Norioka & Ikenaka, 1983) e Poaceae (Odani et al., 1986) e se caracterizam por possuírem dois domínios (Figura 2). Em dicotiledôneas são proteínas de baixo peso molecular, variando de 6 a 9 kDa, sendo caracterizados pela presença de 14 cisteínas que formam sete pontes dissulfeto, as quais permitem a formação de uma estrutura assimétrica composta por dois domínios independentes, um capaz de inibir proteinases do tipo das tripsinas e o outro com atividade inibitória sobre as tripsinas, quimotripsinas ou elastases, localizados em extremos opostos da molécula (Gariani & Leatherbarrow, 1997) (Figura 2). Em monocotiledôneas estes inibidores apresentam uma variação de peso molecular de 8 a 20 kDa e o número de cisteínas numa mesma molécula pode chegar a 26. Tanto nas monocotiledôneas como nas dicotiledôneas, a porção N terminal dos genes varia bastante, o que sugere que esta região seja menos importante na interação entre o inibidor e a proteinase (Odani & Ikenaka, 1978b; Rakwal et. al., 2001). Inicialmente, acreditava-se que os BBI se expressavam apenas em sementes (Hammond et al.,1984). Entretanto, estudos com milho, alfafa e arroz mostraram que além de estarem presentes nas sementes, estes inibidores se

expressavam em folhas e caules submetidos à injúria (Rohrmeier & Lehle, 1993; McGurl et al., 1995; Rakwal et al., 2001).

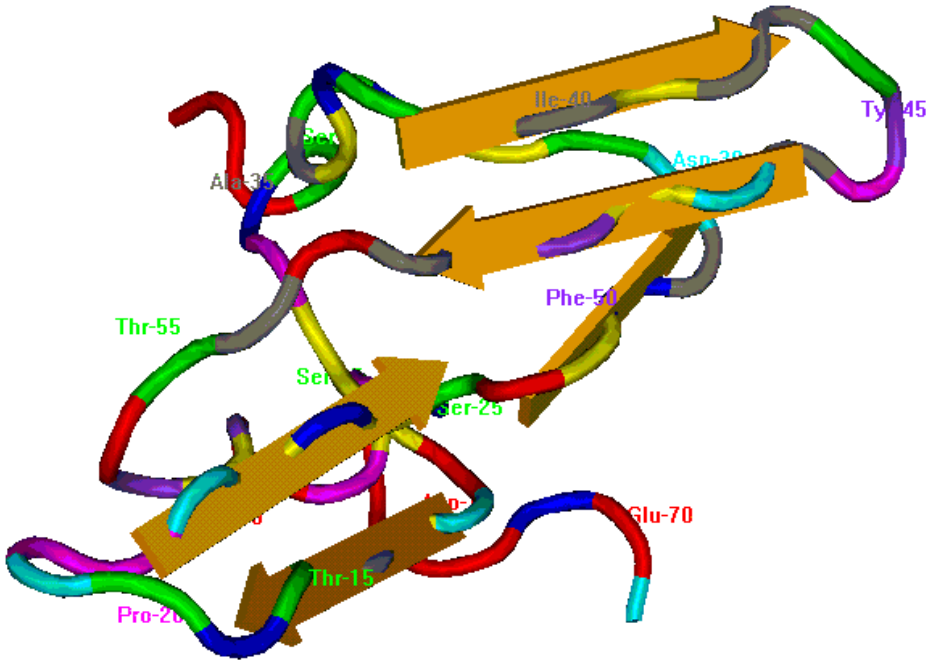

Figura 2 - Estrutura tridimensional do inibidor de proteinase de soja do tipo Bowman-Birk.

Fonte: National Center for Biotechnology Information – NCBI - IBB1 – P01055

Em soja, foram descritos até o momento 5 diferentes tipos de BBI (IBB-1-P01055, IBB-2-P01063, IBB-3-P01064, IBB-TISYC2 e IBB-TISYD2). O inibidor 1 (IBB-1) possui nove resíduos em cada sítio ativo, os quais são delimitados por duas pontes dissulfeto. Os aminoácidos Cys(P3) - Thr(P2) - Lys(P1) - Ser(P1') - Asn(P2') - Pro-(P3') - Pro(P4') - Gln(P5') - Cys(P6'), correspondem aos resíduos 14 a 22 do sítio de inibição da tripsina e os aminoácidos Cys(P3) - Ala(P2) -

Leu(P1) - Ser(P1') - Tyr(P2') - Pro(P3') - Ala(P4') - Gln(P5') - Cys(P6'), correspondem aos resíduos 41 a 49 do sítio que inibe quimotripsina (Terada et al., 1978).

As posições P1-P1' dos BBI é o local de ligação do peptídeo ao sítio ativo. A posição P1 do sítio ativo é importante para definir a especificidade quanto a enzima a ser inibida. Segundo Odani e Ikenaka (1976, 1977, 1978a) e Prakash e colaboradores (1996), a inibição de tripsina está relacionada à presença de lisina ou de arginina nesta posição, enquanto que a inibição de elastase está relacionada à presença de alanina. Inibidores de quimotripsina apresentam tirosina, arginina, leucina, fenilalanina ou metionina nesta posição. Ainda segundo os autores, quando um inibidor apresenta em P1 uma arginina, a sua capacidade de inibir ou não uma quimotripsina depende da hidrofobicidade do resíduo P2'. Quando em P2' temos um aminoácido hidrofóbico como a metionina, uma quimotripsina pode se ligar à alça. Porém quando em P2' temos um aminoácido hidrofílico como a glutamina, a afinidade desta alça por quimotripsina diminui. Segundo Gariani e Leatherbarrow (1997), além desta função, a posição P2' seria importante também na estabilidade do inibidor quanto à hidrólise. A isoleucina em P2' aumenta a estabilidade da molécula quando comparamos com a presença da asparagina, por exemplo. Segundo Maeder e colaboradores (1992), a atividade inibitória dos BBI é o resultado de uma conformação inflexível da alça de inibição a qual é conferida pelo seu tamanho reduzido, a ocorrência de uma ou mais prolinas na alça, uma treonina β-ramificada na posição P2 e pontes de hidrogênio entre P5' (Gln) e P2 (Thr) e P1' (Ser).

Estudos ao longo da década de 90 mostraram que os inibidores de proteinase apresentam atividade anticarcinogênica. Neste aspecto, os BBI são particularmente interessantes pois são relativamente estáveis à temperatura de cozimento e aos ácidos presentes no trato digestivo de humanos e animais (Chen et al., 1992). Ainda segundo os autores, populações que consomem em sua dieta altos níveis de BBI têm baixas taxas de câncer de cólon, seio,

próstata e pele. Além do interesse médico, os BBI estão sendo estudados quanto a importância no controle de pragas e doenças em plantas. Quando uma planta é atacada por uma praga, elicitores presentes na secreção oral destes insetos são responsáveis por amplificar as respostas de defesa da planta (Halitschke et al., 2001). Em resumo, uma molécula sinal, como a sistemina por exemplo, é liberada no sistema vascular dos tecidos que sofreram injúria ativando a via octadecanóide de sinalização. Como conseqüência ocorre a biossíntese de ácido jasmônico, a ativação de genes que codificam componentes de vias de sinalização (genes precoces), a formação de H_2O_2, que é um mensageiro secundário e, finalmente, a ativação de genes envolvidos na defesa propriamente dita (genes tardios), como os genes de inibidores de proteinase (de Bruxelles & Roberts, 2001; Orozco-Cárdenas et al., 2001).

2.3 Evolução dos inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk

Existem dois pontos importantes na estrutura dos BBI que os tornam eficientes. O primeiro ponto é a conformação da alça de inibição que é complementar ao sítio ativo da enzima a ser inibida, o que permite uma ligação bastante forte entre enzima e inibidor. O outro é a rigidez estrutural ou conformação inflexível da alça de inibição atribuída à presença das pontes dissulfeto entre as cisteínas, à presença de pontes de hidrogênio, ao seu tamanho reduzido, à ocorrência de uma ou mais prolinas na alça e, no caso da primeira alça de inibição, uma treonina β-ramificada na posição P2 (Chen et al., 1992; Maeder et al.,1992). Estudos da estrutura tridimensional dos BBI de amendoim (Suzuki et al., 1987), soja (Werner & Wemmer, 1992) e cevada (Song et al., 1999) revelaram que nas três estruturas as pontes dissulfeto ocorrem entre os mesmos resíduos de cisteína (C_1-C_{14}, C_2-C_6, C_3-C_{13}, C_4-C_5, C_7-C_9, C_8-C_{12}, C_{10}-C_{11}), o que faz destes resíduos posições muito conservadas durante a evolução (Figura 3).

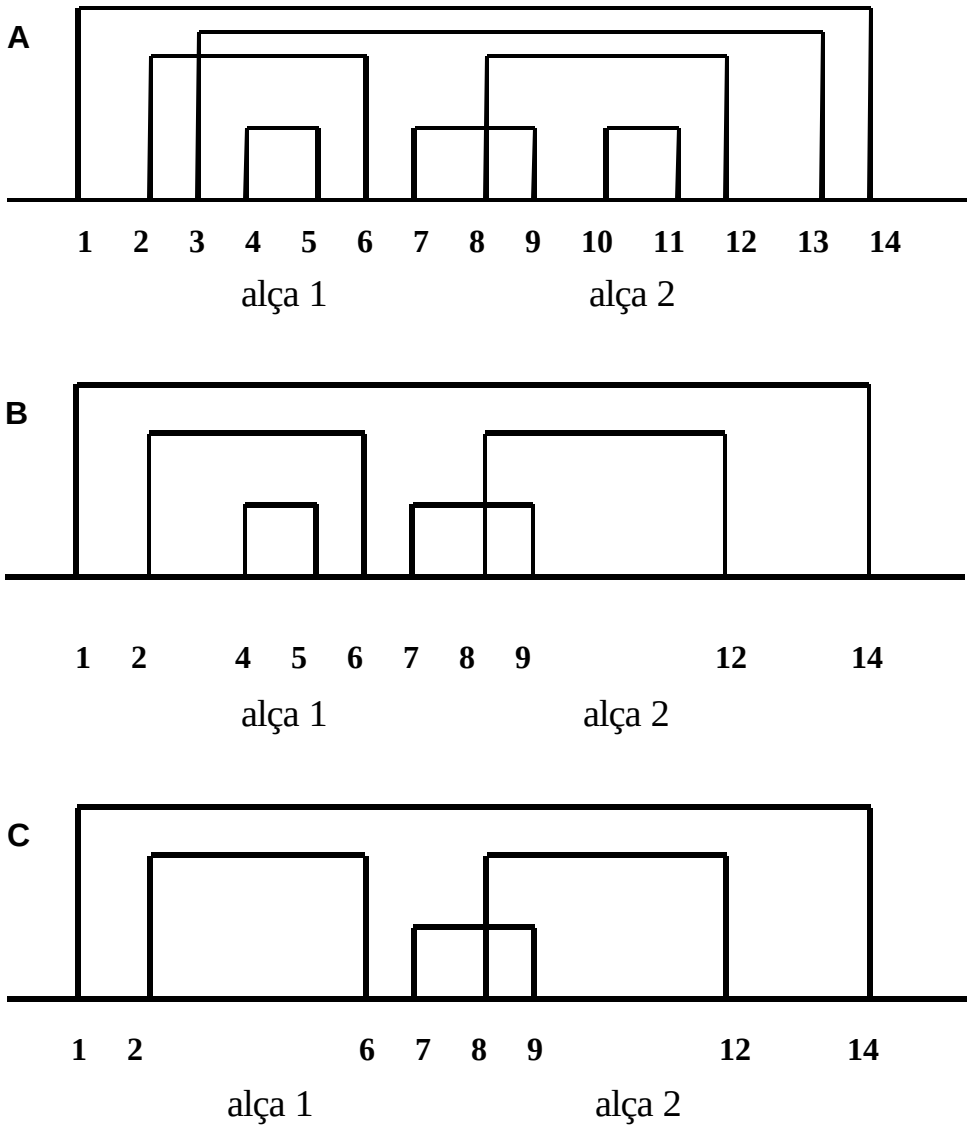

Figura 3 – Esquema da formação das pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína (numerados) em (A) dicotiledôneas com 14 resíduos de cisteína, em (B) monocotiledôneas com 10 resíduos de cisteína e em (C) monocotiledôneas com 8 resíduos de cisteína.

Fonte: adaptado de Prakash et al. (1996)

Odani e Ikenaka (1978a) e Baek e colaboradores (1994) propõem que os BBI de soja tenham evoluído de um inibidor ancestral comum que possuía apenas uma alça de inibição. Este ancestral seria um inibidor de tripsina ou de enzimas semelhantes à tripsina que teria sofrido uma duplicação interna no gene originando a um inibidor com duas alças de inibição. Segundo Odani e colaboradores (1986), uma classe de inibidores com uma alça única de inibição encontrada em germe de trigo sugere que estes sejam os inibidores ancestrais dos BBI com dupla alça de inibição. O fenômeno de duplicação dos resíduos 9 a 26 originando os resíduos 36 a 53 foi inicialmente proposto por Tan e Stevens (1971). Este inibidor com duas alças originário da duplicação seria um inibidor de tripsina que após sofrer mutações se tornou um BBI com a segunda alça inibindo também quimotripsina (Hammond et al., 1984).

Em seu estudo de evolução dos BBI, Prakash e colaboradores (1996) separaram em uma árvore filogenética os inibidores de monocotiledôneas em um grupo e os de dicotiledôneas em outro. Segundo os autores, os inibidores de monocotiledôneas de 8 kDa apresentam apenas a primeira alça de inibição, a qual inibe tripsina. A segunda alça sofreu mutações nas cisteínas perdendo sua função. No processo evolutivo, a duplicação destes inibidores de 8 kDa que apresentam perda de função da segunda alça, teria originado os inibidores de 16 kDa com duas alças de inibição, ambas correspondentes à primeira alça do inibidor que as originou. Diante destas características, os autores concluem que é devido a este padrão de evolução que os BBI de monocotiledôneas apresentam uma alta variabilidade em suas seqüências.

Os BBI de arroz pertencem a uma família multigênica e são compostos por pelo menos quatro cópias (Rakwal et al., 2001). São moléculas que possuem alta homologia entre si, porém não apresentam homologia elevada com outros BBI, principalmente de dicotiledôneas. Embora sua homologia comparada a outros inibidores seja baixa, estes inibidores apresentam cisteínas em posições conservadas e em número bastante elevado sendo que até o momento não se sabe a importância ou a função desta característica.

Um inibidor de milho induzido por ferimento que codifica uma proteína com alta similaridade aos BBI foi estudado por Rohrmeier e Lehle (1993). A seqüência de aminoácidos com 102 resíduos e massa molecular de 11 kDa, possui características interessantes como um peptídeo sinal amino terminal que inclui os resíduos 1 a 15 e um potencial sítio de glicosilação Asn(51)-Phe-Ser que podem indicar que esta seja uma glicoproteína secretada. Além disto, o inibidor possui 10 cisteínas que dão origem a 5 pontes dissulfeto e apresenta dois possíveis sítios de inibição de quimotripsina: Phe(52)Ser e Tyr(82)Ser, como os BBI.

Tiffin e Gaut (2001) estudaram a evolução dos inibidores de serino proteinases induzidos por ferimento de arroz, milho, sorgo e *Tripsacum*, chegando a conclusão de que eles tiveram uma história evolutiva bastante diferente. Esta diferença é provavelmente o resultado de pressões de seleção diversas, devido a condições demográficas e taxas de mutação às quais foram submetidos os diferentes gêneros durante o processo evolutivo. Além disto, os autores evidenciaram que as duas alças de inibição divergiram de formas diferentes, sendo que a segunda divergiu rapidamente.

2.4 Expressão na superfície de fagos filamentosos

Um dos mais recentes objetivos da engenharia de proteínas é desenvolver moléculas que tenham funções pré estabelecidas. Porém, ainda não se conhece por completo as regras que governam a conformação das proteínas (“folding”) e o reconhecimento molecular, tornando esta prática difícil. Recentemente, técnicas envolvendo a análise de bibliotecas de proteínas vêm sendo empregadas para a seleção de moléculas com funções específicas. Tais técnicas têm sido utilizadas para aumentar a atividade de enzimas (Demartis et al., 1999), melhorar a afinidade de ligação e especificidade de proteínas (Atwell & Wells, 1999), aumentar a estabilidade de proteínas (Sieber et al., 1998), identificar melhores ligantes para receptores (Koivunen et al., 1999) ou

selecionar novos inibidores de proteinase com alta afinidade (Tanaka et al., 1999; Kiczak et al., 2001). Porém, ao escolher uma estratégia de seleção para uma determinada função, é preciso considerar como isolar e caracterizar proteínas funcionais de uma biblioteca. A técnica de expressão de proteínas na superfície de fagos filamentosos é um mecanismo simples que permite relacionar a proteína selecionada para a característica desejada à seqüência de DNA, permitindo o escrutínio de bibliotecas com título de até 10^{12} (Wittrup, 1999).

Esta técnica foi desenvolvida por George Smith em 1985 o qual expressou pela primeira vez a enzima de restrição *Eco*RI como uma fusão da proteína oito (pVIII) do capsídeo do fago. Tipicamente, utiliza-se o bacteriófago M13, um vírus bacteriófago filamentoso que parasita bactérias gram-negativas que por sua vez apresentam pilus F e utiliza a maquinaria de replicação, transcrição e tradução da bactéria para se reproduzir. A partícula de fago é formada por uma fita simples de DNA envolta em uma capa protéica constituída de cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 4). Estas proteínas incluem aproximadamente 2700 cópias da pVIII e 5 cópias da pIII. Neste sistema o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da capa protéica do fago. Quando as partículas de fago são produzidas numa célula de bactéria, a proteína híbrida do capsídeo é incorporada à partícula viral e o DNA do fago contendo o gene fusionado, é empacotado (Wilson & Finlay, 1998; Rodi & Makowski, 1999). Assim é possível expressar uma população de diversos peptídeos e empregar estes fagos em estudos de interação entre proteínas, estabilidade entre outros, promovendo uma rápida purificação de peptídeos com as características desejadas (Devlin et al., 1990; Scott & Smith, 1990). Com o advento de novas técnicas de biologia molecular, como a reação da polimerase em cadeia (PCR), esta técnica foi aperfeiçoada e hoje sua aplicação atinge as mais diversas áreas como a medicina, o melhoramento de plantas, estudos de evolução de proteínas e ácidos nucléicos e muitos outros ramos da ciência atual. Segundo Kiczak e colaboradores (1999), a grande vantagem deste método é a

ligação direta que se tem entre o fenótipo observado e um genótipo encapsulado que permite a rápida obtenção da seqüência selecionada.

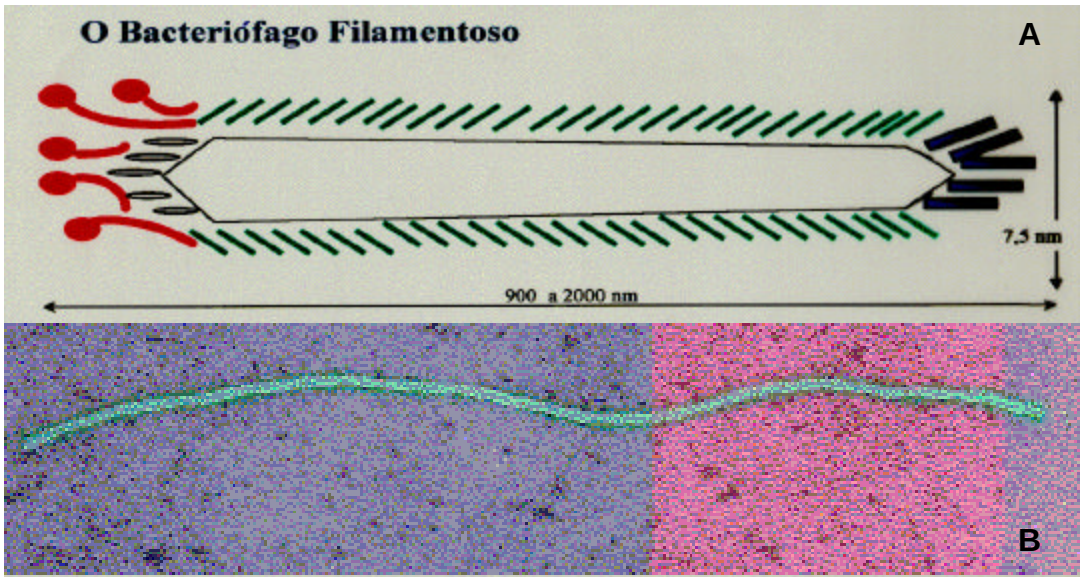

Figura 4 – Partícula do bacteriófago M13. (A) desenho representativo mostrando as proteínas constituintes da capa protéica do vírus: pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX; (B) micrografia eletrônica.

Fonte: adaptado de Webster (1996)

De uma maneira geral, duas abordagens básicas podem ser feitas com esta técnica. A primeira é a inserção de uma mutação em um gene estrutural do vírus levando à expressão do peptídeo mutado na superfície da partícula viral em condições tais que as funções essenciais do produto daquele gene não são afetadas. A segunda abordagem é a produção de uma biblioteca de peptídeos a partir da inserção de um oligonucleotídeo degenerado, o qual será expresso como fusão de uma das proteínas da capa viral (Rodi & Makowski, 1999). Segundo Makowski (1994), a perfeita exposição de um peptídeo na superfície do fago

possibilita a atuação desta proteína como um ligante, uma enzima, um imunógeno ou desempenhando qualquer outra atividade em processos biológicos. A inserção de oligonucleotídeos degenerados e subseqüente construção de bibliotecas de peptídeos torna possível a seleção de proteínas com atividades ou afinidades específicas.

Como qualquer outra técnica, existem limitações que devem ser destacadas. Por compreender um sistema biológico, este responde de maneira diferente às diversas mutações que podem ser feitas. Algumas mutações podem acarretar problemas na replicação enquanto outras podem ser extremamente vantajosas para o fago tanto em relação ao crescimento como em relação à estabilidade da partícula viral (Rodi & Makowski, 1999). Isto geraria bibliotecas pouco confiáveis que reduziriam as chances de se obter peptídeos com as características desejadas. Outra limitação observada por Adey e colaboradores (1995), compreende a seleção de uma classe de fagos que eram isolados por se ligarem diretamente ao plástico (poliestireno) dos tubos utilizados neste processo. Porém os autores destacam que se o processo de seleção for realizado de maneira eficiente, uma quantidade significativamente maior de fagos que se ligam a proteína alvo deve estar presente, mascarando os fagos selecionados por se ligarem ao poliestireno. Para evitar ou minimizar estes problemas, os autores sugerem que seja usado uma alta quantidade da proteína alvo a ser imobilizada, que os tubos de seleção sejam bloqueados com leite desnatado e se possível que seja utilizado um sistema de eluição dos fagos específico para o experimento que está sendo realizado. Além de todos estes cuidados é importante detectar quais são os fagos que estão se ligando ao tubo de seleção. Para isto é preciso incluir sempre um controle negativo que seria um tubo que passa pelo processo de seleção que foi apenas bloqueado. Este conjunto de limitações são responsáveis por problemas que fazem com que algumas das aplicações desta técnica não tenham sido bem sucedidas (Wilson & Finlay, 1998).

2.5 Expressão de inibidores na superfície de fagos filamentosos e construção de bibliotecas

Nos últimos anos, uma série de bibliotecas de expressão de peptídeos degenerados de diferentes tamanhos têm sido construídas a fim de se isolar ligantes específicos para vários tipos de alvo como receptores de membrana (Koivunen et al., 1999), proteínas da capa de vírus (Gough et al., 1999), proteínas de interesse médico (Atwell & Wellas, 1999; Hansson et al., 1999) e agronômico (Koiwa et al., 1998; Kiczak et al., 1999). Dentre as proteínas de interesse agronômico se destacam os inibidores de proteinase.

Inibidores de proteinase do tipo serino e cisteíno têm sido expressos em fagos M13 mostrando ser possível o emprego da técnica de expressão na superfície de fagos filamentosos no estudo da interação inibidor X proteinase, na estabilidade destes inibidores e na construção de bibliotecas que possam ser utilizadas na seleção de inibidores específicos para as proteinases do trato digestivo de pragas importantes na agricultura (Tanaka et al., 1995; Stoop et al., 2001; Volpicella et al., 2001).

O inibidor de serino proteinases BPTI (tipo Kunitz) foi expresso com sucesso na superfície do fago M13, como uma fusão da proteína 3 (pIII). A proteína funcional foi modificada em um aminoácido e uma biblioteca de expressão foi construída e selecionada contra uma elastase humana, mostrando a eficiência do método em criar um inibidor de elastase de alta afinidade com a proteína de interesse a partir de um inibidor de tripsina (Roberts et al., 1992). Estudando este mesmo inibidor, Kiczak e colaboradores (1999) construíram uma biblioteca de expressão por meio da mutação do mesmo aminoácido da posição P1 a qual foi selecionada contra tripsina e quimotripsina bovina. Os resultados deste estudo mostraram que após duas etapas de seleção para tripsina, foram obtidas apenas moléculas com lisina em P1. Quando selecionada para quimotripsina, foram obtidos os aminoácidos lisina, triptofano, glicina, metionina e leucina nesta posição, o que revela uma

menor tendência a preferência por um único aminoácido para a inibição da quimotripsina. Em estudo recente, Kiczak e colaboradores (2001) construíram uma biblioteca de expressão em fagos mutando as posições P_1, P_1', P_2' e P_3' deste inibidor. Após seleção contra quimotripsina e elastase, foram obtidos mutantes com características inibitórias de 420 e $7x10^6$ vezes superior ao inibidor BPTI original.

Outro inibidor de serino proteinases expresso com sucesso na superfície de fagos filamentosos foi o inibidor de batata do tipo 2. Inibidores derivados deste inibidor de batata foram utilizados para estudar as interação com tripsina e quimotripsina. Uma mutação de leucina para arginina mudou a especificidade do primeiro domínio de quimotripsina para tripsina. Além disto, após três ciclos de seleção, foi possível recuperar mutantes funcionais de uma mistura de variantes funcionais e não funcionais (Jongsma et al., 1995). Da mesma forma, mutantes ativos e inativos do inibidor de tripsina de mostarda do tipo 2, eficientemente expresso na superfície do fago filamentoso M13, foram utilizados para seleção. Após quatro ciclos, um mutante ativo pôde ser selecionado dentre 10^4 mutantes, mostrando que este sistema de seleção foi eficiente (Volpicella et al., 2001).

McBride e colaboradores (1998) construíram uma biblioteca de expressão da alça de inibição de tripsina do BBI MAI-D4 na superfície de fagos filamentosos, variando os aminoácidos das posições P1, P2 e P2' e selecionaram esta biblioteca contra a quimotripsina bovina. Na posição P1 foram selecionados fenilalanina e tirosina, em P2 somente treonina e em P2' foram selecionados leucina e isoleucina. Segundo os autores, a treonina na posição P2 gera o mais baixo K_i e sua taxa de hidrólise é bastante lenta. Estudos de estrutura mostram que são estabelecidas interações com os grupos hidroxil e metil da treonina, o que a torna muito eficiente nesta posição. Em estudos anteriores empregando-se peptídeos sintéticos do BBI de soja, Terada e colaboradores (1978) concluíram que a substituição da leucina por tirosina na posição P1 aumentou a capacidade de inibição da quimotripsina. Alterações

feitas na alça de inibição da tripsina não tiveram nenhum efeito em melhorá-la. Porém a substituição da lisina por leucina na posição P1 aboliu a atividade anti-triptica, convertendo o peptídeo em inibidor de quimotripsina.

Tanaka e colaboradores (1999) expressaram o inibidor de proteinases do tipo serina derivado de sanguessuga (LDTI) na superfície do fago filamentoso M13, utilizando o vetor pCANTAB 5E. Uma biblioteca de mutantes foi construída utilizando-se um nucleotídeo degenerado e posteriormente foi selecionada contra trombina. Os inibidores selecionados mostraram uma preferência por arginina na posição P1 e por valina na posição P1'.

Koiwa e colaboradores (1998) expressaram dois inibidores de cistatina de soja (scNM e scLM) na superfície de fagos e selecionaram as partículas expressando estes dois inibidores contra a papaína. O inibidor scNM foi selecionado após três etapas contra a papaína e mostrou ter efeito retardador do crescimento e desenvolvimento do gorgulho do feijoeiro (*Callosobruchus maculatus*). Segundo os autores, estes resultados mostram que a ligação de cistatinas por afinidade pode ser usada nos processos de seleção da técnica de expressão de proteínas na superfície de fagos filamentosos a fim de se encontrar variantes com melhor atividade inseticida, confirmando o potencial da técnica. Tais dados foram também observados por Ylinenjarvi e colaboradores (1999) e Koiwa e colaboradores (2001).

2.6 A cana-de-açúcar e a broca-da-cana

O Brasil é o maior produtor de açúcar de cana e o único país no mundo a produzir um combustível alternativo, renovável e pouco poluente em larga escala, o álcool, em substituição ao petróleo. O mercado sucroalcooleiro movimenta com a venda dos produtos açúcar, álcool, aguardente e subprodutos da cana cerca de 12,7 bilhões de reais por ano. Por constituir um mercado de expressão na economia brasileira, preocupações com a qualidade e a produtividade são constantes no setor. Qualidade e produtividade são função

de diversos fatores como preparo do solo, adubação, escolha de variedades, plantio, ataque de pragas e doenças. Dentre estes fatores, estima-se que as perdas causadas pelo ataque de pragas na cana-de-açúcar chegue a cerca de 470 milhões de dólares por ano (Bento, 1999).

A broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) é a principal praga da cana-de-açúcar, ocorrendo em todas as regiões canavieiras do Brasil (Carvalho et al., 2002). O adulto da broca, a mariposa, oviposita preferencialmente na parte dorsal das folhas. As lagartas recém eclodidas dos ovos se alimentam da folha e no 2º ínstar penetram no colmo abrindo galerias (Parra, 1993). Além dos prejuízos diretos causados pela broca como perda de peso, morte das gemas e abertura de galerias nos colmos, a referida praga causa prejuízos indiretos ainda mais significativos devido à penetração de microorganismos (fungos *Fusarium moniliforme* e/ou *Colletotrichum falcatum*) causadores de podridões, que invertem a sacarose e produzem metabólitos inibidores, diminuindo a pureza do caldo e, consequentemente, reduzindo o rendimento industrial para a produção do açúcar (Gallo et al., 2002). Outro efeito causado pelos microorganismos que contaminam o caldo é a concorrência com as leveduras na assimilação dos açúcares levando a diminuição na produção de álcool e queda no rendimento fermentativo.

Devido a biologia da praga, o controle químico da broca-da-cana se torna inviável já que esta passa a maior parte de sua fase larval dentro do colmo, ficando inacessível ao contato com inseticidas, além deste ser oneroso devido ao porte da cultura (Gallo, 2002). Por esta razão surgiu o interesse no desenvolvimento de variedades resistentes, no uso do controle biológico (Botelho & Parra, 1998) e da químio-esterilização (Nakano & Poletto, 1998), na aplicação de biopesticidas e na transferência de genes de resistência para minimizar os danos causados por esta praga (Braga et al., 2003). Neste contexto, se aplica o estudo e melhoramento de inibidores de proteinase que tenham efeito no crescimento e desenvolvimento da broca (Pompermayer et al., 2001) com finalidade de aplicá-los no controle da praga.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Identificação das seqüências de inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk

Cento e trinta e seis seqüências de aminoácidos de BBI foram identificadas no banco de dados “GenBank”. Estas seqüências foram inicialmente identificadas empregando-se o programa de pesquisa BLAST (Altschul et al., 1990), tendo como seqüência a ser testada (“query sequence”) o inibidor de *Glycine max* (P01055) (Odani & Ikenaka, 1972). A fim de minimizar a duplicação de seqüências provenientes da mesma proteína, as 136 seqüências foram comparadas e 87 seqüências diferentes foram selecionadas para os estudos posteriores. O alinhamento destas seqüências foi feito utilizando-se o programa CLUSTAL_W (Thompson et al., 1994), utilizando-se os parâmetros padrão do programa. A matriz de Gonnet foi usada para gerar a matriz das distâncias das seqüências de proteínas, a qual foi usada na análise filogenética pelo método de "Neighbor-Joining" (Saitou & Nei, 1987). A definição dos grupos foi baseada nos valores de “bootstrap” (método que estima a variância associada às distâncias), utilizando-se 10.000 reamostragens dos dados. A árvore filogenética foi desenhada utilizando-se o programa TreeView 1.5 (Page, 1996). Estes estudos foram realizados utilizando-se quatro diferentes tipos de seqüências: todas as seqüências recuperadas dos bancos de dados, apenas as seqüências completas, apenas a porção das seqüências onde se encontram os sítios ativos (excluindo-se a porção N terminal) e somente as alças de inibição.

3.2 O banco de dados do SUCEST

O “Projeto Transcriptoma da Cana-de-açúcar” (SUCEST) (http://sucest.lad.ic.unicamp.br/en/) teve como objetivo o seqüenciamento em larga escala de seqüências expressas (EST, *expressed sequence tags*) de cana-de-açúcar e atualmente conta com 43.000 agrupamentos de seqüências expressas (“EST clusters”) provenientes de 27 bibliotecas de cDNA preparadas de diversos tecidos da planta (Vettore et al., 2001). Neste trabalho, o banco de dados do SUCEST foi utilizado para identificar BBI putativos de cana-de-açúcar.

3.3 Identificação de inibidores de serino proteinases do tipo Bowman-Birk putativos de cana-de-açúcar

Agrupamentos consenso de seqüências expressas de cana-de-açúcar foram identificados por meio do programa de pesquisa BLAST, utilizando-se as seqüências dos BBI de soja (P01055), arroz (BAB40052), milho (P31862) e trigo (P81713) como seqüências testadas (“query sequences”) no banco de dados do SUCEST. Os agrupamentos (“clusters”) identificados no SUCEST foram utilizados como seqüências testadas (“query sequences”) para uma nova pesquisa utilizando-se o programa BLAST, no banco de dados "GenBank". Desta pesquisa, somente foram consideradas como inibidores putativos aquelas seqüências que apresentavam alta homologia com BBI conhecidos. As seqüências resultantes desta análise foram então analisadas quanto a presença das alças de inibição e dos resíduos de cisteína característicos deste tipo de inibidor. Desta seleção, foram extraídas 14 seqüências que estão depositadas no banco de dados "GenBank" com os seguintes números de acesso: AY093804, AY093805, AY093806, AY093807, AY093808, AY093809, AY093810, AY093811, AY093812, AY093813, AY093814, AY093815, AY093816, AY093817. Com a finalidade de se determinar as relações de ancestralidade para os inibidores estudados, árvores filogenéticas não

enraizadas foram construídas utilizando-se 101 seqüências de BBI sendo 87 seqüências originárias do banco de dados "GenBank" e 14 do banco de dados do SUCEST.

3.4 Análise da expressão assistida por computador

Assumindo-se que a síntese, ligação do cDNA ao vetor e os eventos de transformação ocorram todos ao acaso, a quantidade de uma determinada EST em uma biblioteca de cDNA específica é provavelmente proporcional ao nível de expressão dos mRNAs daquela seqüência. O banco de dados do SUCEST é composto por bibliotecas de cDNA não normalizadas, originárias de diferentes tecidos e com um número definido de ESTs por biblioteca. A análise da expressão de BBI putativos foi realizada qualitativa e quantitativamente por meio de experimentos assistidos por computador. Nestes experimentos foram feitas correlações entre o número de ESTs de BBI e o número total de ESTs em uma determinada biblioteca de cDNA.

3.5 Cepa bacteriana e meios de cultura

Bactérias *Escherichia coli* da cepa TG1 (K12(lac-pro), supE, thi, hsdD5/F', traD36, proAB, lacIq, lacZ∆M15) foram utilizadas em todas as etapas deste trabalho.

Neste trabalho foram utilizados os meios de cultura Luria-Bertani (LB) composto por 1% (p/v) de bacto-triptona, 0,5% (p/v) de extrato de lêvedo, 1% (p/v) de NaCl e pH 7,5; meio 2xYT composto por 1,6% (p/v) de bacto-triptona, 1% (p/v) de extrato de lêvedo, 0,5% (p/v) de NaCl e pH 7,5; meio SOB composto por 2% (p/v) de bacto-triptona, 0,5% (p/v) de extrato de lêvedo, 10mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 10mM de $MgCl_2$ e pH 7,5 e meio mínimo composto por 18,7mM de NH_4Cl, 22mM de KH_2PO_4, 22,4mM de $Na_2HPO_4.7H_2O$, 1mM de

$MgSO_4.7H_2O$, 2% de glicose e 0,05% (p/v) de NaCl (Sambrook & Russell, 2001).

3.6 Expressão dos inibidores na superfície de fagos filamentosos

O inibidor do tipo Bowman-Birk de soja (IBB-1, P01055) foi clonado por Galgaro[1] no vetor pCANTAB 5E (Amersham Biosciences), um fagomídeo que pode se replicar em *E. coli* como plasmídeo utilizando a origem de replicação *col*E1 ou como fago filamentoso por meio da origem de replicação M13. Porém, a expressão do gene completo não foi observada provavelmente devido ao alto número de resíduos de cisteína, responsáveis pela formação de 7 pontes dissulfeto. O trabalho relata que em uma tentativa de resolver o problema de expressão do inibidor, a proteína IBB-1 foi dividida em duas menores. Um inibidor contendo a alça de inibição de tripsina com 42 aminoácidos, chamado inibidor TRI e outro contendo a alça de inibição de quimotripsina com 35 aminoácidos, chamado inibidor QUI. Os dois inibidores TRI (Figura 5) e QUI (Figura 6) derivados do inibidor IBB-1 de soja foram clonados no vetor pCANTAB 5E e expressos de maneira funcional na superfície do fago filamentoso M13.[1]

Os inibidores TRI e QUI clonados por Galgaro[1] nos vetores pCANTAB 5E foram então utilizados para a construção de bibliotecas de inibidores de tripsina (TRI) e quimotripsina (QUI).

[1] GALGARO, M.L. **Expressão e seleção de inibidores de proteinase Bowman-Birk, em bacteriófagos, específicos às enzimas de pragas de interesse agronômico**. Piracicaba, 1998. 51p. (Relatório de bolsa de pós-doutorado FAPESP, processo 97/01734-3).

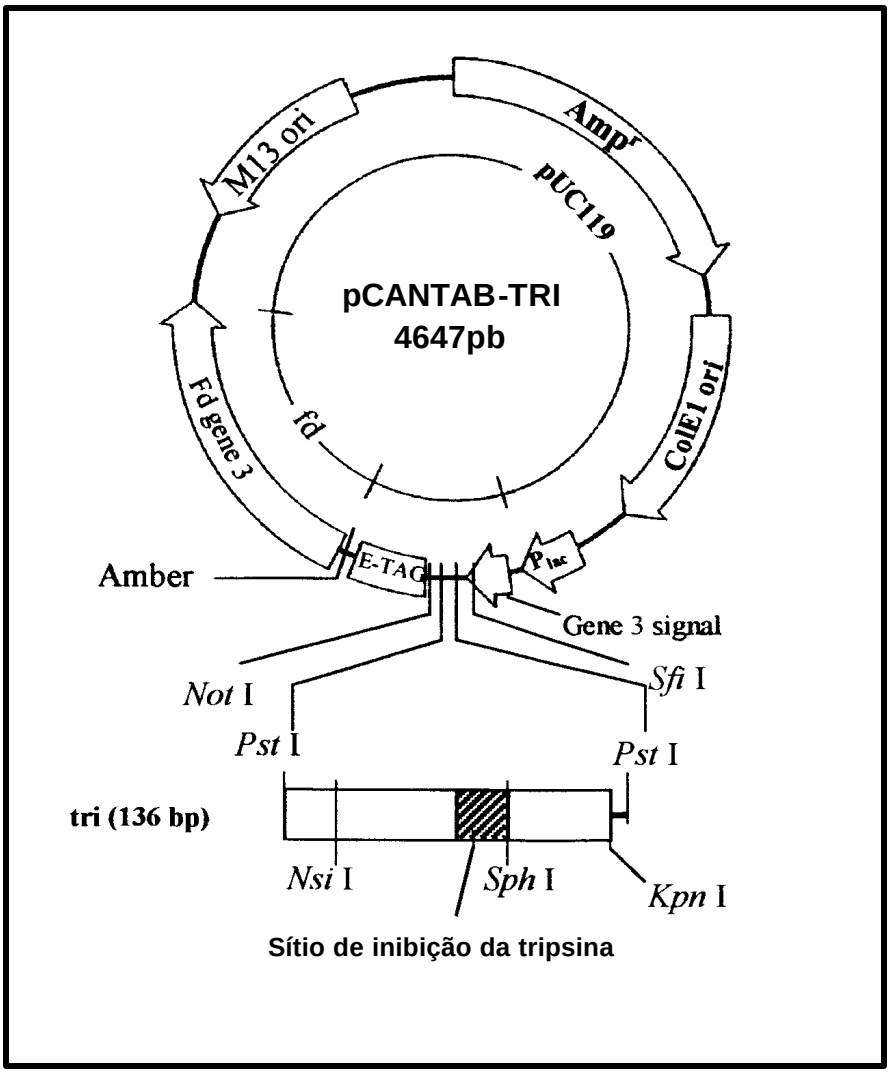

Figura 5 – Fagomídeo recombinante contendo a alça de inibição da tripsina (pCANTAB-TRI).

Fonte: adaptado do manual Pharmacia Biotech – Expression Module/Recombinant Phage Antibody System, 1995

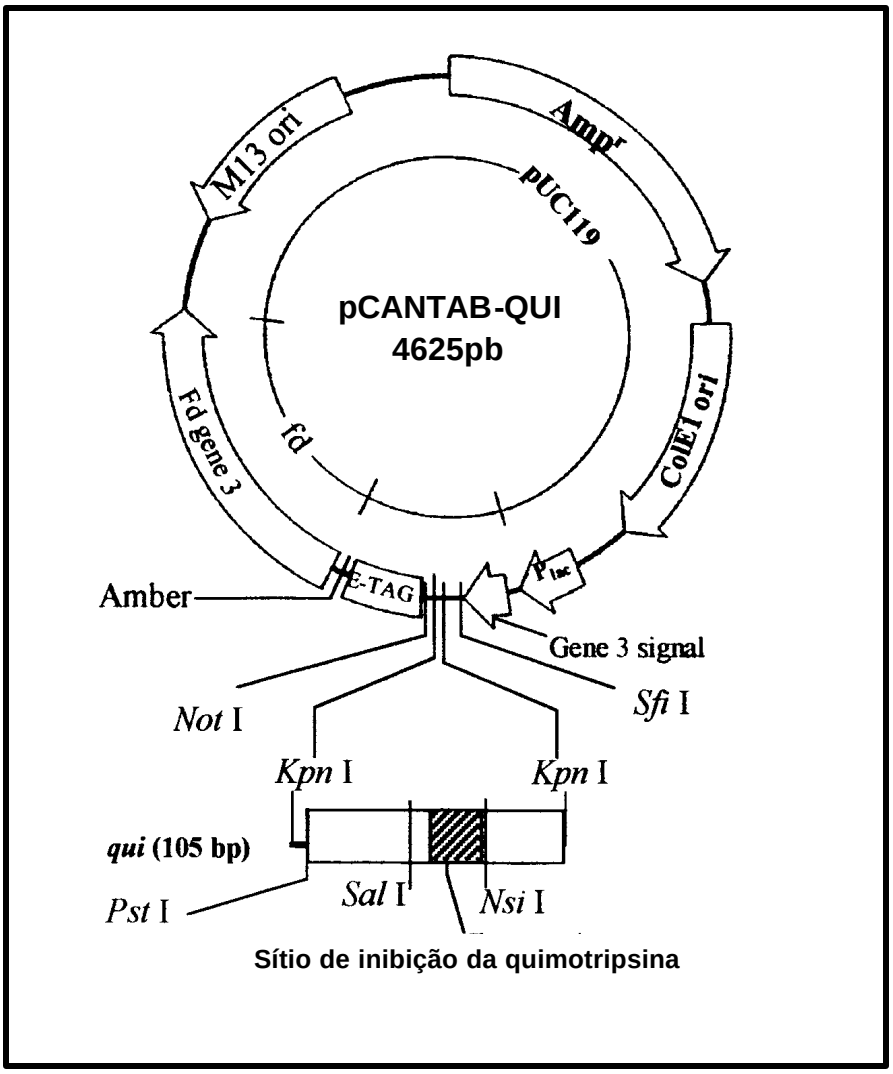

Figura 6 – Fagomídeo recombinante contendo a alça de inibição da quimotripsina (pCANTAB-QUI).

Fonte: adaptado do manual Pharmacia Biotech – Expression Module/Recombinant Phage Antibody System, 1995

3.7 Construção das bibliotecas de inibidores

3.7.1 Síntese dos iniciadores degenerados

Para a construção das bibliotecas de inibidores de tripsina (TRI) e quimotripsina (QUI), foi feita uma análise dos sítios de inibição dos BBI depositados em bancos de dados. A partir desta análise optou-se pela mutação de quatro aminoácidos das alças de inibição dos inibidores TRI e QUI, sendo tal escolha baseada na importância do aminoácido no processo inibitório bem como no seu grau de conservação.

O inibidor TRI foi mutado nas posições P_2, P_1, P_1', P_2' e o inibidor QUI foi mutado nas posições P_2, P_1, P_2' e P_4'. As modificações foram feitas utilizando-se o método descrito por Sparks e colaboradores (1996) e apresentado por Adey e colaboradores (1996). Foram sintetizados dois tipos de iniciadores para a modificação de cada sítio de inibição (TRI e QUI). Um iniciador maior contendo parte das seqüências TRI e QUI, que apresenta a degeneração NNB (N=A, T, C, G; B=T, C, G) nas posições a serem mutadas e sítios de restrição específicos que permitem sua posterior clonagem nos vetores pCANTAB-TRI (Figura 5) e pCANTAB-QUI (Figura 6). Estes iniciadores foram chamados de TRI-NNB e QUI-NNB e podem ser visualizados nas Figuras 7 e 8. Também foram sintetizados outros dois iniciadores (TRI-NNBcom., Figura 9 e QUI-NNBcom., Figura 10) complementares aos primeiros (TRI-NNB e QUI-NNB) que permitem a amplificação destes iniciadores via PCR dando origem aos fragmentos degenerados. Estes fragmentos degenerados foram então clonados nos vetores pCANTAB-TRI e pCANTAB-QUI, gerando as bibliotecas de inibidores de tripsina e quimotripsina.

5’ *SphI*
GAT CAA TGC *GCA TGC* **NNB NNB NNB NNB** CCT CCT CAA
Asp Gln Cys Ala Cys ? ? ? ? Pro Pro Gln

TGC CGC TGT TCA GAT ATG AGA CTG AAT TCG TGC CAT
Cys Arg Cys Ser Asp Met Arg Leu Asn Ser Cys His

NsiI **3’**
TCA GCT TGT AAA TC*A TGC AT*T TGC GCA C
Ser Ala Cys Lys Ser Cys Ile Cys Ala

Figura 7 - Iniciador degenerado TRI-NNB usado na construção da biblioteca da alça de inibição de tripsina.

5’ *NsiI*
GGT ACC AAA TC*A TGC AT*T TGC **NNB NNB** TCG **NNB** CCT
Gly Thr Lys Ser Cys Ile Cys ? ? Ser ? Pro

Sal I 3’
NNB CAG TGT TTT TGT *GTC GAC* ATA ACC GAT TTC
? Gln Cys Phe Cys Val Asp Ile Thr Asp Phe

Figura 8 – Iniciador degenerado QUI-NNB usado na construção da biblioteca da alça de inibição de quimotripsina.

3’ *NsiI* **5’**
A TTT AG*T ACG TA*A ACG CGT G

Figura 9 – Iniciador complementar ao TRI-NNB (TRI-NNBcom.) usado na construção da biblioteca da alça de inibição de tripsina.

3’ *Sal I* **5’**
CA *CAG CTG* TAT TGG CTA AAG

Figura 10 – Iniciador complementar ao QUI-NNB (QUI-NNBcom.) usado na construção da biblioteca da alça de inibição de quimotripsina.

3.7.2 Amplificação dos iniciadores degenerados e clonagem dos fragmentos

As reações de amplificação dos iniciadores degenerados foram feitas via PCR, em dois passos (Adey et al., 1996):

1° passo

iniciador-NNB	400 pmoles
iniciador-NNBcom.	400 pmoles
tampão (10X concentrado)	10,0 μL
cloreto de magnésio	1,5 mM

- 75°C por 15 minutos (desnaturação)
- resfriamento lento até 30°C (anelamento)

2º passo

dNTP	0,2 mM
BSA	10 μg
Taq DNA polimerase	50 unidades

O volume da reação foi completado para 100 μL com água autoclavada.

- 37°C por 30 minutos (extensão)

Depois de submetidos a PCR, os iniciadores TRI-NNB e QUI-NNB foram convertidos em dupla fita (fragmento degenerado) e desta forma foram tratados com as enzimas “Klenow” e T_4 DNA polimerase para a remoção da protuberância 3' terminal e formação de extremidades lisas. Os fragmentos foram clonados no sítio *SmaI* do vetor pUC-18 (Amersham Biosciences) e seqüenciados para a confirmação da correta síntese e amplificação.

Depois de confirmada a seqüência dos fragmentos, uma nova amplificação foi feita. Os fragmentos TRI-NNB foram digeridos com *SphI* e *NsiI* e ligados ao vetor pCANTAB 5E–TRI (Figura 5) digerido com as mesmas enzimas de restrição. Da mesma forma, os fragmentos QUI-NNB foram

digeridos com *NsiI* e *SalI* e ligados ao vetor pCANTAB 5E-QUI (Figura 6) digerido com as mesmas enzimas de restrição. Por meio deste processo de restrição e ligação foi possível substituir as alças originais de inibição de tripsina e quimotripsina por alças com seqüências aleatórias. Várias reações de ligação foram feitas para que se conseguisse o mínimo de 160.000 variantes ou transformantes de cada inibidor. As reações de ligação foram feitas à 16°C por 16 horas.

3.7.3 Preparo de células competentes e transformação por eletroporação

As células TG1 competentes para eletroporação foram preparadas segundo Chung e colaboradores (1995, modificado). As células cresceram em meio SOB à 37°C e 180 rpm até atingirem $D.O._{600nm}$ de 0,4 e após permanecerem no gelo por 10 minutos, foram centrifugadas a 10.000xg , 2°C por 15 minutos. O sedimento foi então lavado 4 vezes em água autoclavada gelada autoclavada e, ressuspendido em glicerol 10%. As células foram congeladas em Nitrogênio líquido e mantidas a –80°C. Na eletroporação, 5 µl da reação de ligação dos fragmentos degenerados TRI-NNB/*SphI*/*NsiI* e QUI-NNB/*NsiI*/*SalI* com os vetores pCANTAB-TRI/*SphI*/*NsiI* e pCANTAB-QUI/*NsiI*/*SalI* foram utilizados para transformar 40 µl de células competentes. As células foram eletroporadas a 2,5 Kv, 50 Ω e 25 µF em aparato da BioRad. Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1mL de meio SOB à mistura de células e estas foram crescidas à 37°C e 180 rpm por uma hora. As culturas foram então plaqueadas em meio SOB contendo ampicilina (100 µg/mL) e mantidas a 30°C para multiplicação por aproximadamente 12 horas.

3.7.4 Análise dos transformantes (“Screening” por PCR)

Depois de feita a transformação, as colônias resultantes foram contadas e procedeu-se a análise das colônias transformantes via PCR. Em um tubo

Eppendorf com 25 μl de água autoclavada, foram adicionadas células da colônia selecionada e, a este volume, foram acrescentados:

iniciador-1	3 pmoles
iniciador-2	3 pmoles
tampão (10X concentrado)	2,5 μL
cloreto de magnésio	1,5 mM
dNTP	0,03 mM
Taq DNA polimerase	1,5 unidade

O volume da reação foi completado para 50 μL com água autoclavada e a seguinte PCR foi realizada:

- 94°C por 3 minutos
- 94°C por 1 minuto (desnaturação)
- 50°C por 1 minuto (anelamento)
- 72°C por 1,5 minutos (extensão)
- 72°C por 3 minutos

25 ciclos

Depois de submetidos a PCR, os tubos foram mantidos a 4°C até a análise das reações em gel de agarose 0,8%. Para a confirmação da clonagem do iniciador degenerado em pUC18, foram utilizados os iniciadores UP (5' TGA CCG GCA GCA AAA TG 3') e RP (5' GTA CCA GTA TCG ACA A 3'). Durante a construção da biblioteca, também foram feitas amplificações para confirmar a clonagem dos insertos contendo o sítio ativo degenerado. Neste caso, os iniciadores utilizados foram TRIA (5' CCG GGC TGC AGA ATT CGA GCT CGG 3') e TRIB (5' CCA CTG CAG TGC GCA AAT GCA TG 3') para o inibidor de tripsina e QUIA (5' CGC GGT ACC CTG CAG GTT TTC CTT G 3') e QUIB (5' CGG TAC CAA ATC ATG CAT TTG CGC 3') para o inibidor de quimotripsina.

3.7.5 Seqüenciamento dos transformantes

A confirmação das seqüências dos iniciadores degenerados assim como da biblioteca foi realizada utilizando-se os procedimentos descritos no manual do kit "ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits":

"MIX Big Dye"	2 μL
iniciador RP	3 pmoles
tampão (Tris HCl – $MgCl_2$, pH9,0)	6 μL
DNA plasmidial	200-500 ng

O volume da reação foi completado para 10 μL com água autoclavada e a seguinte PCR foi realizada:

- 96°C por 2 minutos
- 96°C por 20 segundos (desnaturação)
- 50°C por 10 segundos (anelamento)
- 60°C por 4 minutos (extensão)
- 72°C por 7 minutos

25 ciclos

Após a reação de amplificação, os fragmentos foram precipitados adicionando-se 20 μL de água e 60 μL de isopropanol. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugada por 20 minutos à 18.000xg em microcentrífuga de bancada. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70% e centrifugado por 15 minutos como descrito anteriormente. O sobrenadante foi descartado e os tubos colocados para secar com a tampa aberta em termociclador por 1 minuto à 90°C.

O seqüenciamento foi realizado no Laboratório de Genética Fitopatológica (Depto. de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP), sob coordenação do Prof. Dr. Luiz Eduardo Aranha Camargo, em seqüenciador automático de DNA ABI PRISM 377. No momento do

seqüenciamento, as amostras foram ressuspendidas em 4 μL de tampão contendo 5 partes de formamida e 1 parte de “loading buffer” (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 40% de sacarose) e o DNA foi denaturado à 98°C por 2 minutos antes de 1 μL ser aplicado ao gel.

Foram feitos estoques em glicerol das bactérias contendo todos os fagomídeos seqüenciados e estes estoques foram mantidos à–80°C.

3.8 Seleção das bibliotecas TRI-NNB e QUI-NNB contra a tripsina purificada e extrato intestinal de lagartas de *D. saccharalis* e contra a tripsina bovina

3.8.1 Criação das lagartas de *D. saccharalis* em laboratório

Lagartas de *Diatraea saccharalis* foram criadas no Laboratório de Biologia de Insetos (Depto. de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP), sob a coordenação do Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, para serem usadas na fase de seleção das bibliotecas.

As lagartas foram mantidas em tubos de dieta (2,5cm de diâmetro e 8,0cm de altura) tampados com algodão, na proporção de 5 lagartas/tubo. Estas foram alimentadas com dieta artificial à base de farelo de soja e germe de trigo (King & Hartley, 1985) e mantidas a 25°C, 60±10% de umidade e fotoperíodo de 14/10 horas de claro/escuro.

3.8.2 Preparo do homogeneizado intestinal

Lagartas de *D. saccharalis* no 5° ou 6° ínstar de desenvolvimento foram imobilizadas em gelo e em seguida procedeu-se a extração do conteúdo da membrana peritrófica do ventrículo intestinal na presença de uma solução salina gelada (125 mM NaCl). As membranas de 20 intestinos foram homogeneizadas em Potter-Elvehjen com 1mL de água autoclavada gelada.

Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado por 30 minutos a 22.000xg e 4°C. O sobrenadante foi recuperado e usado como fonte de enzimas digestivas no processo de seleção (Ferreira et al., 1994).

3.8.3 Obtenção dos fagos das bibliotecas

Para a obtenção dos fagos das bibliotecas de tripsina e de quimotripsina, as células de bactérias estocadas à -80°C foram descongeladas em gelo e diluídas com meio de cultura 2xYT suplementado com ampicilina (100 μg/mL) e 2% de glicose, até a $D.O._{600nm}$ de 0,2. As culturas foram incubadas a 37°C e 180 rpm até que a $D.O._{600nm}$ atingisse 0,5. Em seguida foram adicionados $1x10^8$ pfu/mL do bacteriófago M13K07 ("helper phage") e as culturas foram crescidas à 37°C por 30 minutos a 150 rpm e em seguida por 30 minutos a 250 rpm. As culturas foram então centrifugadas a 1.000xg por 10 minutos e após o descarte dos sobrenadantes, os sedimentos foram ressuspendidos em dez vezes o volume inicial com meio 2xYT suplementado com ampicilina (100 μg/mL) e canamicina (50 μg/mL) e foram multiplicadas à 37°C e 250 rpm por 18 horas. As bactérias assim crescidas foram centrifugadas por duas vezes a 8.000xg por 15 minutos. Aos sobrenadantes recuperados foi adicionada solução de PEG/NaCl (16% PEG 8.000 e 2M NaCl) em proporção de 1:5 e as misturas foram mantidas no gelo por 1 hora. Em seguida estas misturas foram centrifugadas a 10.000xg por 20 minutos, os sedimentos foram ressuspendidos em 1/20 do volume anterior (2,5mL) de PBS estéril e filtrados em filtro estéril Millex-HA 0,45μm (Millipore). Os filtrados contendo os fagos foram estocados em tubos de polipropileno a 4°C por até 5 dias.

3.8.4 Seleção

Como fonte de enzimas para a seleção, foram utilizados três diferentes tipos de preparação: o extrato de 20 intestinos de *D. saccharalis* em 1mL de

água, 1mL da tripsina purificada deste inseto com concentração estimada em aproximadamente 1μg/mL em gel SDS-PAGE corado com Coomasie Blue (dados não mostrados) e 1mL de tripsina bovina (Sigma) na concentração de 200 μg/mL de tampão bicarbonato de sódio (50mM) pH 9.6. Como controle negativo foi utilizada uma solução de leite desnatado (20mg/mL de PBS).

As preparações contendo as enzimas assim como a solução de leite desnatado (controle negativo) foram adicionadas a imunotubos de poliestireno (Maxi Sorb 4070319/Nunc). Os imunotubos foram incubados por toda a noite à 4ºC para a imobilização das proteínas nas paredes dos tubos. Após 12 horas de incubação, as preparações foram descartadas e os tubos foram lavados 3 vezes com PBS. Em seguida os tubos foram bloqueados com PBS + 2% de leite desnatado por 2 horas à temperatura ambiente, lavados 3 vezes com PBS e incubados com 1mL de fago + 1mL de PBS + 2% de leite desnatado por 2 horas, à 37°C. As soluções de fago foram então descartadas e os imunotubos foram lavados 20 vezes com PBS + Tween 20 (0,1%) e 20 vezes com PBS. Acrescentou-se 1mL de células TG1 na fase log ($D.O._{600nm}$=0,3 a 0,4) aos tubos que foram incubados por 30 minutos à 37°C em banho Maria e 30 minutos à 37°C e 180 rpm. Foram feitas diluições das culturas (1:10, 1:100 e 1:1.000) e o restante das culturas foi plaqueado em meio SOB suplementado com ampicilina (100 μg/mL). As placas foram mantidas a 30°C por uma noite e guardadas à 4°C para posterior obtenção de fagos para o próximo ciclo de seleção.

Foram feitos diversos testes para a otimização da etapa de purificação dos fagos, dos tempos de incubação e das lavagens do processo de seleção. Os métodos descritos anteriormente foram os que produziram os melhores resultados para as três preparações enzimáticas utilizadas.

As etapas de amplificação, obtenção de fagos e seleção foram realizadas 5 vezes. Após os cinco ciclos de seleção, 100 colônias obtidas em cada uma das três preparações enzimáticas (extrato intestinal de *D. saccharalis*, tripsina purificada de *D. saccharalis* e tripsina bovina) e de cada biblioteca (tripsina e quimotripsina) foram isoladas. O DNA plasmidial destas colônias foi extraído e

seqüenciado para se determinar os variantes das bibliotecas que foram selecionados para cada preparação enzimática. Depois de obtidas, as seqüências foram analisadas quanto aos aminoácidos que apareceram nos sítios de mutação, assim como quanto ao número de ocorrência destes aminoácidos.

4 RESULTADOS

4.1 Alinhamento múltiplo das seqüências BBI

A família dos BBI está amplamente distribuída em plantas das famílias Fabaceae e Poaceae (Tabela 1). Tan e Stevens (1971) sugeriram que os BBI derivados de plantas provavelmente teriam evoluído de um inibidor ancestral de apenas uma alça, por duplicação gênica interna e subseqüentes mutações. Tais alterações teriam levado à diferenças na composição dos resíduos de aminoácidos dos dois sítos ativos e ao surgimento do inibidor de dupla alça que possui aproximadamente 100 resíduos e 14 cisteínas. Tendo como base tais informações, este trabalho propõe um esquema evolutivo que explica a origem e evolução destas proteínas (Figura 11).

As 101 seqüências utilizadas neste trabalho são altamente variáveis em tamanho. A menor seqüência utilizada foi a de *Vigna radiata* (JC1066) de 73 resíduos e a maior foi a de *Oryza sativa* (BAB40052) de 262 resíduos. Os dados sugerem que os inibidores de monocotiledôneas são maiores do que os inibidores de dicotiledôneas. O alinhamento das seqüências mostrou que os BBI de monocotiledôneas sofreram duplicações que deram origem a seis grupos distintos de inibidores (MI-I, MI-II, MI-III, MI-IV, MI-V e MI-VI). Tashiro e colaboradores (1987) sugeriram que estes eventos também ocorreram no inibidor de tripsina de arroz e Song e colaboradores (1999) observaram o mesmo para o inibidor Bowman-Birk de sementes de cevada.

Tabela 1. Espécies que apresentam BBI depositados em banco de dados.

Espécie	**Família**	**Designação**
Arachis hypogaea	Fabaceae	ARAHY
Canavalia lineata	Fabaceae	CANLI
Coix lacryma-jobi	Poaceae	COILA
Dioclea glabra	Fabaceae	DIOGL
Dipteryx alata	Fabaceae	DIPAL
Dolichos biflorus	Fabaceae	DOLBI
Dolichos lablab	Fabaceae	DOLLA
Erythrina variegata	Fabaceae	ERYVA
Glycine max	Fabaceae	SOYBN
Hordeum vulgare	Poaceae	HORVU
Lonchocarpus capassa	Fabaceae	LONCA
Macrotyloma axillare	Fabaceae	DOLAX
Medicago sativa	Fabaceae	MEDSA
Medicago scutellata	Fabaceae	MEDSC
Oryza sativa	Poaceae	ORYSA
Phaseolus lunatus	Fabaceae	PHALU
Phaseolus vulgaris	Fabaceae	PHAVU
Pisum sativum	Fabaceae	PEA
Saccharum officinarum	Poaceae	SACOF
Setaria italica	Poaceae	SETIT
Torresea acreana	Fabaceae	TORAC
Torresea cearensis	Fabaceae	TORCE
Triticum aestivum	Poaceae	WHEAT
Vicia faba	Fabaceae	VICFA
Vicia sativa subsp. Nigra	Fabaceae	VICAN
Vigna angularis	Fabaceae	PHAAN
Vigna mungo	Fabaceae	VIGMU
Vigna radiata	Fabaceae	PHAAU
Vigna unguiculata	Fabaceae	VIGUN
Zea mays	Poaceae	MAIZE

Este estudo demonstrou que os BBI de dicotiledôneas apresentam em torno de 104 resíduos. Duas exceções foram encontradas: o inibidor de *Vigna unguiculata* (S09415) com 146 resíduos e o inibidor de *Pisum sativum* (CAC24565) com 133 resíduos. A seqüência S09415 tem um N-terminal longo enquanto a seqüência CAC24565 tem uma extensão C-terminal que contribui para as diferenças em tamanho das seqüências. Todos os BBI de dicotiledôneas apresentam 14 cisteínas ligadas por pontes dissulfeto (C_1-C_{14}, C_2-C_6, C_3-C_{13}, C_4-C_5, C_7-C_9, C_8-C_{12}, C_{10}-C_{11}) e dois sítios de inibição formados por 7 aminoácidos delimitados por dois resíduos de cisteína (Figura 11).

No caso das monocotiledôneas, estas seqüências de BBI parecem ser menores, com tamanho em torno de 100 resíduos, embora no geral apresentem uma estrutura similar aos BBI encontrados em dicotiledôneas. Assumindo-se que as seqüências maiores de BBI (180 a 250 resíduos) surgiram de uma (Song et al., 1999) ou duas duplicações da região que contém as cisteínas (Figura 11), as mudanças que ocorreram na composição de aminoácidos dos seus sítios ativos (Tabelas 2 e 3), incluem as mudanças chave que causaram diferenças funcionais que por sua vez provavelmente resultaram em divergências em seus papéis biológicos. O primeiro sítio reativo dos BBI de mono e dicotiledôneas inibe, na maior parte dos casos, tripsinas (Tabela 2). Embora o segundo sítio ativo dos BBI de dicotiledôneas apresente uma variação muito maior nas posições P_2, P_1, P_4' e P_5' do que o primeiro sítio, este pode inibir somente tripsinas e quimotripsinas (Tabela 3). Por outro lado, em monocotiledôneas, o segundo sítio inibitório apresenta variações tanto na composição de aminoácidos como no número de aminoácidos que o compõe e, ainda há necessidade de se estabelecer se este sítio tem a capacidade de inibir de forma eficiente uma serino proteinase (Tabela 3).

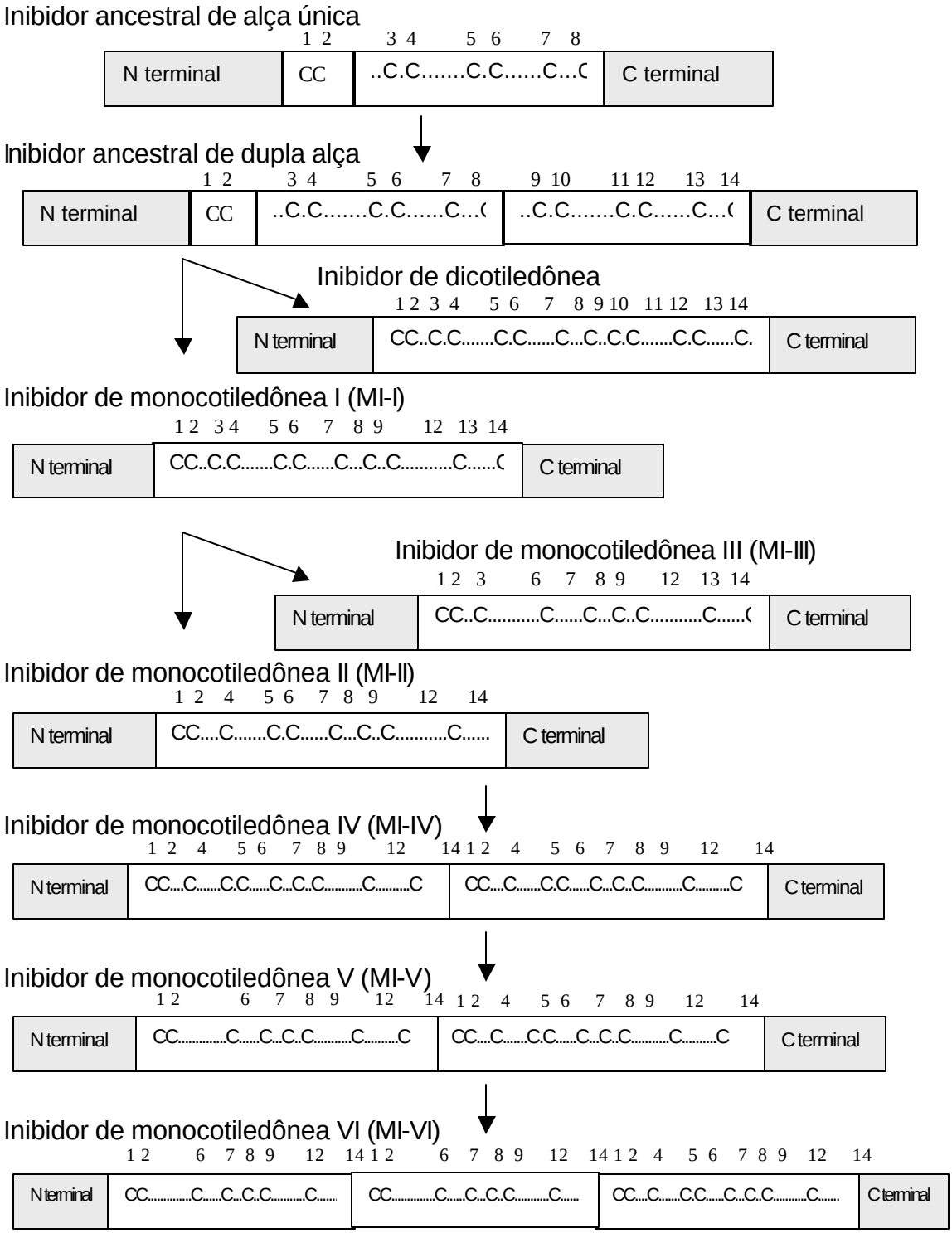

Figura 11 – Esquema evolutivo proposto para os BBI de plantas. As cisteínas estão numeradas de acordo com a ordem em que aparecem.

Tabela 2. Seqüência consenso da primeira alça de inibição dos BBI estudados. WI indica os BBI induzidos por ferimento e X representa qualquer um dos 20 aminoácidos.

Primeira alça de inibição	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P6'
Dicot	C	T	K/R/A	S	X	P	P	X	C
Dicot (*Arachis*)	C	D	R	R	A	P	P	Y	F
Monocot	C	T/N/S/Y	K/R	K/M/S/D	X	P/I	P/R/A	X	C
Monocot (WI)	C	T/N	F	S	F	S	G	L/V	Y

Tabela 3. Seqüência consenso da segunda alça de inibição dos BBI estudados. WI indica os BBI induzidos por ferimento e X representa qualquer um dos 20 aminoácidos.

Segunda alça de inibição	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P6'
Dicot	C	T/A/N/R/S	R/H/L/Y/F/K	S	X	P	P/A/G	Q/K/M/L	C
Dicot (*Arachis*)	C	T	R	S	N/I	P	P	Q	C
Monocot	Q/P/R/K	T/S/V	X	S/D/G/L	X	P	P	V/Q/R	F/Y/R
Monocot (WI)	A/V/P	A/V	Q/K/V/S	T/S	Y/H/D	S/P/K	G/V	K/W/T	M/K/R

4.2 Comparação das seqüências BBI de cana-de-açúcar

Neste trabalho foram utilizadas 14 seqüências de proteínas de cana-de-açúcar do banco de dados SUCEST que alinharam com BBI conhecidos, as quais foram classificadas em 6 subgrupos de acordo com sua composição e similaridade em aminoácidos (Figura 12). Todas as 14 seqüências

apresentavam motivos bastante característicos como por exemplo a presença de uma primeira alça de inibição composta de 7 a 9 resíduos de aminoácidos formada por uma ponte dissulfeto estabelecida entre duas cisteínas (Cys) e que provavelmente inibe tripsina ou quimotripsina. Também foram observados resíduos de cisteína em posições específicas ao longo da seqüência das proteínas.

4.3 Filogenia dos BBI de plantas superiores

A Figura 13 apresenta uma árvore filogenética não enraizada que mostra a relação entre as seqüências estudadas de BBI de plantas. Quando foram utilizadas as 101 seqüências obtidas nos bancos de dados, obteve-se uma árvore filogenética com valores de "bootstrap" baixos, porém quando foram utilizadas apenas 48 seqüências completas deste inibidor, os valores de "bootstrap" mostraram-se altamente confiáveis (Figura 14). Como esperado, o fato da maioria das seqüências de BBI recuperadas dos bancos de dados serem compostas por seqüências truncadas ou parciais contribuiu para a obtenção de valores de "bootstrap" baixos e distâncias relativamente grandes.

Por meio da matriz de Gonnet e do método de "Neighbor-Joining", foi possível definir dois grandes ramos das árvores que mostravam uma separação bastante clara: um composto por BBI de monocotiledôneas e outro composto por BBI de dicotiledôneas (Figura 13). Valores de "bootstrap" iguais a 100 separam estes inibidores, dando suporte à proposta feita por Prakash e colaboradores (1996) de que os BBI de monocotiledôneas deveriam ser estudados como uma classe distinta dentro da família dos BBI. Essa separação pode ser justificada pelo processo evolutivo ocorrido com os inibidores de monocotiledôneas que será discutido a seguir.

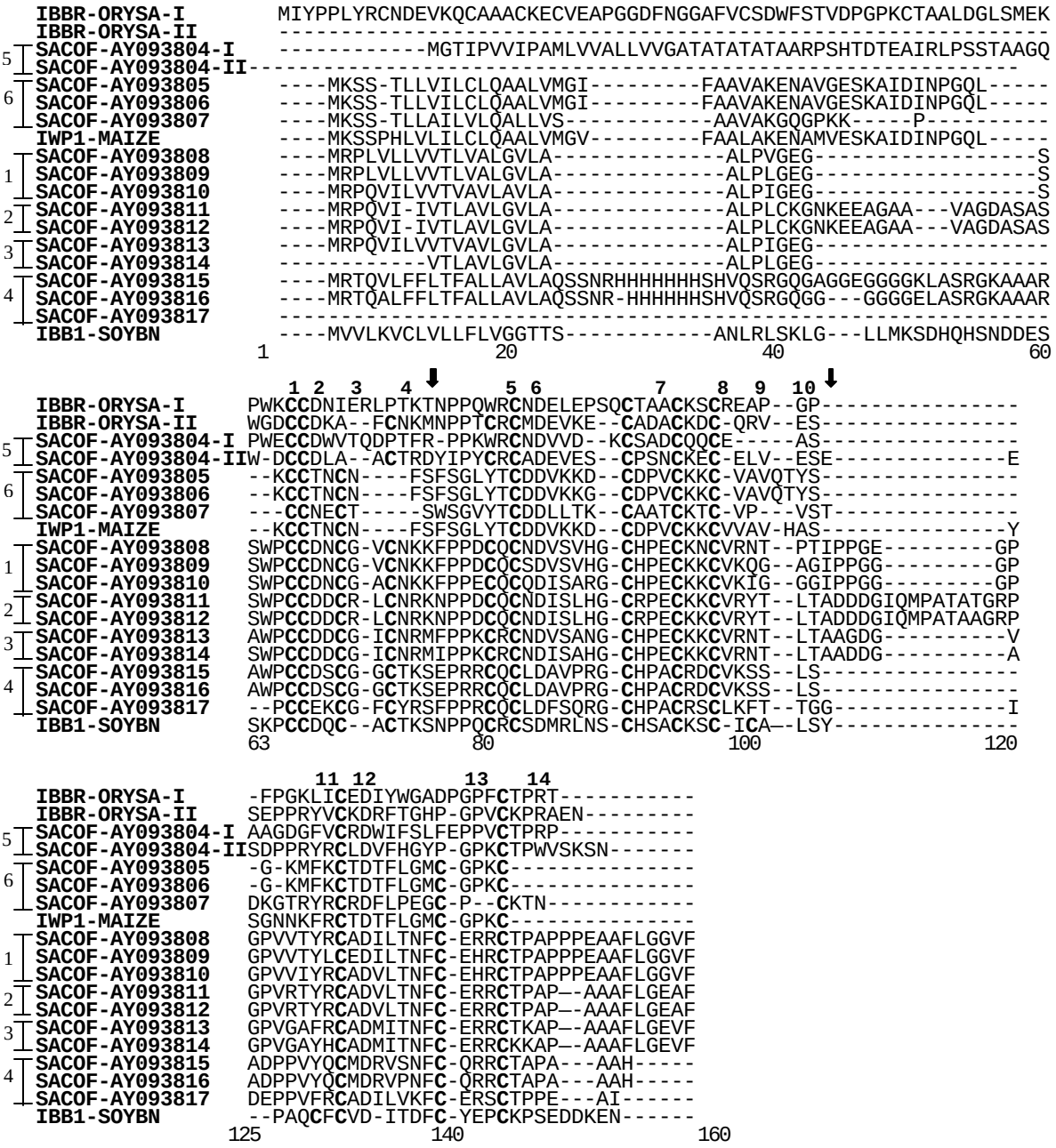

Figura 12 – Seqüências de BBI putativos de cana-de-açúcar (SACOF-AY093804 a AY093817), soja (IBB1-P01055), arroz (IBBR-P07084) e milho (IWP1-P31862). I e II representam a primeira e a segunda cópia das duplicações gênicas. As cisteínas que participam da formação das pontes dissulfeto estão em negrito e numeradas. As setas indicam os sítios reativos putativos.

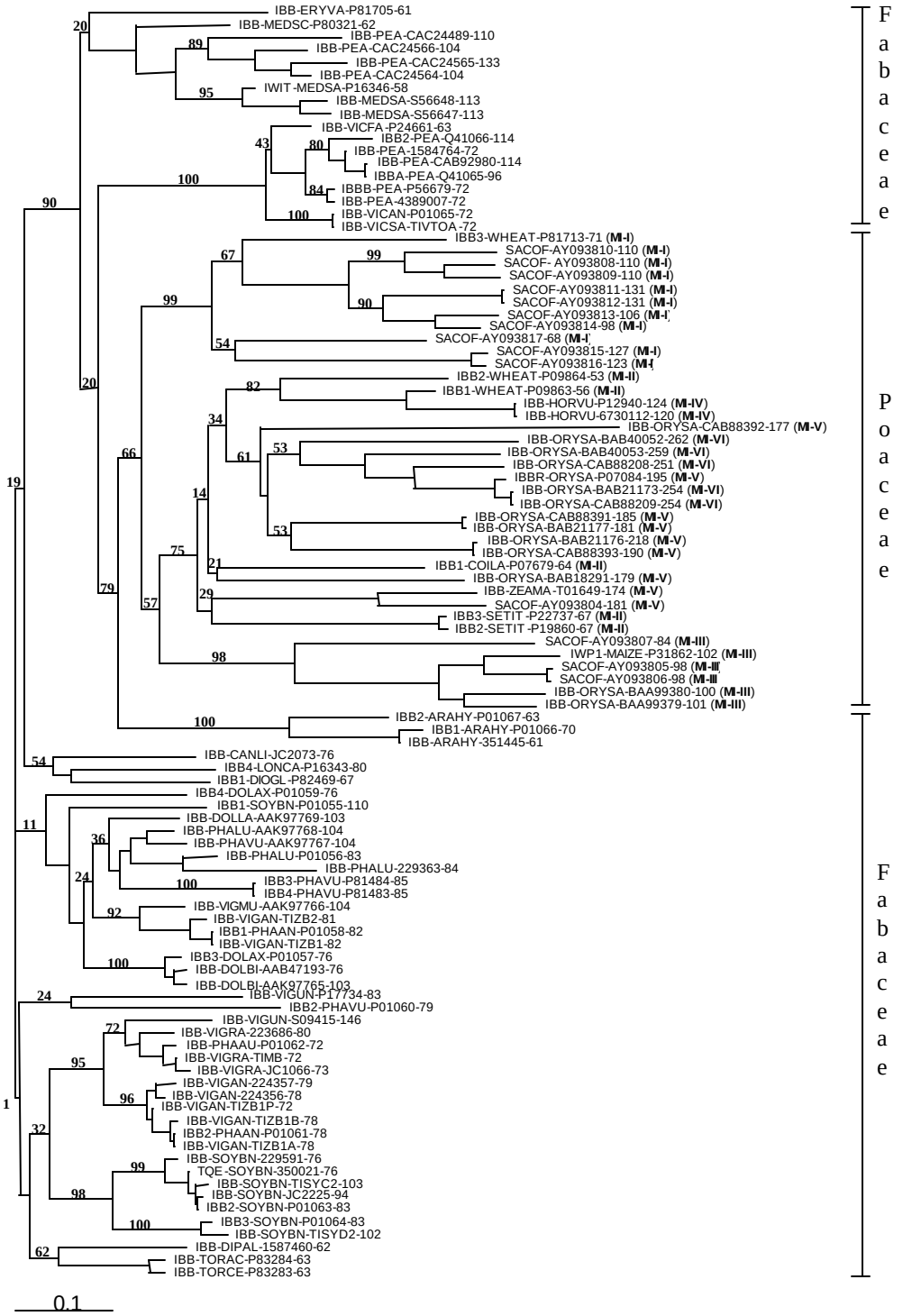

Figura 13 – Árvore filogenética dos BBI. Cada designação de inibidor está seguida pelo número de acesso do "GenBank" e número de aminoácidos. Números em negrito representam os valores de "bootstrap".

Neste trabalho foi observado que os BBI de monocotiledôneas podem ser separados em três ramos distintos em ambas as árvores filogenéticas obtidas (Figuras 13 e 14). O primeiro ramo compreende seqüências de BBI putativos de cana-de-açúcar que estão relacionados com o inibidor de trigo IBB3, sendo o valor de “bootstrap” para este ramo de 99 e 100 para ambas as árvores. O segundo ramo contém BBI de cana-de-açúcar, arroz e milho, os quais apresentam características de glicoproteínas secretadas, sendo os valores de “bootstrap” para este ramos de 98 e 100. O terceiro ramo reúne todos os outros inibidores de monocotiledôneas que apresentam uma, duas ou três duplicações dos domínios, sendo os valores de “bootstrap” para este ramo de 75 e 100.

As análises aqui apresentadas mostram que os BBI de dicotiledôneas são bastante relacionados embora três ramos secundários possam ser distinguidos (Figura 14). Com exceção do inibidor IBB1 que pode ser considerado como um grupo externo, todos os inibidores de soja foram agrupados em um ramo secundário distinto. É interessante notar que os BBI de amendoim constituem um outro ramo secundário distinto com três subdivisões, estando próximos aos inibidores de monocotiledôneas. Norioka e Ikenaka (1983) destacam que os BBI de amendoim apresentam diferenças importantes quando comparados com os outros inibidores de dicotiledôneas, incluindo mudanças no primeiro sítio reativo. Desta forma parece que estes inibidores podem ser considerados como intermediários entre inibidores de monocotiledôneas e dicotiledôneas.

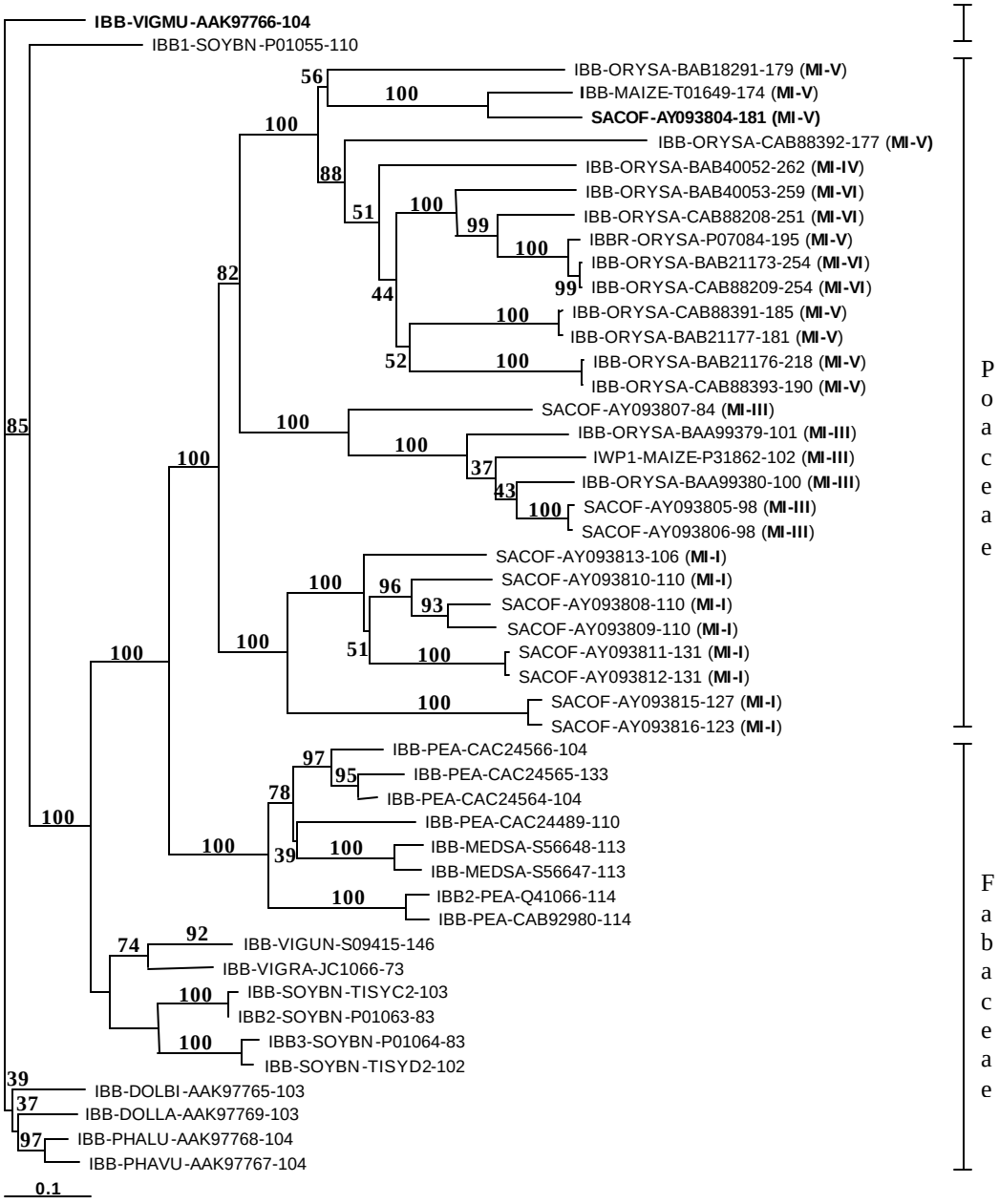

Figura 14 – Árvore filogenética das seqüências completas dos BBI. Cada designação de inibidor está seguida pelo número de acesso do "GenBank" e número de aminoácidos. Números em negrito representam os valores de "bootstrap".

4.4 Análise de expressão dos BBI de plantas superiores assistida por computador

Até 1993, acreditava-se que os inibidores da família dos Bowman-Birk eram expressos somente em sementes (Odani & Ikenaka, 1978a,b; Odani et al., 1986; Tashiro et al., 1990), porém, hoje tem sido mostrado que esta classe de inibidores se expressa também em folhas e colmos (Rohrmeier & Lehle 1993; Rakwal et al. 2001). Neste estudo, foi investigada a expressão de 14 BBI putativos de cana-de-açúcar por meio de estudos assistidos por computador (Figura 15). Os 14 inibidores putativos foram classificados em 6 diferentes grupos de acordo com sua composição em aminoácidos (Figura 12). Todos os tecidos analisados apresentaram diferentes níveis de expressão gênica e, embora o padrão de expressão seja qualitativa e quantitativamente variável, os mais altos níveis de expressão foram observados nos tecidos relacionados com o crescimento e reprodução tais como o meristema apical, o palmito, as flores e as sementes.

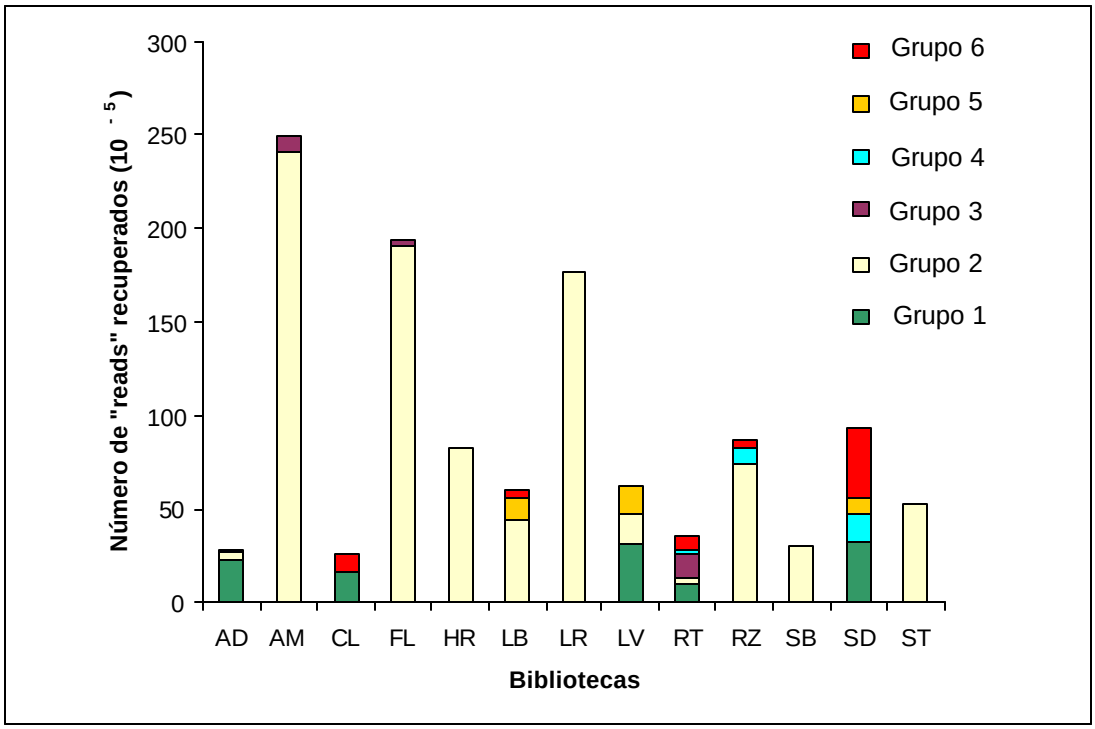

Figura 15 - Análise de expressão assistida por computador dos BBI de cana-de-açúcar de bibliotecas de cDNA de diferentes tecidos. Abreviações das bibliotecas: AD, plântulas *in vitro* sem folhas e raízes desenvolvidas infectadas com *Acetobacter diazotroficans*; AM, meristema apical; CL, calos submetidos a estresse de luz e temperatura (4°C e 37°C); FL, flores; HR, plântulas *in vitro* sem folhas e raízes desenvolvidas infectadas com *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; LB, gema lateral; LR, palmito; LV, folhas; RT, raiz; RZ, zona de transição folha/raiz; SB, bainha; SD, sementes; ST, colmo. Conjunto de agrupamentos de seqüências expressas: 1- AY093808, AY093809, AY093810, 2- AY093811, AY093812, 3- AY093813, AY093814, 4- AY093815, AY093816, AY093817, 5- AY093804, 6- AY093805, AY093806, AY093807.

4.5 Construção das bibliotecas de inibidores de proteinases

O inibidor IBB-1 (P01055) da soja foi dividido em dois diferentes inibidores: um contendo a primeira alça de inibição do IBB-1, chamado TRI, o qual inibe tripsina e outro contendo a segunda alça de inibição do IBB-1, chamado QUI, o qual inibe quimotripsina. Os genes TRI e QUI foram amplificados e ligados ao vetor pCANTAB-5E. Bactérias *E.coli* TG1 foram transformadas e após seqüenciamento foi confirmada a inserção correta dos genes TRI e QUI. Estas construções permitem a expressão dos inibidores de tripsina (TRI) e quimotripsina (QUI) como fusão da proteína 3 (pIII) do capsídeo do fago filamentoso. Testes de ELISA ("Enzyme-linked immunosorbent assay") utilizando tripsina e quimotripsina bovina (Sigma) imobilizadas mostraram que estes inibidores haviam sido expressos de forma correta na superfície das partículas virais (Galgaro, op. cit., p.26).

Os fagomídeos pCANTAB-TRI (Figura 5) e pCANTAB-QUI (Figura 6) foram usados para a construção das bibliotecas de inibidores com mutações do sítio ativo nas posições P_2, P_1, P_1' e P_2' para o inibidor TRI e P_2, P_1, P_2' e P_4' para o inibidor QUI. Os fragmentos de dupla fita mutados por PCR (oligonucleotídeos degenerados) foram ligados aos genes TRI e QUI e foram produzidos fagomídeos e, posteriormente, fagos. O título da biblioteca de tripsina foi de $3{,}98 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias (cfu) e o da biblioteca de quimotripsina foi de $4{,}65 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias (cfu). Algumas colônias das bibliotecas foram selecionadas e foi feita a análise para confirmar a correta inserção das mutações por amplificação em PCR. Os fragmentos amplificados (Figura 16) confirmaram a inserção correta dos fragmentos de dupla fita mutados por PCR. Em seguida, trinta colônias foram aleatoriamente isoladas e seqüenciadas, confirmando a correta inserção dos fragmentos mutados e a degenerescência nas posições desejadas (dados não mostrados). Além disto, todas as 30 seqüências obtidas eram diferentes e nenhuma delas correspondia a seqüência original, o que atesta a correta

construção das bibliotecas assim como a sua confiabilidade. Porém, observou-se que aproximadamente 45% da biblioteca de quimotripsina e 10% da biblioteca de tripsina eram compostas por fagomídeos que continham três insertos (inserção de três fragmentos degenerados). Resultados das seleções mostram que este fato não influenciou o processo de seleção e obtenção de novos inibidores.

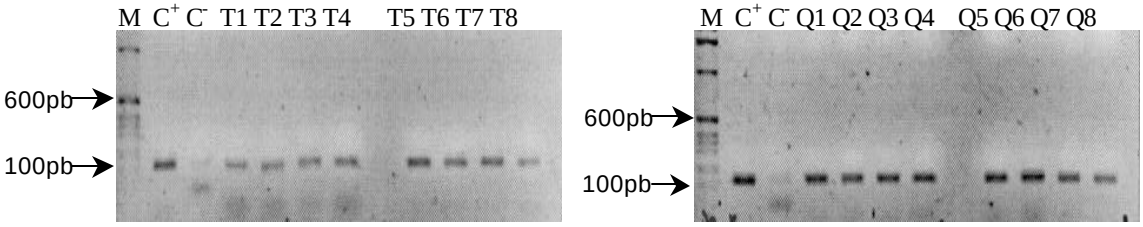

Figura 16 – Análise dos transformantes via PCR mostrando a correta inserção dos fragmentos TRI-NNB (T1 a T8) e QUI-NNB (Q1 a Q8) nos vetores pCANTB-TRI e pCANTAB-QUI, respectivamente. M= marcador 100pb, C^+= controle positivo, C^-= controle negativo.

As bibliotecas foram amplificadas para $7x10^{13}$ cfu/mL e usadas para identificar variantes que se ligam às tripsinas bovinas e de *Diatraea saccharalis* e às enzimas presentes no extrato intestinal bruto de lagartas desta praga de cana-de-açúcar.

4.6 Seleção das bibliotecas de inibidores

Os fagos recombinantes expressando a proteína 3 (pIII) fusionada ao conjunto de variantes dos inibidores de tripsina e quimotripsina foram imobilizados nos imunotubos cobertos com as tripsinas bovinas e de *D. saccharalis* e enzimas presentes no extrato intestinal bruto de lagartas desta

espécie. Após várias lavagens, os fagos expressando seqüências que melhor interagiam com os substratos foram recuperados por infecção em *E. coli*. As seqüências recuperadas foram amplificadas, novos fagos foram produzidos e utilizados em novo ciclo de seleção. Cada ciclo de seleção foi monitorado por titulação dos fagos (diluição e plaqueamento em meio SOB + ampicilina) para se determinar o enriquecimento obtido. Após cinco ciclos de seleção cem colônias selecionadas foram isoladas e seqüenciadas de cada uma das preparações enzimáticas das diferentes bibliotecas. A análise de aproximadamente 600 seqüências possibilitou a determinação de inibidores específicos para cada preparação enzimática utilizada. Os aminoácidos encontrados para cada posição mutada e selecionados nos diferentes substratos estão representados nas Tabelas 4 e 5. Ao final, o enriquecimento observado foi de 4 a 10 vezes.

A partir das seqüências obtidas, foram escolhidas aquelas que apareceram mais de uma vez para serem analisadas quanto a composição dos aminoácidos nas posições mutadas. Estas seqüências assim como a freqüência com que elas foram obtidas, podem ser visualizadas nas Figuras 17 e 18.

É interessante destacar que de todas as seqüências selecionadas que possuem uma glutamina (Q) em qualquer das posições mutadas, com exceção da seqüência “CRQSAPCQW”, este amino ácido é sempre codificado pelo códon TAG (códon de terminação) que nas cepas de *E. coli* TG1 (supE) é suprimido e traduzido em glutamina. Outro dado que deve ser destacado é que embora nas bibliotecas haja uma freqüência de fagomídeos com três insertos degenerados, os fagos contendo estas seqüências foram raramente recuperados após os 5 ciclos de seleção.

Tabela 4. Resíduos P_2, P_1, P_1', P_2' obtidos após 5 etapas de seleção da biblioteca de expressão na superfície de fagos filamentosos do inibidor de tripsina (TRI) contra os substratos tripsina bovina (TB), tripsina de *D. saccharalis* (TP) e proteínas presentes no extrato intestinal bruto de lagartas de *D. saccharalis* (EI).

substrato	P_2	P_1	P_1'	P_2'
TB	72T, 9Q, 4L, 3A, 2D, 1V, 1R, 1G	74K, 10R, 2V, 1D, 1T, 1L, 1Q, 1S, 1W, 1P	76S, 4Q, 3R, 3Y, 2G, 1I, 1A, 1L, 1T, 1D	73N, 4I, 3T, 2R, 2G, 2F, 1Q, 1V, 1D, 1S, 1E, 1Y, 1^A
TP	35T, 15G, 7Q, 5D, 3S, 3A, 3Y, 2E, 2C, 1R, 1L, 1K	29K, 12L, 12P, 6A, 3Q, 3S, 3E, 2R, 2V, 2W, 1V, 1T, 1Y, 1M	31S, 14A, 12R, 7G, 5E, 4K, 2V, 1C, 1T, 1H	29N, 14G, 12D, 10Q, 4A, 3S, 2V, 1H, 1I, 1E, 1L
EI	19Q, 14T, 8Y, 7S, 6D, 4G, 3M, 2K, 2V, 1W, 1H, 1L, 1C, 1A, 1P, 1E	13K, 13Q, 8S, 7Y, 6R, 5G, 4H, 3W, 3V, 3P, 2E, 2L, 1F, 1A, 1N	22S, 9R, 8A, 5Q, 5W, 4V, 4T, 4G, 4K, 2Y, 2N, 1H, 1F, 1L	15N, 12Q, 10G, 10S, 5A, 4D, 3Y, 3F, 2H, 2R, 2E, 2T, 1I, 1V

Tabela 5. Resíduos P_2, P_1, P_2' e P_4' obtidos após 5 etapas de seleção das bibliotecas de expressão na superfície de fagos filamentosos do inibidor de quimotripsina (QUI) contra os substratos tripsina bovina (TB), tripsina de *D. saccharalis* (TP) e proteínas presentes no extrato intestinal bruto de lagartas de *D. saccharalis* (EI).

substrato	P_2	P_1	P_2'	P_4'
TB	17Q, 17R, 16L, 9S, 8T, 5A, 5Y, 5V, 5G, 4D, 4F, 2I, 1C, 1M, 1P	29Q, 22R, 10A, 7S, 5Y, 5G, 5W, 3D, 2T, 2M, 2C, 2F, 2K, 2L	26Q, 20R, 9I, 6Y, 6G, 5W, 3P, 3A, 3L, 3S, 3V, 2N, 2K, 2F, 1H, 1T, 1C, 1D, 1E, 1M	12Q, 12S, 11H, 10P, 10R, 8W, 7G, 6D, 4A, 3Y, 3T, 3F, 2N, 2E, 2L, 2C, 1V, 1I
TP	27R, 23Q, 9L 9A, 8S, 6G, 4F, 3V, 2P, 2K, 1W, 1D, 1N, 1C	33Q, 23R, 8A, 7L, 6S, 4P, 3T, 3G, 2I, 2Y, 2V, 1F, 1N, 1D, 1E	24Q, 20R, 15A, 9G, 8W, 4S, 3V, 3L, 2C, 2Y, 2N, 1P, 1T, 1I, 1H, 1F	14R, 13C, 12G, 12Q, 10W, 5H, 4S, 4T, 4F, 4A, 3P, 3D, 2Y, 2L, 1I, 1E, 1M, 1V, 1N
EI	29R, 19Q, 10G, 7L, 5A, 5S, 3K, 3W, 3T, 2E, 1I, 1P, 1F, 1H, 1N, 1Y, 1V	48Q, 13R, 5L, 4A, 4Y, 4S, 3C, 3H, 2P, 2G, 1V, 1M, 1E, 1D, 1F	22A, 13G, 12Q, 7W, 6F, 5L, 5R, 5S, 4V, 3Y, 3T, 3H, 2E, 1K, 1P, 1N	20C, 12R, 10G, 8Q, 8S, 5W, 5I, 4T, 4D, 3A, 3K, 3L, 2F, 2H, 1P, 1M, 1Y, 1V

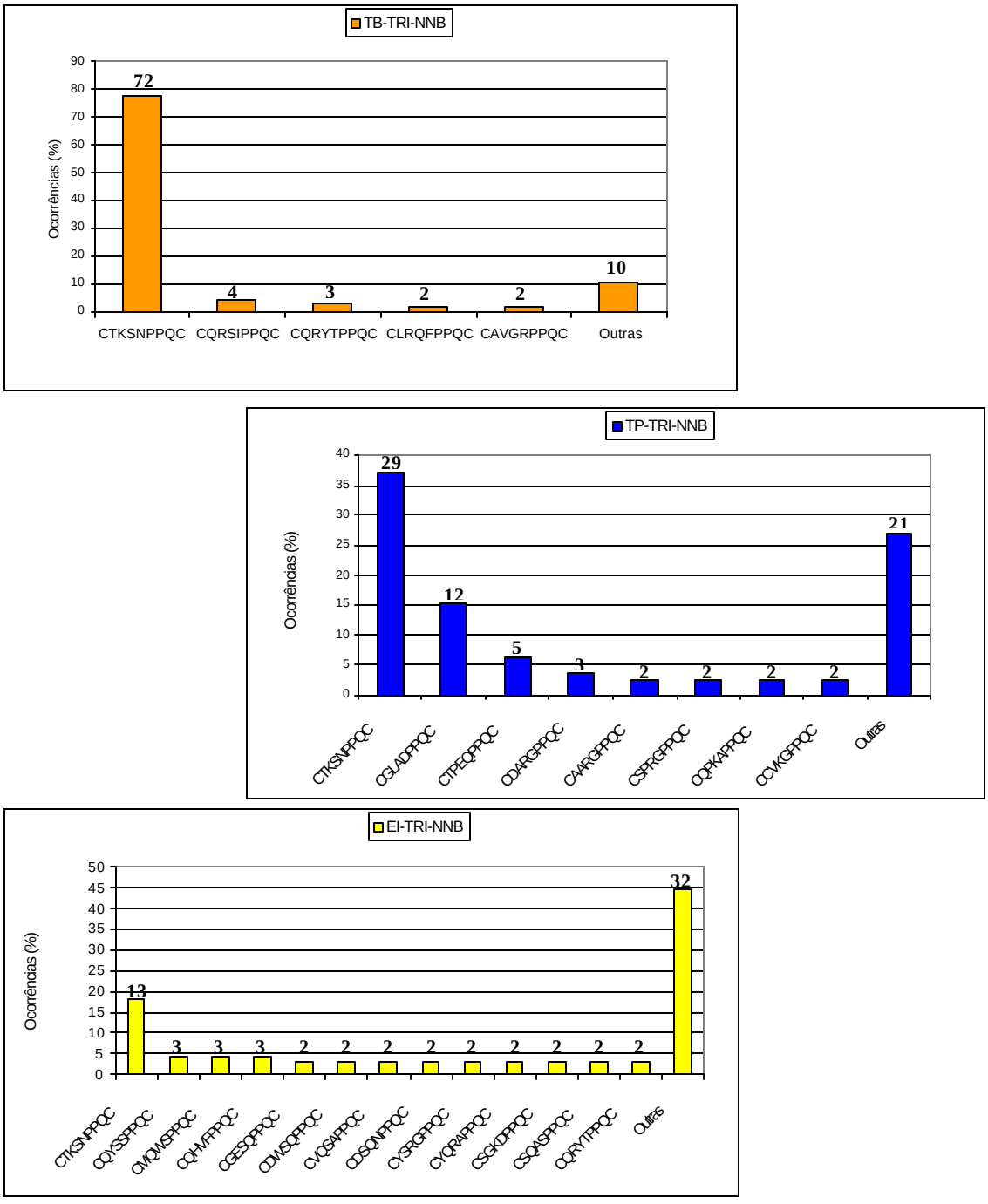

Figura 17 – Porcentagem de ocorrência das seqüências selecionadas da biblioteca de tripsina (TRI) contra a tripsina bovina (TB), a tripsina purificada (TP) e o extrato intestinal bruto (EI) de lagartas de *D. saccharalis*.

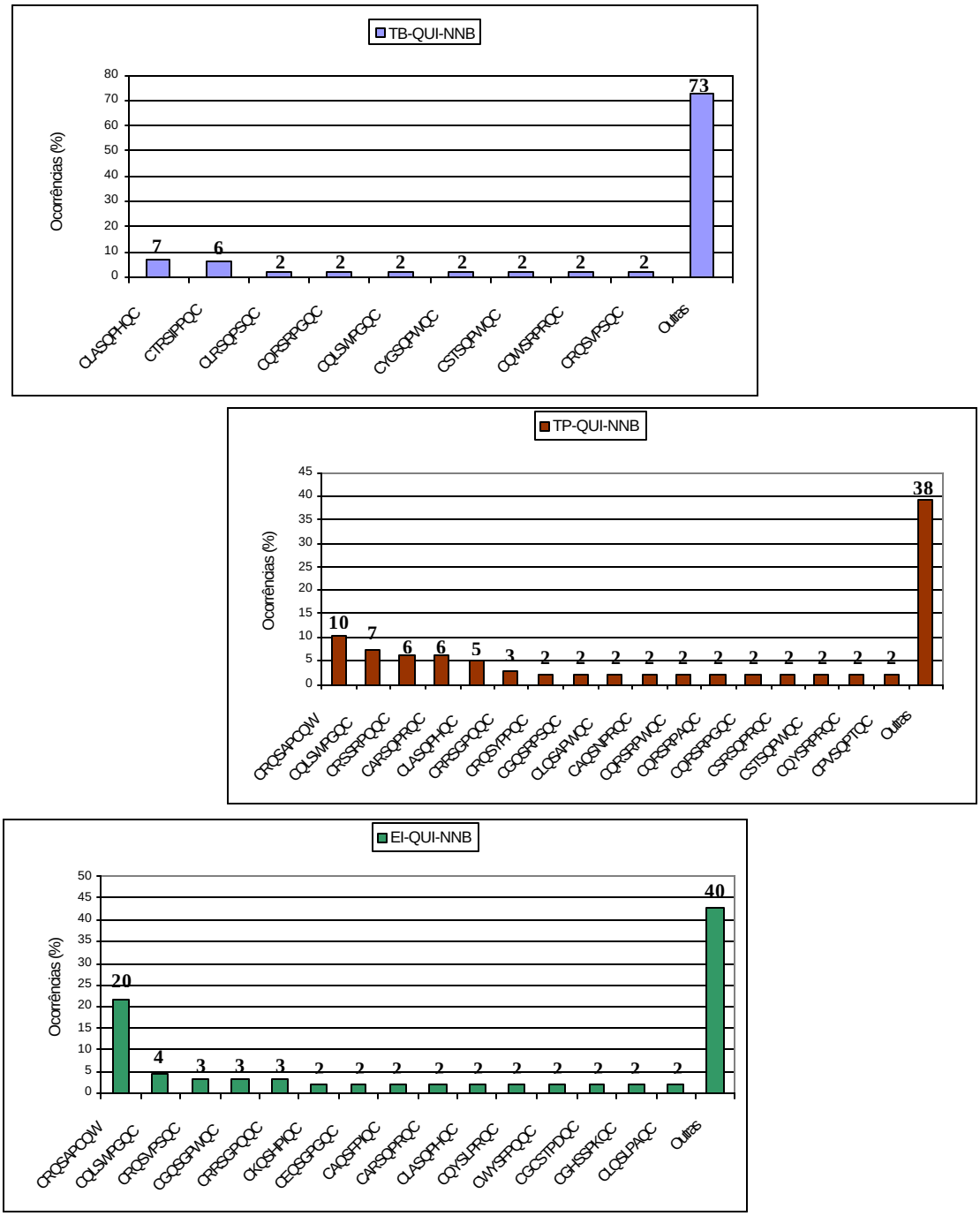

Figura 18 – Porcentagem de ocorrência das seqüências selecionadas da biblioteca de quimotripsina (QUI) contra a tripsina bovina (TB), a tripsina purificada (TP) e o extrato intestinal bruto (EI) de lagartas de *D. saccharalis*.

5 DISCUSSÃO

5.1 Evolução molecular dos BBI em plantas superiores

Embora a composição em aminoácidos dos BBI tenha modificado durante a evolução, os resíduos de cisteína destas moléculas são altamente conservados, sugerindo que os diferentes BBI conservaram funções similares. Os resultados mostram que os inibidores de dicotiledôneas são compostos por 14 cisteínas que formam 7 pontes dissulfeto. Os BBI de monocotiledôneas também conservaram os resíduos de cisteína, embora haja uma variação em seu número inclusive em um mesmo gênero, podendo estes resíduos chegarem ao número de 10 a 26, formando 5 a 13 pontes dissulfeto. Estas dissimilaridades não refletem diferenças na função e sim sugerem duplicações de seqüências conservadas sem que isto interfira nas propriedades do inibidor.

Evidências indicam que os BBI de monocotiledôneas que apresentam 100 aminoácidos perderam 2 ou 4 resíduos de cisteína. Quando dois resíduos são perdidos, é muito provável que estes sejam os resíduos 10 e 11 como no caso da cana-de-açúcar (Figura 11; MI-I) e do trigo (Poerio et al., 1994). A ausência de quatro cisteínas implica que os resíduos 3, 10, 11 e 13 (Figura 11; MI-II) ou os resíduos 4, 5, 10 e 11 foram perdidos (Fig. 1; MI-III), embora Rohrmeier e Lehle (1993) tenham mostrado que o inibidor de milho WIP1 perdeu a Cys-3 ao invés da Cys-4. Isto se deve provavelmente a uma má interpretação dos resultados do programa FASTA em decorrência do número reduzido de seqüências analisadas (5) que interfere no alinhamento das seqüências. Os resultados indicam que os BBI que perderam 4 cisteínas

evoluíram a partir dos inibidores pertencentes ao grupo dos MI-I. Estes posteriormente foram separados em dois grupos distintos: MI-II (Figura 11) encontrado em várias espécies como o trigo, arroz e setária (Tashiro et al., 1990; Nagasue et al., 1988) e MI-III encontrado em cana-de-açúcar, arroz e milho (Figura 11). Os inibidores do grupo MI-III têm como características marcantes a presença de uma seqüência de 15 aminoácidos hidrofóbicos e um sítio de glicosilação potencial (NFS), o que indica que os BBI deste grupo podem ser glicoproteínas secretadas (Rohrmeier & Lehle, 1993).

Analisando-se os BBI de monocotiledôneas com 180 resíduos, é possível distinguir duas regiões internas similares (Figura 11; MI-IV e MI-V). Isto é um indicativo de que estes inibidores surgiram de uma duplicação interna gênica dos BBI MI-II. O padrão descrito para o MI-IV foi observado apenas em uma EST consenso de cevada, enquanto que o padrão descrito para o grupo MI-V foi observado em cana-de-açúcar, arroz e milho. O inibidor do tipo MI-IV perdeu 4 cisteínas (resíduos 3, 10, 11 e 13) em ambas as regiões duplicadas enquanto que os inibidores do tipo MI-V perderam estes mesmos resíduos em um domínio e no segundo domínio perderam seis cisteínas, correspondendo aos resíduos 3, 4, 5, 10, 11 e 13. Estas observações indicam que em cevada ocorreu um evento de duplicação a partir de inibidores do grupo MI-II enquanto que nas outras espécies mencionadas, a duplicação foi seguida por um outro tipo de mudança (deleção, inserção e/ou mutação) que levou a perda de outras duas cisteínas. Estas observações vêm corroborar com a teoria apresentada por Li em 1997 a qual estabelece que eventos de duplicação gênica seriam os maiores responsáveis pela evolução molecular.

As duas árvores filogenéticas obtidas dão suporte a esta hipótese (Figuras 13 e 14). Elas mostram que os inibidores MI-I estão agrupados em um primeiro ramo da árvore, do qual derivam os outros inibidores. No segundo ramo uma separação clara pode ser observada. Deste segundo ramo partem o terceiro ramo (que agrupa os inibidores MI-III) e o quarto ramo (que mostra o inibidor MI-II dando origem aos inibidores do tipo MI-IV, MI-V e MI-VI). Observa-

se que os BBI de arroz do grupo MI-VI são inibidores maiores com cerca de 250 resíduos de aminoácidos e uma duplicação adicional que provavelmente evoluíram dos inibidores do grupo MI-V. Portanto, estes inibidores (MI-VI) são caracterizados por possuírem três duplicações em tandem, sendo que as duas primeiras regiões duplicadas perderam as cisteínas 3, 4, 5, 10, 11 e 13, enquanto a terceira região apresenta perda dos resíduos 3, 10, 11 e 13 (Figura 11; MI-VI).

As monocotiledôneas cana-de-açúcar e arroz possuem vários tipos de BBI. Em cana-de-açúcar encontram-se os tipos I, III e V enquanto que em arroz encontram-se os inibidores do grupo I, II, V e VI. O mapa cromossômico de arroz mostra que todos estes inibidores estão localizados no cromossomo 1, indicando que o gene BBI original foi inteiramente duplicado antes que os eventos de duplicação interna, deleção, inserção e/ou mutação ocorressem.

É interessante notar que o padrão de evolução dos BBI em monocotiledôneas e dicotiledôneas é diferente, especialmente em relação aos eventos de duplicação. A razão destas diferenças ainda é desconhecida, embora algumas tentativas com intuito de explicar este mecanismo tenham sido feitas. Tashiro e colaboradores (1987) sugerem que as moléculas duplicadas seriam constituídas por seqüências repetidas em tandem que poderiam ser hidrolizadas por proteinases dando origem a diferentes tipos de BBI, como observado com os inibidores ovomucóides de aves. Tiffin e Gaut (2001) postularam que a atividade inibitória do segundo sítio ativo é raramente observada nos domínios duplicados (inferências sobre a perda da atividade da segunda alça durante a evolução foram feitas por Tashiro et al., 1990), mas experimentos de estrutura e inibição são necessários para se determinar a função desempenhada por eles. A perda das cisteínas 4 e 5 assim como dos resíduos 10 e 11, que são responsáveis pela formação das alças contendo os sítios de inibição, não indicam necessariamente a perda de função dos inibidores já que BBI ativos induzidos por ferimento podem não apresentar estes resíduos de cisteína (Rohrmeier & Lehle, 1993).

A função biológica desempenhada pelos BBI de mono e dicotiledôneas também parece ser diferente. A análise da alça de inibição mostra que a maioria dos BBI de dicotiledôneas apresenta 7 resíduos de aminoácidos compondo a alça. Porém, em amendoim ocorreu uma inserção de dois aminoácidos na primeira alça de inibição e uma mudança na posição de ligação do peptídeo de R/K/A-S para R-R (Tabela 2). Estas diferenças indicam que os BBI de amendoim podem ser considerados um subgrupo dos inibidores de dicotiledôneas. Por outro lado, as alças de inibição dos BBI de monocotiledôneas são extremamente variáveis. Isto se deve ao fato de que os resíduos de cisteínas que são responsáveis pela formação das alças foram perdidos. Além disto, todos os tipos de BBI de monocotiledôneas mostrados na Figura 11 perderam duas cisteínas ou múltiplos de 2. Quando os resíduos perdidos foram analisados, foi observado que em todos os casos as cisteínas perdidas correspondiam aquelas que se ligavam por pontes dissulfeto. A estrutura tridimensional dos inibidores de amendoim, soja e cevada (Suzuki et al., 1987; Werner & Wemmer, 1992; Song et al., 1999) mostram que os resíduos 1 e 14, 2 e 6, 3 e 13, 4 e 5, 7 e 9, 8 e 12, 10 e 11, são responsáveis pela formação de 7 pontes dissulfeto. Desta maneira, pode-se inferir que quando uma cisteína é perdida, o outro resíduo que forma com ela a ponte dissulfeto perde sua função estrutural e, então, pode também ser perdido sem que haja prejuízos adicionais.

A análise da expressão dos BBI de cana-de-açúcar utilizando ferramentas da bioinformática revelaram pela primeira vez que esta classe de inibidores se expressam em todos os tecidos das plantas. Esta observação sugere que os genes que codificam os BBI são necessários para regular a degradação de proteínas em diferentes tipos de células e para proteger os tecidos de plantas contra o ataque de patógenos e insetos embora eles possam desempenhar outras funções importantes para o desenvolvimento das plantas. Outra observação interessante foi a expressão elevada do grupo 2 dos BBI de cana-de-açúcar em todos os tecidos estudados, exceto em calos e raiz. A

expressão deste grupo foi consideravelmente mais elevada do que a expressão dos demais o que indica que provavelmente estes inibidores tenham uma função importante no desenvolvimento e proteção da cana-de-açúcar contra o ataque de patógenos e pragas.

É interessante ressaltar que os BBI foram identificados em membros das famílias Poaceae e Fabaceae. Os resultados da pesquisa nos bancos de dados para se encontrar seqüências homólogas a BBI revelaram que estes genes foram aparentemente perdidos durante o processo de evolução na maior parte dos gêneros de plantas. Qual seria a explicação para a ausência de BBI na grande parte das espécies de plantas? Uma explicação plausível é que outras proteínas com função similar estariam desempenhando o papel dos BBI no controle da proteólise. Portanto uma hipótese seria que Poaceae e Fabaceae mantiveram as seqüências de BBI enquanto que em outras famílias um conjunto de outras proteínas estariam desempenhando funções similares. A avaliação precisa da função dos BBI em células de plantas certamente auxiliaria no entendimento do padrão evolutivo deste grupo de proteínas.

Este panorama do processo evolutivo dos genes dos BBI traz questões intrigantes em relação às funções biológicas dos sítios ativos que perderam seus resíduos de cisteína. Estudos de inibição e estrutura espacial da molécula ajudarão a responder estas questões e tornarão mais fácil o entendimento do processo como um todo.

5.2 Construção e seleção das bibliotecas de expressão na superfície de fagos filamentosos

A alça de ligação dos BBI é composta, na grande maioria das espécies, por sete resíduos de aminoácidos denominados P_2, P_1, P_1', P_2', P_3', P_4' e P_5' que, de acordo com dados de estrutura, estabelecem contatos diretos com os resíduos de várias serino proteinases. Os resíduos que precedem e seguem estes sete aminoácidos são bastante conservados. Eles correspondem às

cisteínas (P_3 e P_6') que desempenham uma função de extrema importância: a formação de uma ponte dissulfeto responsável pela manutenção da estrutura da alça inibitória (Maeder et al., 1992). Acredita-se que as espécies que perderam estes resíduos de cisteína, como no caso de algumas monocotiledôneas, possuem alças não funcionais (Prakash et al., 1996). Este fato e a importância dos resíduos de cisteínas foram discutidos anteriormente.

Com o objetivo de melhorar os inibidores de tripsina (TRI) e quimotripsina (QUI) derivados do inibidor Bowman-Birk de soja (IBB-1), foram feitas mutações em 4 posições de suas alças de inibição e duas bibliotecas de expressão em fagos filamentosos foram construídas. A Tabela 2 mostra que as posições P_2' e P_5' da primeira alça de inibição de dicotiledôneas são as que mais apresentam variações. Em monocotiledôneas, as posições P_2 e P_1' também apresentam uma variação elevada. Sendo assim, decidiu-se mutar as posições P_2, P_1, P_1' e P_2' da primeira alça de inibição do inibidor de tripsina (TRI). A segunda alça de inibição dos BBI apresenta uma taxa evolutiva superior à primeira alça, o que levou a diferenças mais pronunciadas no grau de conservação dos seus resíduos de aminoácidos (Tabela 3). As posições P_2, P_1 e P_2' são as que apresentam maior variação. Baseando-se nestes dados, foram mutadas as posições P_2, P_1, P_2' e P_4' da segunda alça de inibição do inibidor de quimotripsina (QUI).

Esperava-se que cada biblioteca apresentasse $1,6x10^5$ diferentes seqüências, já que qualquer um dos 20 aminoácidos poderiam ocorrer em cada uma das 4 posições mutadas (20^4). Após a construção, obteve-se uma biblioteca de variantes TRI com $3,98x10^5$ transformantes independentes e outra de inibidores de quimotripsina com $4,65x10^5$ transformantes independentes. Estes valores superam em mais de duas vezes a diversidade esperada para cada biblioteca, indicando uma representatividade adequada. O seqüenciamento de 30 colônias tomadas ao acaso confirmou a diversidade das bibliotecas. Todas as seqüências obtidas eram diferentes e nenhuma delas correspondia à seqüência da alça original. Porém, ambas as bibliotecas contêm

proteínas originárias da clonagem em tandem de três fragmentos degenerados. A ocorrência de 2% de múltiplos insertos é considerada comum na construção deste tipo de biblioteca (Noren & Noren, 2001). Segundo os autores, seqüências contendo múltiplos insertos são preferencialmente selecionadas quando a interação da proteína alvo com a biblioteca supera a extensão do inserto. Após 5 ciclos de seleção, um número bastante reduzido de seqüências com 3 insertos foi recuperado.

Por outro lado, uma grande parte das seqüências selecionadas apresentavam, em qualquer uma das posições mutadas, uma glutamina originária da tradução do códon de terminação TAG. Este códon é suprimido nas cepas *E. coli* TG1 (supE) e traduzido em glutamina. Têm-se observado que a eficiência de supressão em bactérias é baixa e dependente do contexto (Miller & Albertini, 1983; Edelmann et al., 1987), o que leva à produção de baixas concentrações da proteína inteira nestas células. Kiczak e colaboradores (2001) observaram um efeito tóxico do inibidor de serino proteinase BPTI (tipo Kunitz) expresso no periplasma de células de *E. coli*. Segundo os autores, células de bactérias expressando as seqüências de BPTI que apresentavam o códon de terminação TAG teriam vantagens quanto ao crescimento em relação às outras células que expressavam inibidores que não apresentavam TAG em sua seqüência. Isto porque as primeiras apresentariam uma menor concentração da proteína tóxica. Da mesma forma, os inibidores de tripsina (TRI) e quimotripsina (QUI) poderiam ter efeito tóxico nas células TG1, o que acarretaria vantagens na multiplicação e crescimento de células expressando as seqüências destes inibidores contendo o códon de terminação TAG. Portanto, o aparecimento de glutamina codificada por este códon nas várias seqüências selecionadas seria um artefato do processo de seleção, não refletindo em uma característica de melhor ligação do mutante à proteinase alvo. Desta forma, estas seqüências foram apresentadas mas não serão discutidas ou consideradas em estudos futuros.

Após 5 ciclos de seleção da biblioteca de tripsina (TRI) contra a tripsina bovina, a tripsina purificada de *D. saccharalis* e o extrato intestinal bruto de lagartas desta espécie, foram isolados e seqüenciados vários clones. Nas três preparações enzimáticas, o inibidor selecionado com maior freqüência foi aquele que apresenta a seqüência **CTKSNPPQC** na alça de inibição, correspondente ao inibidor original (Figura 17). A freqüência com que este inibidor foi selecionado varia entre as preparações enzimáticas e está correlacionada com a pureza destas preparações. Quando a tripsina bovina (Sigma) foi utilizada, 77% das seqüências analisadas corresponderam à original (**CTKSNPPQC**). Na seleção contra a tripsina purificada de *D. saccharalis* e contra o extrato intestinal bruto de lagartas desta espécie, esta porcentagem caiu para 37% e 18%, respectivamente. Estes dados sugerem que este é o melhor inibidor de tripsina presente na biblioteca TRI para as enzimas utilizadas neste trabalho. É preciso ressaltar que as interações que ocorrem entre enzima e inibidor não estão restritas apenas à alça de inibição. Sabe-se que os aminoácidos de outras posições da molécula do inibidor também estabelecem interações com as enzimas que eles inibem. Neste caso, podemos sugerir que a composição da alça de inibição seria influenciada pela composição da molécula do inibidor como um todo. Assim, para o inibidor de tripsina (TRI), a melhor composição de aminoácidos para as posições mutadas (P_2, P_1, P_1' e P_2') seria treonina, lisina, serina e asparagina. Estes dados mostram a eficiência com que a evolução atuou sobre estes inibidores no sentido de selecionar as melhores seqüências. Porém, a evolução não atuou apenas em uma seqüência, ela também atuou no sentido de manter variabilidade. A espécie *Glycine max* (soja) apresenta quatro seqüências diferentes de alças de inibição de tripsina (**CTKSNPPQC**, CTRSMPGQC, CTRSQPGQC e CTRSMPPQC). A seqüência selecionada é apenas uma delas.

Na seleção da biblioteca de tripsina contra a tripsina purificada *de D. saccharalis*, um outro inibidor aparece com freqüência alta (15% dos selecionados). Este inibidor apresenta a seqüência **CGLADPPQC**, onde P_1 é

uma leucina e P_1' uma alanina. A presença de leucina em P_1 caracteriza inibidores de quimotripsina, o que indica que a preparação enzimática utilizada apresenta contaminação com esta serino proteinase. A análise da Tabela 4 mostra que na seleção contra a tripsina bovina foram selecionados 90% de inibidores de tripsina, inibidores que apresentam em P_1 resíduos de arginina ou lisina. Quando a seleção foi feita contra a tripsina purificada de *D. saccharalis*, 40% das proteínas selecionadas eram inibidores de tripsina, sendo que 19% eram inibidores de quimotripsina (P_1 = L, W, Y ou F) e 10% eram inibidores de elastase (P_1 = V ou A), mostrando também uma provável contaminação desta preparação com elastase. Quando o extrato intestinal bruto de lagartas de *D. saccharalis* foi utilizado como fonte de enzimas na seleção, inibidores de tripsina (26%), quimotripsina (18%) e elastase (6%) também puderam ser selecionados (Figura 17).

Após 5 ciclos de seleção da biblioteca de quimotripsina contra a tripsina bovina foi possível recuperar um inibidor que apresenta a seqüência **CTRSIPPQC** na alça de inibição. Este inibidor apresenta uma treonina (T) em P_2. McBride e colaboradores (1998), estudaram o efeito dos 20 aminoácidos na posição P_2 da segunda alça de inibição do BBI MAI-D4. Os autores observaram que a treonina nesta posição torna o inibidor altamente estável à hidrólise e a K_i obtida com esta substituição foi a mais baixa (K_i=0,019 µM). A mutação obtida em P_1, de leucina para arginina, altera a especificidade deste domínio de quimotripsina para tripsina. Portanto, a estratégia utilizada foi eficaz em converter um inibidor de quimotripsina em um inibidor de tripsina. Este fato também foi observado por Jongsma e colaboradores (1995). Em P_2' foi selecionada a isoleucina enquanto que em P_4' foi a prolina. Dentre os 60 BBI de dicotiledôneas analisados, 36 apresentam uma isoleucina na posição P_2' e todos apresentam uma prolina em P_4', o que confirma a preferência destes resíduos nas respectivas posições. Gariani e Leatherbarrow (1997) destacam que a presença de isoleucina em P_2' aumenta consideravelmente a estabilidade da molécula à hidrólise. Um fato interessante é que a mesma alça selecionada

(**CTRSIPPQC**) é encontrada em inibidores de ervilha (CAC24566), alfafa (S56647, P80321, P16346) e amendoim (P01067). Além disto é importante destacar que dentre os BBI estudados (101 inibidores diferentes), apenas um inibidor apresenta a mesma seqüência de aminoácidos nas duas alças de inibição. Este é o inibidor de alfafa S56647 que apresenta exatamente a seqüência selecionada. Isto pode ser um indicativo de que tal seqüência possui características bastante desejadas de inibição de tripsina, atestando a eficiência do processo de seleção realizado em se obter um inibidor bastante específico.

Outra seqüência selecionada à partir da biblioteca de quimotripsina (QUI) contra a tripsina bovina foi a **CLASQPHQC**. Embora a glutamina na posição P_2' seja codificada pelo códon de terminação TAG suprimido nas *E. coli* TG1, esta seqüência aparece na seleção com uma porcentagem elevada. Trata-se de um inibidor de elastase com uma alanina em P_1, o que sugere que a tripsina bovina utilizada como alvo na seleção estava contaminada com elastase.

O inibidor que apresenta a seqüência **CQSAPCQW** na alça de inibição foi selecionado quando a tripsina purificada e o extrato intestinal bruto de lagartas de *D. saccharalis* foram utilizados como enzima alvo na seleção da biblioteca de quimotripsina. Este inibidor apresenta uma guanina (G) a mais na posição do aminoácido P_6' que codifica para a cisteína. Esta guanina a mais é fruto de um erro na síntese do iniciador degenerado e gera a mudança na fase de leitura da proteína, modificando a partir deste ponto sua seqüência de aminoácidos. Na posição P_4' mutada aparece uma cisteína que substitui a cisteína mutada da posição P_6' (CP_6'W) na formação da alça de inibição. Desta forma a alça de inibição passa a ser constituída de 5 aminoácidos ao invés de 7 como na maioria dos BBI. Inibidores de tripsina de plantas da família Cucurbitaceae também apresentam uma alça de inibição menor, composta por 6 aminoácidos (P30709, P34950, P82408, P82409 e P82410) (Korsinczky et al., 2001), mostrando que embora a maioria dos BBI tenham 7 e 9 aminoácidos na alça de inibição, uma diminuição no seu tamanho poderia favorecer a ligação a outras tripsinas como, por exemplo, a tripsina de *D. saccharalis*. Embora este

inibidor com alça reduzida estivesse presente na biblioteca de quimotripsina e tenha sido selecionado para a tripsina da broca da cana-de-açúcar, ele não aparece nenhuma vez na seleção feita contra a tripsina bovina. Tal observação sugere diferenças importantes quanto à especificidade à inibidores das duas enzimas. Além disto, neste inibidor ocorreu um deslocamento da posição P_1. O resíduo de arginina se encontra logo após a primeira cisteína da alça. Nos inibidores de tripsina do tipo BPTI (Kunitz) animal (Kuroda & Kim, 2000), o aminoácido correspondente à posição P_1 também se encontra logo após a primeira cisteína. Portanto, é esperado que esta mudança não afete sua eficiência de inibição.

A mudança na fase de leitura da proteína gera um problema comum nestes casos: o aparecimento de um códon de terminação que interrompe precocemente a síntese da proteína de fusão inibidor de quimotripsina/ pIII do fago. O resultado foi a formação de um inibidor de apenas 23 aminoácidos que é precedido do peptídeo de endereçamento para o periplasma da proteína pIII do fago. Provavelmente, o que ocorre é que, tendo este peptídeo sinal, o inibidor seja incorporado à superfície do fago mesmo não contendo a seqüência correspondente à proteína pIII. Deste modo, o inibidor estaria de alguma forma exposto na superfície do fago, o que possibilitaria sua interação com as proteinases utilizadas no processo de seleção. Embora esta explicação seja a mais provável, não se deve descartar outras possibilidades que resolveriam o problema da mudança de fase de leitura deste inibidor selecionado (**CQSAPCQW**).

A tradução se inicia no códon AUG e continua por meio da leitura de 3 bases de cada vez, até encontrar um códon de terminação que, no caso das bactérias *E. coli* TG1 (supE) utilizadas neste trabalho, pode ser um UAA ou UGA. Porém existem exceções no padrão de tradução como, por exemplo, as mutações conhecidas por "frameshift". Estas mutações estão envolvidas com mudanças na fase de leitura devido a inserção (+1) ou deleção (-1) de uma base em sítios específicos. Neste caso, tRNAs com propriedades aberrantes

restauram a fase de leitura. Tais eventos foram observados em bacteriófagos MS2 (Kastelein et al., 1982), *Salmonella typhimurium* (Li & Bjork, 1999) e *Escherichia coli* (O'Connor, 2002). Estes supressores reconhecem um códon com 4 bases como sendo um códon normal de 3 bases. Alguns exemplos são CCCC como CCC, AAAA ou AAAU como AAA, ACCA ou ACCC ou ACCU ou ACCG como ACC, GUUU como GUU ou UUU, CGGG ou GGGG como CGG ou GGG. Diante destes fatos, não se pode descartar a possibilidade da ação de supressores deste tipo na seqüência do inibidor que sofreu uma inserção (**CQSAPCQW**). Embora a ocorrência deste tipo de supressão seja menos provável, ela restauraria a fase de leitura do inibidor, fazendo com que a proteína pIII do fago fosse produzida de forma correta, expondo o inibidor mutante na superfície do fago, permitindo, desta maneira, sua interação com as enzimas durante o processo de seleção.

A análise da posição P_1 na Tabela 4 mostra que, na seleção da biblioteca de inibidores de quimotripsina, foi selecionada uma porcentagem maior de inibidores de tripsina que apresentam em P_1 resíduos de arginina ou lisina. Porém, em todas as preparações enzimáticas, inibidores de quimotripsina e elastase também foram selecionados. É esperado que no extrato intestinal bruto de lagartas de *D. saccharalis* haja uma mistura de serino proteinases. Porém, com o emprego da técnica de expressão na superfície de fagos foi possível detectar a contaminação das outras preparações de tripsina utilizadas. A descrição do fabricante da tripsina bovina alerta para uma contaminação com quimotripsina porém, nada é mencionado com relação à elastase. Métodos colorimétrico e fluorométricos não detectaram a presença de quimotripsina ou elastase na preparação da tripsina purificada de *D. saccharalis*. Como a expressão de proteínas na superfície de fagos permite a interação entre moléculas, uma pequena quantidade de enzima contaminante pode ser detectada com o emprego desta técnica.

Todos os dados apresentados e discutidos neste trabalho mostram que a construção de bibliotecas de inibidores e sua seleção foram eficazes no sentido

de selecionar inibidores para as proteinases desejadas. Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram um melhor entendimento sobre o modo com que a evolução atuou nesta classe de inibidores, bem como sua interação com as proteinases.

6 CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados apresentados, conclui-se que:

- Os inibidores do tipo Bowman-Birk de mono e dicotiledôneas podem ser separados em dois grupos distintos.

- O processo evolutivo dos BBI de monocotiledôneas é caracterizado por duplicações do gene e intragênica.

- Os inibidores putativos de cana-de-açúcar são encontrados em todas as partes da planta, comprovando que não são característicos de sementes ou caules e folhas que sofreram injúrias.

- É possível a construção de bibliotecas utilizando-se os inibidores de tripsina e quimotripsina expressos na superfície do fago M13.

- Por meio da técnica de expressão na superfície de fagos filamentosos, construção de bibliotecas de inibidor e seleção destes inibidores, foi possível converter um inibidor de quimotripsina (QUI) em inibidor de tripsina.

- As bibliotecas de expressão na superfície de fagos filamentosos produzidas dos inibidores TRI e QUI podem ser utilizadas na seleção de inibidores contra as serino proteinases de pragas de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEY, N.B.; MATARAGNON, A.H.; RIDER, J.E.; CARTER, M.; KAY, B.K. Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptides libraries. **Gene**, v.156, n.1, p.27-31, 1995.

ADEY, N.B.; SPARKS, A.B.; BEASLEY, J.; KAY, B.K. Construction of random peptide libraries in bacteriophage M13. In: KAY, B.K.; WINTER, J.; McCAFFERTY, J. (Ed.). **Phage display of peptides and proteins**: a laboratory manual. Toronto: Academis Press, 1996. Chap.5, p.67-78.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3, p.403-410, 1990.

ATWELL, S.; WELLS, J.A. Selection for improved subtiligases by phage display. **Proceedings in National Academy of Science of the United States of America,** v.96, n.17, p.9497-9502, 1999.

BAEK, J.M.; SONG, J.C.; CHOI, Y.D.; KIM, S.I. Nucleotide sequence homology of cDNAs encoding soybean Bowman-Birk type proteinase inhibitor and its isoinhibitors. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.58, n.5, p.843-846, 1994.

BALDWIN, I.T. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. **Plant Physiology**, v.127, n.4, p.1449-1458, 2001.

BENTO, J.M.S. Perdas por insetos na agricultura. **Ação ambiental**, v.2, n.4, p.19-21, 1999.

BIRK, Y.; GERTLER, A.; KHALEF, S. A pure trypsin inhibitor from soya beans. **Biochemical Journal**, v.87, n.2, p.281-284, 1963.

BIRKETT, M.A.; CAMPBELL, C.A.M.; CHAMBERLAIN, K.; GUERRIERI, E.; HICK, A.J.; MARTIN, J.L.; MATTHES, M.; NAPIER, J.A.; PETTERSSON, J.; PICKETT, J.A.; POPPY, G.M.; POW, E.M.; PYE, B.J.; SMART, L.E.; WADHAMS, G.H.; WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M. New roles for cis-jasmone as na insect semiochemical and in plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.16, p.9329-9334, 2000.

BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P. Uso de *Trichogramma galloi* (Zucchi, 1988) no controle de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17., Rio de Janeiro, 1998. **Resumos**. Piracicaba: Sociedade Entomológica do Brasil, 1998. p.397.

BOWMAN, D.E. Differentiation of soy bean anti-tryptic factors. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.63, n.3, p.547-550, 1946.

BRAGA, D.P.V.; ARRIGONI, E.D.B.; SILVA-FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, 2003. /No prelo/

BRITO, L.O.; LOPES, A.R.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Adaptation of tobacco budworn *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases**. Comparative Biochemistry and Physiology**, v.128B, p.365-375, 2001.

BROADWAY, R.M. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archieves of Insect Biochemistry and Physiology**, v.32, n.1, p.39-53, 1996.

CARVALHO, S.S.A.; AMORIN, S.C.R.; LIMA, I.S. Comportamento reprodutivo da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* L. (Lepidoptera, Crambidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19., Manaus, 2002. **Resumos**. Piracicaba: Sociedade Entomológica do Brasil, 2002. p.18.

CHEN, P.; ROSE, J.; LOVES, R.; WEI, C.H.; WANG, B. Reactive sites of na anticarcinogenic Bowman-Birk proteinase inhibitor are similar to other trypsin inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.3, p.1990-1994, 1992.

CHRISTELLER, J.T.; FARLEY, P.C.; RAMSAY, R.J.; SULLIVAN, P.A.; LAING, W.A. Purification, characterization and clonning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. **European Journal of Biochemistry**, v.254, n.1, p.160-167, 1998.

CHUNG, S.E.; CHEN, A.L.; CHAO C.C. Growth of *E. coli* at low temperature dramatically increases the transformation frequency by eletroporation. **Nucleic Acid Research**, v.23, p.1641, 1995.

deBRUXELLES, G.L.; ROBERTS, M.R. Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. **Critical Reviews in Plant Science**, v.20, n.5, p.487-521, 2001.

DEMARTIS, S.; HUBER, A.; VITI, F.; LOZZI, L.; GIOVANNONI, L.; NERI, P.; WINTER, G.; NERI, D. A strategy for the isolation of catalytic activities from repertoires of enzymes displayed on phage. **Journal of Molecular Biology**, v.286, n.2, p.617-633, 1999.

DEVLIN, J.J.; PANGANIBAN, L.C.; DEVLIN, P.E. Randon peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. **Science,** v.249, n.4967, p.404-406, 1990.

EDELMANN, P.; MARTIN, R.; GALLANT, J. Nonsense suppression context effects in *Escherichia coli* bacteriophage-T4 **Molecular and General Genetics**, v.207, n.2-3, p.517-518, 1987.

FALCO, M.C.; MARBACH, P.A.S.; POMPERMAYER, P.; LOPES, F.C.C.; SILVA-FILHO, M.C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, n.1-4, p.113-122, 2001.

FERREIRA, C.; CAPELLA, A.N.; SITNIK, R.; TERRA, W.R. Digestive enzymes in midgut cells, endo and ectoperitrophic contentes, and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Archives Insect Biochemistry and Physiology**, v.26, n.4, p.299-313, 1994.

FORDYCE, J.A.; AGRAWAL, A.A. The role of plant trichomes and caterpillar group size on growth and defense of the pipevine swallowtail *Battus philenor*. **Journal of Animal Ecology**, v.70, n.6, p.997-1005, 2001.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.B.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Manual de entomologia agrícola**. 10.ed. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GARIANI, T.; LEATHERBARROW, R.J. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases. **Journal of Peptide Research,** v.49, n.6, p.467-475, 1997.

GIRARD, C.; MÉTAYER, M.L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAM-DELÈGUE, M.H.; JOUANIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in bettle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.28, n.4, p.229-237, 1998.

GOUGH, K.C.; COCKBURN, W.; WHITELAM, G.C. Selection of phage-display peptides that bind to cucumber mosaic virus coat protein. **Journal of Virological Methods**, v.79, n.2, p.169-180, 1999.

HALITSCHKE, R.; SCHITTKO, U.; POHNERT, G.; BOLAND, W.; BALDWIN, I.T. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidopetra, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty Acid-Amino Acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. **Plant Physiology**, v.125, n.2, p.711-717, 2001.

HAMMOND, R.W.; FOARD, D.E.; LARKINS, B.A. Molecular cloning and analysis of a gene coding for the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean. **Journal of Biological Chemistry**, v.259, n.15, p.9883-9890, 1984.

HANSSON, L.O.; WIDERSTEN, M.; MANNERVIK, B. An approach to optimizing the active site in a glutathione transferase by evolution *in vitro*. **Biochemical Journal**, v.344, p.93-100, 1999.

HARUTA, M.; MAJOR, I.T.; CHRISTOPHER, M.E.; PATTON, J.J.; CONSTABEL, C.P. A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): clonning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology**, v.46, n.3, p.347-359, 2001.

JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; STIEKEMA, W.J.; BOSCH, D. Phage display of a double-headed proteinase inhibitor: analysis of binding domains of potato proteinase inhibitor II**.** **Molecular Breeding**, v.1, n.2, p.181-191, 1995.

JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v.43, n.10, p.885-895, 1997.

JONGSMA, M.A.; STIEKEMA, W.J.; BOSCH, D. Combatting inhibitor-insensitive proteases of insect pests. **Trends in Biotechnology**, v.14, n.9, p.331-333, 1996.

KASTELEIN, R.A.; REMAUT, E.; FIERS, W.; DUIN, J. Lysis gene expression of RNA phage MS2 depends on a frameshift during translation of the overlapping coat protein gene. **Nature**, v.295, p.35-41, 1982.

KICZAK, L.; KOSCIELSKA-KASPRZAK, K.; OTLEWSKI, J.; CZERWINSKI, M.; DADLEZ, M. Phage display selection of P1 mutants of BPTI directed against five different serine proteinases. **Biological Chemistry**, v.380, n.1, p.101-105, 1999.

KICZAK, L.; KASZTURA, M.; KOSCIELSKA-KASPRZAK, K.; DADLEZ, M.; OTLEWSKI, J. Selection of potent chymotrypsin and elastase inhibitors from M13 phage display library of basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). **Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v.1550, n.2, p.153-163, 2001.

KING, E.G.; HARTLEY, G.G. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, H.P.; MOORE, R.F. (Ed.) **Handbook of insect rearing**. New York: Elsevier, 1985. p.265-270.

KLIEBENSTEIN, D.J.; KROYMANN, J.; BROWN, P.; FIGUTH, A.; PEDERSEN, D.; GERSHENZON, J.; MITCHELL-OLDS, T. Genetic control of natural variation in Arabidopsis glucosinolate accumulation. **Plant Physiology**, v.126, n.2, p.8811-8825, 2001.

KOIVUNEN, E.; ARAP, W.; RAJOTTE, D.; LAHDENRANTA, J.; PASQUALINI, R. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. **Journal of Nuclear Medicine**, v.40, n.5, p.883-888, 1999.

KOIWA, H.; SHADE, R.E.; ZHU-SALZMAN, K.; SUBRAMANIAN, L.; MURDOCK, L.L.; NIELSEN, S.S.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. **The Plant Journal**, v.14, n.3, p.371-379, 1998.

KOIWA, H.; D'URZO, M.P.; ASSFALG-MACHLEIDT, I.; ZHU-SALZMAN, K.; SHADE, R.E.; AN, H.J.; MURDOCK, L.L.; MACHLEIDT, W.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Phage display selection of hairpin loop soyacystatin variants that mediate high affinity inhibition of a cysteine proteinase. **Plant Journal**, v.27, n.5, p.383-391, 2001.

KORSINCZKY, M.L.J.; SCHIRRA, H.J.; ROSENGREN, K.J.; WEST, J.; CONDIE, B.A.; OTVOS, L.; ANDERSON, M.A.; CRAIK, D.J. Solution structure by ^{1}H NMR of the novel cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds and an acyclic permutant. **Journal of Molecular Biology**, v.311, n.3, p.579-591, 2001.

KURODA, Y.; KIM, P.S. Folding of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) variants in which almost half the residues are alanine. **Journal of Molecular Biology**, v.298, p.493-501, 2000.

LI, J.N.; BJORK, G.R. Structural alterations of the tRNA (m(1)G37) methyltransferase from Salmonella typhimurium affect tRNA substrate specificity. **RNA - a publication of the RNA Society**, v.5, n.3, p.395-408, 1999.

MAEDER, D.L.; SUNDE, M.; BOTES, D.P. Design and inhibitory properties of synthetic Bowman-Birk loops. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v.40, n.2, p.97-102, 1992.

MAKOWSKI, L. Phage display: structure, assembly and engeneering of filamentous bacteriophage M13. **Current Opinion in Structural Biology**, v.4, n.2, p.225-230, 1994.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S.; BROADWAY, R.M. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, n.6-7, p.645-657, 2001(a).

MAZUMDAR-LEIGHTON S, BROADWAY RM Identification of six chymotrypsin cDNAs from larval midguts of *Helicoverpa zea* and *Agrotis ipsilon* feeding on the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, n.6-7, p.633-644, 2001(b).

McBRIDE, J.D.; BRAUER, A.B.E.; NIEVO, M.; LEATHERBARROW, R.J. The role of threonine in the P2 position of Bowman-Birk proteinase inhibitors: Studies on P2 variation in cyclic peptides encompassing the reactive site loop. **Journal of Molecular Biology**, v.282, n.2, p.447-457, 1998.

McGURL, B.; MUKHERJEE, S.; KAHN, M.; RYAN, C.A. Characterization of two proteinase inhibitor (ATI) cDNAs from alfafa leaves (*Medicago sativa* var. Vernema): the expression of ATI genes in response to wounding and soil microorganisms. **Plant Molecular Biology**, v.27, n.5, p.995-1001, 1995.

MELLO, M.O.; SILVA-FILHO, M.C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, n.2, p.71-81, 2002.

MICHAUD, D. Avoiding protease-mediated resistance in herbivore pests. **Trends in Biotechnology**, v.15, n.1, p.4-6, 1997.

MILLER, J.H.; ALBERTINI, A.M. Effects of surrounding sequence on the suppression of nonsense codons **Journal of Molecular Biology**, v.164, n.1, p.59-71, 1983.

NAGASUE, A.; FUKAMACHI, H.; IKENAGA, H.; FUNATSU, G. The amino acid sequence of barley rootlet trypsin inhibitor. **Agricultural and Biological Chememistry**, v.52, n.6, p.1505-1514, 1988.

NAKANO, O.; POLETTO, C.F. Possibilidades de liberação de populações estéreis de *Diatraea saccharalis* através da quimio-esterilização. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17., Rio de Janeiro, 1998. **Resumos**. Piracicaba: Sociedade Entomológica do Brasil, 1998. p.161.

NISHIDA, R. Sequestration of defensive substances from plants by lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v.47, p.57-92, 2002.

NOREN, K.A.; NOREN, C.J. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. **Methods**, v.23, n.2, p.169-178, 2001.

NORIOKA, S.; IKENAKA, T. Amino acid sequence of trypsin chymotrypsin inhibitors (AI, AII, BI and BII) from peanut (*Arachis hypogaea*): a discussion on molecular evolution of legume Bowman-Birk type inhibitors. **Journal of Biochemistry**, v.94, n.2, p.589-599, 1983.

O'CONNOR, M. Insertions in the anticodon loop of tRNA (1)(Gln)(sufG) and tRNA(Lys) promote quadruplet decoding of CAAA. **Nucleic Acid Research**, v.30, n.9, p.1985-1990, 2002.

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors: IV-Complete amino acid sequence and anti-proteinase sites of Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor. **Journal of Biochemistry**, v.71, n.5, p.839-848, 1972.

ODANI, S.; IKENAKA, T. The amino acid sequence of two soybean double headed proteinase inhibitors and evolutionary consideration on the legume proteinase inhibitors**. Journal of Biochemistry**, v.80, n.3, p.641-643, 1976.

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. XII-Linear sequences of two soybean double-headed trypsin inhibitors, DII and EII. **Journal of Biochemistry,** v.83, n.3, p.737-745, 1978(a).

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors: XIV-Change of the inhibitory activity of Bowman-Birk inhibitor upon replacements of the α-chymotrypsin reactive site serine residue by other amino acids. **Journal of Biochemistry**, v.84, n.1, p.1-9, 1978(b).

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. XI-Complete amino acid sequence of a soybean trypsin-chymotrypsin-elastase inhibitor, CII. **Journal of Biochemistry**, v.82, n.6, p.1523-1531, 1977.

ODANI, S.; KOIDE, T.; ONO, T. Wheat germ trypsin inhibitors. Isolation and structural characterization of single-headed and double-headed inhibitors of the Bowman-Birk type. **Journal of Biochemistry**, v.100, n.4, p.975-983, 1986.

OROZCO-CÁRDENAS, M.L.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; RYAN, C.A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. **The Plant Cell**, v.13, n.1, p.179-191, 2001.

PAGE, R.D.M. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applied Bioscience**, v.12, n.4, p.357-358, 1996.

PANDA, N.; KHUSH, G.S. **Host plant resistance to insects**. Wallingford: CAB International, 1995. 431p.

PARRA, J.R.P. Controle das principais pragas da cana-de-açúcar. In: CÂMARA, G.M.S.; OLIVEIRA, E.A.M. de (Ed.). **Produção de cana de açúcar**. Piracicaba: FEALQ, 1993. p.184-197.

PATANKAR, A.G.; GIRI, A.P.; HARSULKAR, A.M.; SAINANI, M.N.; DESHPANDE, V.V.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, V.S. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, n.4-5, p.453-464, 2001.

PAULILLO, L.C.M.S.; LOPES, A.R.; CRISTOFOLETTI, P.T.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Changes in midgut endopeptidase activity *for Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera:Noctuidae) are responsable for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Jouranl of Economic Entomology**, v.93, n.3, p.892-896, 2000.

PHARMACIA BIOTECH**. Expression Module/Recombinant Phage Antibody System**. Piscataway, 1995. 47p.

POERIO, E.; CAPORALE, C.; CARRANO, L.; CARUSO, C.; VACCA, F.; BUONOCORE, V. The amino acid sequence and reactive site of a single-headed trypsin inhibitor from wheat endosperm**. Journal of Protein Chemistry**, v.13, n.2, p.187-194, 1994.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.99, n.1, p.79-85, 2001.

PRAKASH, B.; MURTHY, M.R.N.; SREERAMA, Y.N.; RAO, D.R.; GOWGA, L.R. Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors**. Journal of Molecular Evolution**, v.42, n.5, p.560-569, 1996.

RAKWAL, R.; AGRAWAL, G.K.; JWA, N.S. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. **Gene**, v.263, n.1-2, p.189-198, 2001.

ROBERTS, B.L.; MARKLAND, W.; SIRANOSIAN, K.; SAXENA, M.J.; GUTERMAN, S.K.; LADNER, R.C. Protease inhibitor display M13 phage: selection of high-affinity neutrophil elastase inhibitors. **Gene,** v.121, n.1, p.9-15, 1992.

RODI, D.J.; MAKOWSKI, L. Phage-display technology-finding a needle in a vast molecular haystack. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, n.1, p.87-93, 1999.

ROHRMEIER, T.; LEHLE, L. WIP1, a wound-inducible gene from maize with homology to Bowman-Birk proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology**, v.22, n.5, p.783-792, 1993.

ROY, I.; GUPTA, M.N. Purification of a “double-headed” inhibitor of alpha-amylase/proteinase K from wheat germ by expanded bed chromatography. **Bioseparation**, v.9, n.4, p.239-245, 2000.

RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insect and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p.425-449, 1990.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees**. Molecular Biology and Evolution***,* v.4, n.4, p.406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular clonning**: a laboratory manual, 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3v.

SCOTT, J.K.; SMITH, G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library. **Science**, v.249, p**.**386-390, 1990.

SCOTT, J.G.; WEN, Z.M. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg**. Pest Managemant Science**, v.57, p.958-967, 2001.

SIEBER, V.; PLUCKTHUN, A.; SCHMID, F.X. Selecting proteins with improved stability by phage-based method. **Nature Biotechnology**, v.16, n.10, p.955-960, 1998.

SILVA, C.P.; TERRA, W.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; SAMUELS, R.I.; ISEJIMA, E.M.; BIFANO, T.D.; ALMEIDA, J.S. Induction of digestive α-amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α-amylase inhibitor 1. **Journal of Insect Physiology**, v.47, n.11, p.1283-1290, 2001.

SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the surface of the virion. **Science**, v.228, p.1315-1317, 1985.

SONG, H.K.; KIM, Y.S.; YANG, J.K.; MOON, J.; LEE, J.Y.; SUH, S.W. Crystal structure of a 16kDa double-headed Bowman-Birk trypsin inhibitor from barley seeds at 1.9Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.293, n.5, p.1133-1144, 1999.

SPARKS, A.B.; RIDER, J.E.; HOFFMAN, N.G.; FOWLKES, D.M.; QUILLIAM, L.A.; KAY, B.K. Distinct ligand preferences of SH3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCγ, Crk, and Grb2. **Proceedings in National Academy of Science of the United States of America,** v.93, n.4, p.1540-1544, 1996.

STOOP, A.A.; ELDERING, E.; DAFFORN, T.R.; READ, R.J.; PANNEKOEK, H. Different structural requirements for plasminogen activatior inhibitor 1 (PAI-1) during latency transition and proteinase inhibition as evidence by phage displayed hypermutated PAI-1 libraries. **Journal of Molecular Biology**, v.305, n.4, p.773-783, 2001.

SUZUKI, A.; TSUNOGAE, Y.; TANAKA, I.; YAMANE, T.; ASHIDA, T.; NORIOKA, S.; HARA, S.; IKENAKA, T. The structure of Bowman-Birk type protease inhibitor A-II from peanut (*Arachis hypogaea*) at 3.3Å resolution. **Journal of Biochemistry**, v.101, n.1, p.267-274, 1987.

TAN, C.G.L.; STEVENS, F.C. Amino acid sequence of lima bean protease inhibitor component- IV: Isolation and sequence determination of tryptic peptides**. European Journal of Biochemistry**, v.18, n.4, p.515-523, 1971.

TANAKA, A.S.; SAMPAIO, C.A.; FRITZ, H.; AUERSWALD, E.A.. Functional display and expression of chicken cystatin using a phagemid system**. Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.214, n.2, p.389-395, 1995.

TANAKA, A.S.; SAMPAIO, M.U.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J.C.; OLIVA, M.L.V.; FINK, E.; SAMPAIO, C.A.M. Purification and primary structure determination of a Bowman-Birk trypsin inhibitor from *Torresea cearensis* seeds. **Biological Chemistry**, v.378, n.3-4, p.273-281, 1997.

TANAKA, A.S.; SAMPAIO, M.U.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E.A.; SAMPAIO, C.A.M. Sequence of a new Bowman-Birk inhibitor from *Torresea acreana* seeds and comparison with *Torresea cearensis* trypsin inhibitor (TcTI2). **Journal of Protein Chemistry**, v.15, n.6, p.553-560, 1996.

TANAKA, A.S.; SILVA, M.M.; TORQUATO, R.J.S.; NOGUTI, M.A.E.; SAMPAIO, C.A.M.; FRITZ, H.; AUERSWALD, E.A. Functional phage display of leech-derived trypstase inhibitor (LDTI): construction of a library and selection of thrombin inhibitors. **FEBS Letters**, v.458, n.1, p.11-16, 1999.

TASHIRO, M.; ASAO, T.; HIRATA, C.; TAKAHASHI, K.; KANAMORI, M. The complete amino acid sequence of a major trypsin inhibitor from seeds of foxtail millet (*Setaria italica*). **Journal of Biochemistry**, v.108, n.4, p.669-672, 1990.

TASHIRO, M.; HASHINO, K.; SHIOZAKI, M.; IBUKI, F.; MAKI, Z. The complete amino acid sequence of rice bran trypsin inhibitor. **Journal of Biochemistry**, v.102, n.2, p.297-306, 1987.

TERADA, S.; SATO, K.; KATO, T.; IZUMIYA, N. Inhibitory properties of nonapeptide loop structures related to reactive sites of soybean Bowman-Birk inhibitor**. FEBS Letters,** v.90, n.1, p.89-92, 1978.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research,** v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

TIFFIN, P.; GAUT, B.S. Molecular evolution of the wound-induced seine proteinase inhibitor wip1 in zea and related genera. **Molecular Biological Evolution**, v.18, n.11, p.2092-2101, 2001.

VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST**. Genetics and Molecular Biology***,* v.24, n.1-4, p.1-7, 2001.

VOLPICELLA, M.; CECI, L.R.; GALLERANI, R.; JONGSMA, M.A.; BEEKWILDER, J. Functional expression on bacteriphage of the mustard typsin inhibitor MTI-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v.280, n.3, p.813-817, 2001.

WEBSTER, R.E. Biology of the filamentous bacteriophage. In: KAY, B.K.; WINTER, J.; McCAFFERTY, J. (Ed.). **Phage display of peptides and proteins**: a laboratory manual. Toronto: Academis Press, 1996. Chap.1, p.1-20.

WERNER, M.H.; WEMMER, D.E. Three-dimensional structure of soybean trypsin/chymotrypsin Bowman-Birk inhibitor in solution. **Biochemistry**, v.31, n.4, p.999-1010, 1992.

WILSON, D.R.; FINLAY, B.B. Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, n.4, p.313-329, 1998.

WITTRUP, K.D. Phage on display. **Trends in Biotechnology**, v.17, n.11, p.423-424, 1999.

YLINENJARVI, K.; WIDERSTEN, M.; BJORK, I. Hydrophobic sequences can substitute for the wild-type N-terminal sequence of cystatin A (stefin A) in tight binding to cysteine proteinase – Selection of high affinity N-terminal region variants by phage display. **European Journal of Biochemistry**, v.261, n.3, p.682-688, 1999.

ZANGERL, A.R. Furanocoumarin induction in wild parsnip: evidence for an induced defense against herbivores. **Ecology**, v.71, n.5, p.1926-1932, 1990.

APÊNDICE

(artigos)

Plant insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms.

Marcia O. Mello, Marcio C. Silva-Filho

Brazilian Journal of Plant Physiology, 14(2): 71-81, 2002.

Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms

Marcia O. Mello and Marcio C. Silva-Filho*

*Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, CP 83, 13.400-970 Piracicaba, SP, Brazil; *Corresponding author: mdcsilva@esalq.usp.br*
Received: 22/04/2002, Accepted: 05/07/2002

In this review, plant-insect interaction is discussed as a dynamic system, subjected to continual variation and change. Plants developed different mechanisms to reduce insect attack, including specific responses that activate different metabolic pathways which considerably alter their chemical and physical aspects. On the other hand, insects developed several strategies to overcome plant defense barriers, allowing them to feed, grow and reproduce on their host plants. This review foccuses on several aspects of this complex interaction between plants and insects, including chemical-derived substances, protein-derived molecules and volatile compounds of plants whereas metabolization, sequestration or avoidance are in turn employed by the insects.

Key words: adaptation, co-evolution, herbivory.

Interação planta-inseto: uma disputa evolutiva entre dois mecanismos de defesa distintos: Nesta revisão, a interação planta-inseto é abordada como um sistema dinâmico, sujeito a contínuas variações e mudanças. As plantas desenvolveram diferentes mecanismos para reduzir o ataque de insetos, incluindo respostas específicas que ativam diferentes vias metabólicas as quais alteram consideravelmente suas características químicas e físicas. Por outro lado, os insetos desenvolveram várias estratégias para superar as barreiras defensivas das plantas, permitindo a sua alimentação, desenvolvimento e reprodução em seus hospedeiros. Esta revisão enfoca vários aspectos desta complexa interação entre plantas e insetos, incluindo substâncias derivadas de compostos químicos, moléculas produzidas a partir do processamento de proteínas e compostos voláteis das plantas, enquanto que a metabolização, seqüestro ou fuga são empregados em contrapartida pelos insetos.

Palavras-chave: adaptação, co-evolução, herbivoria.

INTRODUCTION

The evolution of plants transformed the terrestrial environment into a highly valuable resource for the herbivore community. In natural ecosystems, plants and insects are just some of the living organisms that are continuously interacting in a complex way. These two organisms are intimately associated since insects have several beneficial activities including defense and pollination while plants provide shelter, oviposition sites and food, the three main factors requested for insect proliferation (Panda and Khush, 1995). On the other hand, depending on the intensity of insect attack, herbivores might be extremely harmful to plants leading them to death.

Plant-insect interaction is a dynamic system, subjected to continual variation and change. In order to reduce insect attack, plants developed different defense mechanisms including chemical and physical barriers such as the induction of defensive proteins (Haruta et al., 2001), volatiles that attract predators of the insect herbivores (Birkett et al., 2001), secondary metabolites (Baldwin, 2001 and references herein; Kliebenstein et al., 2001) and trichome density (Fordyce and Agrawal, 2001) (figure 1). In parallel, insects developed strategies to overcome plant barriers such as detoxification of toxic compounds (Scott and Wen, 2001), avoidance mechanisms (Zangerl, 1990), sequestration of poison (Nishida, 2002 and references herein) and alteration of gene expression pattern (Silva et al., 2001) (figure 1).

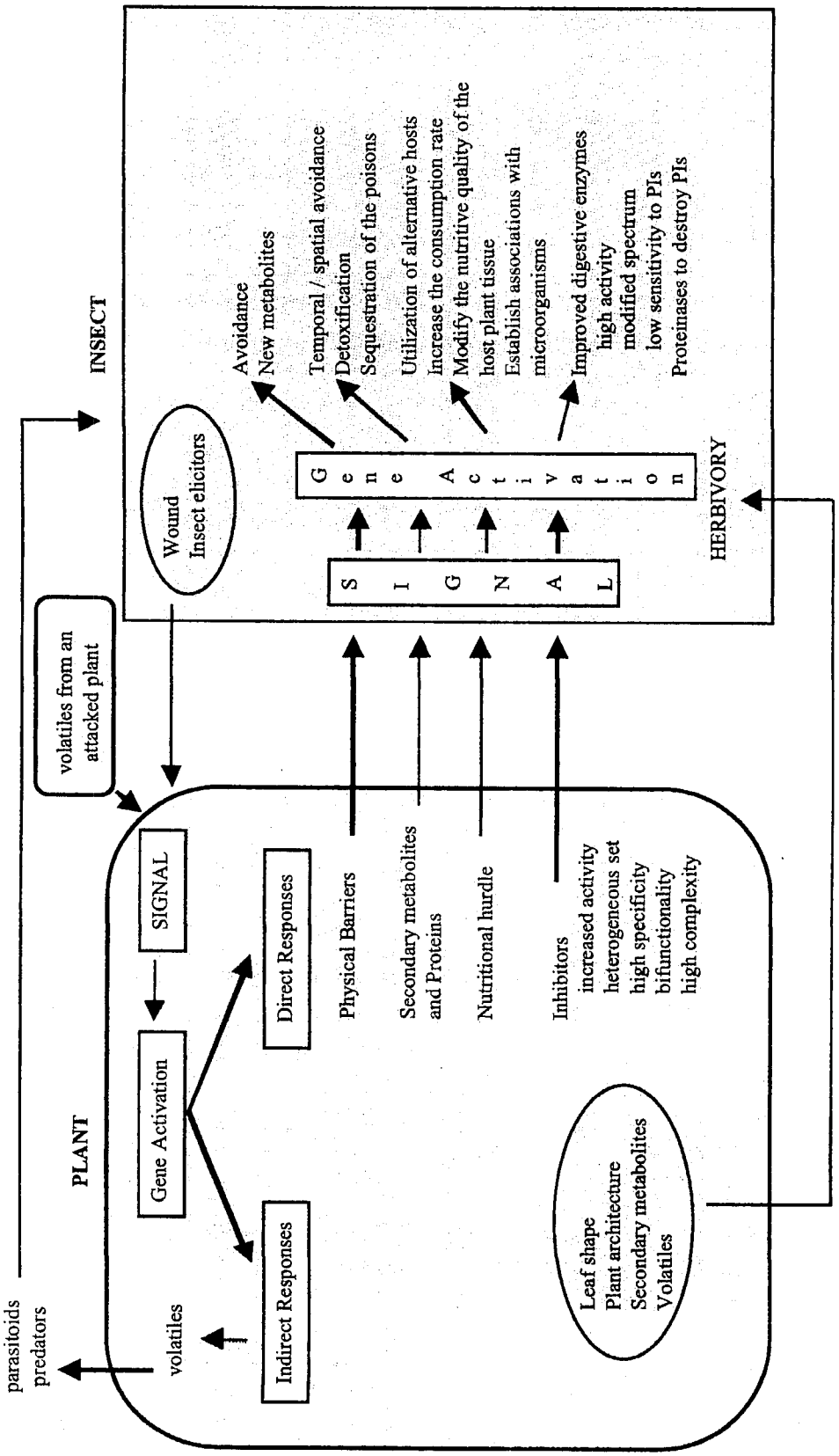

Figure 1. Interactions between plants and insects.

This is the base of the co-evolution theory proposed by Ehrlich and Raven in 1964. Even though this theory has been accepted by researchers, it is important to stress that certain plant defense compounds experience opposing selection pressure by different enemies and that major defensive barriers evolve in response to a diverse assemblage of herbivores and other biotic and abiotic factors (Stowe, 1998). Moreover, both organisms are under environmental pressures that have an important impact on this interaction system (Panda and Khush, 1995 and references herein). According to Stowe (1998), herbivores and other natural enemies challenge the plant resistance characters in multiple ways. On the other hand, plant populations counteract the facing mechanisms with a wide potential to respond to this selection pressure. figure 1 summarizes the aspects that will be discussed in this review as well as the mechanisms involved in plant-insect interaction.

Plant responses to insect attack

Plants produce chemicals for defense purposes in two different ways; first, as constitutive substances to repel herbivores through direct toxicity or by reducing the digestibility of plant tissues and second, as inducible substances synthesized in response to tissue damage by herbivores. These strategies are able to prevent most of the herbivores although there are a reduced number of insects that are able to adapt to specific plant species.

Secondary metabolites perform useful functions for the plant acting either in an inducible or constitutive manner. Some compounds are plant growth regulators while others act as chemical signals in the ecosystem, antibiosis agents, transport and storage of carbon and nitrogen molecules which are directly involved in the plant primary metabolism (Panda and Khush, 1995). Secondary plant compounds are involved in plant defense against insect herbivores acting as insect repellents, feeding inhibitors and/or toxins. In this paper, we have classified these toxic compounds into chemical-derived substances (table 1) and protein-derived molecules (table 2). Glucosinolates are an example of secondary metabolites involved in plant/insect interactions. This class of molecules varies qualitatively in *Arabidopsis* plants, generating diverse combinations in response to changing herbivory or other selective pressures (Kliebenstein et al., 2001). The emission of volatile compounds is another important mechanism affecting the behavior of insects searching for food. Odors from plants are one of the primary cues that insects use to find the host plant. For example, cabbage seed weevil seems to be orientated by a complex mixture of host plant volatiles (Bartlet et al., 1993). The presence of chemical volatile compounds in plants indicates a double meaning. First, they can repel a wide range of potential herbivores due to the nature of toxic compounds released in the air. Second, they have the property of attracting a small number of specialized pest species and also of acting as an indirect plant defense mechanism by attracting other insects that prey on or parasitize the herbivores (Birkett et al., 2000). According to Kessler and Baldwin (2001), the volatile cocktail released by tobacco plants attracts predatory bugs to tobacco hornworm eggs and feeding larvae dramatically increasing the predation rates. Furthermore, these released volatiles decrease oviposition rates from adult moths since adults avoid plants on which predators are likely to be present, decreasing herbivore loads by 90%. Plant volatiles may also act as signals between plants, where volatiles from a damaged tissue induce defense response in neighboring undamaged plants (Paré and Tumlinson, 1999). According to Paré and Tumlinson (1999), each plant produces a herbivore-specific blend of volatile components in response to a specific elicitor from a particular herbivore species feeding on the leaves. This strongly suggests the co-evolution between plants, herbivores and their natural enemies.

Wounds created by herbivory can be opportunistically used as points of invasion by microorganisms and represent an increased risk of future pathogen attack (Paul et al., 2000). But the induced resistance allows maximum expression of the plant's potential to tolerate either herbivory or disease. This has been experimentally shown by the observation that insect feeding induces the production of phytoalexins, which have antimicrobial properties (Ananthakrishnan, 1999). In addition, intact cells surrounding areas of damaged tissue form physical barriers to restrict pathogen invasion by strengthening the cell wall, sealing the wound site or isolating the cells from their neighbors (de Bruxelles and Roberts, 2001).

According to Haruta et al. (2001), *Populus tremuloides* employs a wide range of defensive strategies against insect herbivores involving both protein and phytochemical-based components. The complex array of

defense mechanisms has been adopted in most plant-herbivore interactions. Although the production of several plant compounds can be very efficient to reduce insect damage, it is costly in most cases. During a herbivore attack, a plant might suffer two kinds of fitness consequences: tissue loss and large investments required for resistance. These costs are an important component for the evolution of resistance because an evolutionary equilibrium should be established at intermediate levels of herbivory reduction and fitness (Paul et al., 2000). Therefore, plants might be able to circumvent allocation costs by evolving more efficient alternative biochemical pathways. Inducible defenses can be an alternative to reduce fitness cost since they minimize plant's expenditures by allowing it to invest in defense when necessary, and to avoid costly allocation to defense when herbivores are not present (Agrawal, 2000). Another alternative is used by some plants and is the suppression of the early and costly defense events at the moment of attack recognition (Baldwin, 2001).

Table 1. Secondary plant metabolites involved in host-plant resistance to insects.

Class/Subclass	Function	Reference
alkanes, aldehydes, ketones, waxes	protective layer	Panda and Khush (1995)
lignins, tannins	mechanical barrier, unpalatability, postabsorptive inhibition	de Bruxelles and Roberts (2001)
terpenoids (monoterpenoids, iridoids, sesquiterpenoids, diterpenoids, triterpenoids)	Toxicants, antibiotic, feeding deterrents, oviposition deterrents	Nishida (2002)
phenolics	toxicants, ovicidal, photosensitizing insects	Nishida (2002)
flavonoids (anthocyanins, flavonols, flavones, isoflavonoids)	antifeedant, phytoalexins, inhibition of mitochondrial oxidation	Ananthakrishnan (1999)
quinones	toxicants, antifeedant	Panda and Khush (1995)
alkaloids	toxicants, interfere in the nerve system, digestive enzyme inhibitor, antifeedant, glucosidase inhibitor	Panda and Khush (1995)
cyanogenic glycosides	toxicant	Panda and Khush (1995)
glucosinolates	repellent, toxicant, irritant, antibiotic	Kliebenstein et al. (2001)

Table 2. Protein-derived molecules involved in host-plant resistance to insects.

Class/Subclass	Function	Reference
lectins	interfere in the absorption of nutrients, increase the absorption of toxic substances	Falco et al. (2001)
chitinases	damage the insect midgut	Falco et al. (2001)
α-amylase inhibitors	digestive enzyme inhibitor	Silva et al (2001)
proteinase inhibitors	digestive enzyme inhibitors	Pompermayer et al (2001)
indole-3-glycerol phosphate lyase (IGL)	formation of free indol	Frey et al. (2000)
vegetative storage protein (VSP)	part of the systemic response	Stotz et al. (2000)
glutathione S-transferase (GST)	detoxify or inactivate toxic compounds	Stotz et al. (2000)
β-glucosidase 1 (BGL1)	unknown	Stotz et al. (2000)
calcium binding elongation factor (CaEF)	signaling pathway	Stotz et al. (2000)
Hevein-like protein (HEL)	unknown	Reymond et al (2000)
phospholipase A2	generation of second messenger	Falco et al. (2001)
MAPkinase	phosphorilation of transcription factors	Falco et al. (2001)
polyphenol oxidade (PPO)	reduction of the nutritive value of protein	Falco et al. (2001)
1-ami-ocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO)	ethylene biosynthesis	Reymond et al (2000)
allene oxide synthase (AOS)	JA biosynthesis	Reymond et al (2000)
phenylalanine amonia-lyase (PAL)	phenylpropanoid pathway	Arimura et al (2000)
Peroxidase	Lignin synthesis, hipersensitive response	Arimura et al (2000)
lipoxygenase (LOX)	JA biosynthesis	Arimura et al (2000)

Herbivory/wounding signaling pathways

The early events detected after wounding include ion fluxes across the plasma membrane, changes in cytoplasmic calcium concentration, generation of active oxygen species and changes in protein phosphorylation patterns (de Bruxelles and Roberts, 2001). These events lead to cell wall fortification at the wound site, alterations in metabolism and the generation of signals, which regulate defense gene expression. The signals that travel from damaged tissue throughout the plant include pectic fragments derived from the plant cell wall, jasmonic acid (JA), abscisic acid (ABA), ethylene, electrical potential, intermediates of the octadecanoid pathway (HPOTre, 12-oxo-PDA), systemin (an 18-amino acid polypeptide isolated from leaves of tomato plants) and other plant polypeptide molecules (Ryan and Pearce, 2001).

Even though mechanical wounding is part of the damage caused by an insect attack, there are important differences between these two mechanisms of plant damage. For example, the wound-induced increase in JA levels is amplified by herbivore feeding and by the application of larval oral secretions or regurgitant to mechanical wounds, as well as the release of volatiles that attract parasitoids in an indirect defense mechanism (Halitschke et al., 2001). Different feeding mechanisms may account for some of the differences, but different elicitors may also be involved (Paré and Tumlinson, 1999). These substances are present in the oral secretion of herbivores. Two known products that trigger the synthesis and emission of volatile chemical signals have been reported so far: a β-glucosidase from *Pieros brassicae* caterpillars (Mattiacci et al., 1995) and a low-Mr fatty acid derivative, N-(17-hydroxylinolenoyl)-L-Gln (volicitin) from beet army-worm caterpillars (Alborn et al., 1997).

After leaf damage and introduction of the elicitors, several not well-characterized events occur. In essence, systemin is released into the vascular system of damaged tissue activating the octadecanoid signaling cascade. Several reactions result in JA biosynthesis, up regulation of the synthesis of signal pathway genes (early genes) in the vascular bundles, and H_2O_2, which is a second messenger, that activates putative defense genes (late genes) such as the antifeedant proteinase inhibitor genes in mesophyll cells (de Bruxelles and Roberts, 2001; Orozco-Cárdenas et al., 2001). Even though JA is thought to be the predominant defense signal against chewing insects, ethylene seems to be an important defense modulator in different plant species, acting concomitantly or sequentially with JA in receiver leaves (Arimura et al., 2000; Stotz et al., 2000).

Herbivore-induced plant gene expression

The chemical and physical aspects of a plant are considerably altered following phytophagy. Induced responses to herbivory can reduce the preference and performance of a variety of herbivores, increase competitive ability against non-induced neighboring plants, increase tolerance to subsequent herbivory and, ultimately, increase plant fitness in natural environments (Agrawal, 2000). In addition, this represents an adaptive plasticity since the induced phenotype has greater fitness under strong herbivory while the non-induced phenotype shows the greatest fitness in an environment with low herbivory.

Several genes are selectively activated by volicitin, systemin or volatiles released from attacked plants. The genes encoding indole-3-glycerol phosphate lyase (IGL), that catalyses the formation of free indol, an important step in the formation of defense secondary metabolites (Frey et al., 2000), and allene synthase (AOS), that catalyzes the first step in JA biosynthesis (Reymond et al., 2000), are induced by herbivory. Additionally, Arimura et al. (2000) showed that volatiles released from lima bean leaves infested with *Tetranychus urticae* activated the expression of different classes of defense genes such as: lipoxygenase (LOX) via the octadecanoid pathway, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in the phenylpropanoid pathway, farnesyl pyrophosphate synthase in the isoprene biosynthetic pathway and pathogen-related (PR) genes in receiver leaves. On the other hand, the following gene products were induced in *Arabidopsis* rosette leaf tissue as a consequence of diamondback moth feeding: LOX2 (lypoxygenase), VSP (vegetative storage proteins), GST (glutathione S-transferase), BGL1 (β-glucosidase 1) and CaEF (calcium binding elongation factor) (Stotz et al., 2000) (table 2). In a large survey on *Arabidopsis* leaves mechanically wounded or attacked by *Pieris rapae* using a c-DNA micro-array technique, Reymond et al. (2000) reported that a significant amount of genes was shown to be strongly up-regulated. Interestingly, another class of defense proteins, the Hevein-like protein (HEL), was only

induced after insect feeding. On the other hand, many inducible genes were not induced by insect feeding. Studies on molecular interaction between *Manduca sexta* and *Nicotiana attenuata* demonstrated that the abundance of transcripts of the three photosynthesis (*chl*H, *lhb*C1 and *rbc*S), latex (pDH6.1) and cytoskeletal (pDH9.4) related genes, is strongly diminished by herbivory. This herbivore-induced suppression might benefit the plant allowing the redirection of the carbon flux toward defenses (Hermsmeier et al., 2001). In sugarcane, a computer-assisted analysis of 26 different cDNA libraries from the Sugarcane EST (Expressed Sequence Tag) Project (SUCEST) identified several orthologues of genes involved in plant response to insect damage either as signal receptors, signal pathway and proteolysis associated or defensive related proteins (Falco et al., 2001).

Storage proteins and plant defense

The synthesis and accumulation of a variety of storage proteins have been shown to be closely related to plant defense since several of these proteins present entomotoxic properties such as α-amylase and proteinase inhibitors, lectins and globulins. These proteins are usually present in seeds and vegetative organs of leguminous plants (Negreiros et al., 1991; Sales et al., 2000; Franco et al., 2002).

Proteinase inhibitor (PI) levels in plant leaves are normally low but they can be actively induced to high levels when plants are attacked by insects, suffer mechanical damage or are exposed to exogenous phytohormones (Rakwal et al., 2001). In addition to a local inducible synthesis of PIs, it was demonstrated that specific signals from the damaged tissue are transported via phloem and stimulate the synthesis of PIs throughout the plant (Jongsma and Bolter, 1997). Plant proteinase inhibitors function as specific substrates for the digestive proteinases, forming a stable complex in which proteolysis is limited and extremely slow (Tiffin and Gaut, 2001). Ultimately, proteinase inhibitors act by causing an amino acid deficiency influencing the insect growth, development and eventually causing their death either by inhibition of gut proteinases or due to a massive overproduction of the digestive enzymes, reducing the availability of essential amino acids for the production of other proteins (Jongsma and Bolter, 1997; Pompermayer et al., 2001). Slowing herbivore growth, these inhibitors prolong the time that predators could be attracted to plants by the volatile release. Direct defenses that extend the time during which larvae remain in these instars would probably increase the effectiveness of the indirect defense Baldwin (2001).

Transgenic tomato plants overexpressing the prosystemin transgene have been shown to accumulate a soluble cystatin constitutively. In leaves of wild-type tomato plants, cystatin mRNA accumulated systemically in response to wounding, treatment with metyl jasmonate and when supplied with systemin (Siqueira-Junior et al., 2002). According to the authors, midgut homogenate of third-instar larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* had their proteolytic activity content significantly inhibited by tomato cystatin.

Moura and Ryan (2001) demonstrated that the induction of proteinase inhibitors in pepper in response to herbivore is regulated through the octadecanoid-signaling pathway. However, there are some differences in the process in pepper when compared to the process previously described for tomato (Pearce et al., 1991). According to the authors, this could indicate that PI-encoding genes in different species might have evolved to defend them against specific pests and pathogens belonging to their unique ecological niches. Besides a rapid response to insect attack, induced PIs can play a preventive role in plant defense. For example, attacked *Populus tremuloides* leaves accumulate trypsin inhibitor within 2 days in turn to reduce subsequent damage (Haruta et al., 2001).

During evolution, plants and insects developed ecological, physiological and biochemical mechanisms to weaken the effect of insect proteinases and plant proteinase inhibitors, respectively. Plants evolved extraordinary characteristics against insect proteinases by increasing the inhibitor activity in their tissues (Rakwal et al., 2001), by developing a heterogeneous set of inhibitors possessing activities to various enzymes (Christeller et al., 1998), by producing bifunctional inhibitors which are active to amylases and proteinases (Roy and Gupta, 2000), by increasing the complexity of inhibitors with different biochemical properties through the production of isoinhibitors (Tiffin and Gaut, 2001), by forming highly specific inhibitors of insect enzymes (Falco et al., 2001) and by the synthesis of inhibitors

resistant to proteolysis and active under diverse gut pH (Christeller et al., 1998). In their turn, insects have found diverse ways of avoiding negative effects caused by the proteinase inhibitors present on their host plants. These include the increase in the activity of their digestive enzymes or by the synthesis of less sensitive enzymes (Paulillo et al., 2000), the modification of the spectrum or the relative activities of various digestive hydrolases (Patankar et al., 2001), the breakdown of the inhibitors in the gut via proteinases (Girard et al., 1998) and the decrease of the sensitivity of their enzymes to the inhibitors (Brito et al., 2001) by a rapid response that up-regulates the gene expression of PI-insensitive proteinases in order to compensate for the inhibited ones.

Lectins are carbohydrate-binding proteins usually found in legume plants, mainly in the storage organs and protective structures (Ramos et al., 2001). The common bean (*Phaseolus vulgaris*) presents three classes of these insecticidal proteins, phytohemagglutinins, arcelins and α-amylase inhibitors which comprise the bean-lectin gene family (Moreno and Chrispeels, 1989; Chrispeels and Raikhel, 1991). The entomotoxic effect of plant lectins has been evaluated in different insect orders. The jack bean (*Canavalia ensiforms*) lectin was shown to interfere in insect development in both the Lepidoptera (*Lacanobia oleracea*) and Hemiptera (*Myzus persicae* and *Rhodnius prolixus*) orders (Gatehouse at al., 1999; Ferreira-da-Silva et al., 2000).

Vicilins, which belong to the globulin family, are another class of storage protein found in leguminous seeds (Oliveira et al., 1999). They bind strongly to several chitin-containing structures found in insect midguts and cell walls or plasma membranes of filamentous fungi and yeast, interfering negatively in the growth and development of the invader organism (Sales et al., 2000). These proteins are responsible for the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to *Callosobruchus maculatus* (Macedo et al., 1993). Part of this resistance could be accounted for by the low rates of vicilins hydrolysis by the *C. maculatus* midgut enzymes (Sales et al., 1992).

Insect response mechanisms

Insects have developed different patterns of host plant associations coupled with different life histories and feeding strategies necessary for the exploitation of their hosts (Panda and Khush, 1995). According to Price (1997), closely related plants support closely related insects. This is due to the evolutionary process where slight but permanent changes in insect enzyme assortment permitted the exploitation of closely related plants. When an insect species develops a mechanism that enables it to use a toxic plant for food, several advantages are observed. This plant can be easily recognized by its secondary compounds and constitutes a source of food that can be used by very few other herbivores, minimizing the competition. This has a protective implication since the antibiotic properties of many toxic chemicals may protect the herbivore against pathogens and feeding on this food may also impart a toxic or unpalatable characteristic to the herbivore, reducing predation.

Insect adaptation to plant defense barriers

Insect herbivores present complementary adaptations as a response to each defensive adaptation in host plants (figure 1). It is evident that insects are successful in terms of number of species and population size (Price, 1997). Plant chemical composition is variable and represents a challenge for insect feeding. However, insects possess a powerful assemblage of enzymes that constitute their defense against chemical toxicants. One of the strategies to overcome this problem is the detoxification of defense chemicals by oxidation, reduction, hydrolysis or conjugation of molecules (Scott and Wen, 2001). An interesting case of interaction between host plants and herbivore insects was shown by Berenbaum and Zangerl (1998). In this study, variations in plant production of furanocoumarins were accompanied by variation in the ability of the insect to metabolize these compounds. According to the authors, these high levels of matching between phenotypes suggest that the genes conferring ability to exploit hosts are tightly linked. An example of genes involved in plant-insect interactions and insect physiology is the cytochrome P450-dependent monooxygenase. Studying *Papilio polyxenes* behavior, Scott and Wen (2001) demonstrated that this insect appears to have adapted to feeding on toxin-containing host plants through a diversification of the P450s involved in detoxification and through its furanocoumarin-responsive regulatory cascades.

Another manner for insects to avoid plant poisons is by sequestering and deploying the poisons for their own

pheromone system and defense (Nishida, 2002), or simply feeding on parts of the plant that lack these compounds (Zangerl, 1990). Lepidoptera sequesters plant secondary metabolites such some terpenes, phenols and many nitrogen-containing compounds and uses them as toxic or unpalatable to predators (Nishida, 2002). An example of this adaptation is illustrated by the tobacco hornworm. This insect accumulates the nicotine synthesized by tobacco plants in its own body which is toxic to most insects and uses it as a deterrent to parasitoids (de Bruxelles and Roberts, 2001). On the other hand, the presence of caffeine, the major alkaloid in coffee, is not effective against the *Perileucoptera coffeella* larvae. This suggests that insect adaptation to this potentially toxic compound was probably due to a tolerance mechanism (Guerreiro and Mazzafera, 2000). Recently, an interesting mechanism of avoiding toxic substances was observed by Musser et al. (2002). In their research, glucose oxidase, one of the principal components of *Helicoverpa zea* saliva, was detected as responsible for suppressing induced resistance in tobacco plants. They infer that this enzyme may prevent the induction of nicotine by inhibition of the signaling pathway.

Natural selection acts in a way to synchronize insect and plant life cycles. Then, insects can feed, grow and reproduce when plants are actively growing and represent a suitable source of nutrients and shelter. If dietary quality changes, insects have the ability to overcome this situation by using different parts of the plant, increasing the consumption rate (Slansky and Weeler, 1989), modifying the nutritive quality of host plant tissues or establishing associations with symbiont microorganisms. The way they adjust their food quality intake and assimilation rate assures the maintenance of their growth and development.

Protein inhibitors are important plant chemical barriers that should be circumvented by herbivore insects. Patankar et al. (2001) showed that *Helicoverpa armigera* larvae is able to overcome the effect of various host plant PIs by altering its midgut composition after PIs ingestion, that was also observed for *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* (Mazumdar-Leighton and Broadway, 2001a,b). Newly synthesized trypsins from *Heliothis virescens* form oligomers are less affected by PIs since they bind tighter to the substrate and putatively decrease affinity for PIs (Brito et al., 2001). Recently, Mazumdar-Leighton and Broadway (2001a) showed that lepidopteran insects have constitutive trypsins and trypsins induced after ingestion of PIs that are insensitive to the inhibitors. Similar results were also reported for chymotrypsins (Mazumdar-Leighton and Broadway, 2001b) and α-amylase (Silva et al., 2001). In addition, production of PI-digesting proteinases allows the insect to overcome the plant defense and also to use the digested inhibitor as a source of amino acids (Girard et al., 1998).

Generalists x Specialists

According to Bernays and Chapman (1994), plant-feeding insects can be classified as generalist or specialist herbivores. Generalist insect herbivores rear on a wide variety of plant species and their adaptive mechanisms are more complex since polyphagous insects tend to respond to a large array of different plant chemicals and proteins. On the other hand, specialist insect herbivores hosting only on a few related plant species might be expected to have a more efficient form of adaptation, either involving the production of large quantities of an enzyme to detoxify their food, or evolve storage mechanisms (Jongsma and Bolter, 1997; Price, 1997; Patankar et al., 2001). Eruptive insect herbivores commonly adopt a generalist feeding strategy. Even though they are able to grow and develop on a variety of host plant species, their performance is highly influenced. Some of the observed effects are reduced growth and larval survival (Lazarevic et al., 1998), abnormal development at the pupal stage, delay in adult emergence (Hunter and McNeil, 1997), decrease of adult weight (Tikkanen et al., 2000) and finally, a reduced number of generations (Hunter and McNeil, 1997; Tikkanen et al., 2000). The majority of insect herbivores are relative specialists, using a restricted number of hosts with similar phytochemicals and taking advantage to colonize an open niche (Bernays, 2001). During the course of evolution, specialist herbivores adapted to plant chemical defenses developing mechanisms that use these chemicals as attractants. These insects frequently detoxify or sequester plant defense compounds and, sometimes, they result in protection against parasitoids and predators being used as toxic or unpalatable at defense. Sequestering specialists have developed the ability to incorporate these compounds with relative impunity, ingesting, transporting and depositing the substances to be sequestered in particular sites of the larvae, adult body and even in the eggs (Nishida, 2002). Further, these compounds are of great

importance since they provide insects with signals for identification of the host, turning the process of host finding at feeding and oviposition rapid and efficient. On the other hand, secondary metabolites of a non-host plant have the potential to deter specialists that show an equal sensitivity to these phytochemicals. The ability to choose superior hosts is shown to be greater in specialists than in relative generalists in the presence of a choice of mixed-quality hosts (Bernays, 2001).

The co-evolution of plants and insects is very intriguing. Plants have developed efficient mechanisms to protect them against herbivory while insects have found diverse ways of avoiding negative effects of their host plants defense mechanisms. Even though many workers have attempted to study plant-insect interaction, our knowledge is still limited. The better understanding of this process will allow us to achieve more effective methods for the biological control of insect pests with natural products by the development of new plant varieties with enhanced chemical defenses.

Acknowledgments: This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant 97/04934-3, and Pronex. M.O.M. is supported by a graduate fellowship from FAPESP. M.C.S.F. is a research fellow of CNPq (Brasília, Brazil).

REFERENCES

Agrawal AA (2000) Benefits and costs of induced plant defense for *Lepidium virginicum* (Brassicaceae). Ecology 81:1804-1813.

Alborn HT, Turlings TC, Jones TH, Stenhagen G, Loughrin JH, Tumlinson JH (1997) An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. Science 276:945-949.

Ananthakrishnan TN (1999) Induced responses, signal diversity and plant defense: Implications in insect phytophagy. Curr. Sci. 76:285-290.

Arimura G-I, Ozawa R, Shimoda T, Nishioka T, Boland W, Takabayashi J (2000) Herbivory-induced volatiles elicit defense genes in lima bean leaves. Nature 406:512-515.

Baldwin IT (2001) An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. Plant Physiol. 127:1449-1458.

Bartlet E, Blight MM, Hick AJ, Williams IH (1993) The responses of the cabbage seed weevil (*Ceutorhynchus assimilis*) to the odour of oilseed rape (*Brassica napus*) and to some volatile isothiocyanates. Entomol. Exp. Appl. 68:295-302.

Berenbaum MR, Zangerl AR (1998) Chemical phenotype matching between a plant and its insect herbivore. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95:13743-13748.

Bernays EA (2001) Neural limitations in phytophagous insects: Implications for diet breadth and evolution of host affiliation. Annu. Ver. Entomol. 46:703-727.

Bernays EA, Chapman RF (1994) Host plant selection by phytophagous insects. Chapman and Hall, London.

Birkett MA, Campbell CAM, Chamberlain K, Guerrieri E, Hick AJ, Martin JL, Matthes M, Napier JA, Pettersson J, Pickett JA, Poppy GM, Pow EM, Pye BJ, Smart LE, Wadhams GH, Wadhams LJ, Woodcock CM (2000) New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97:9329-9334.

Brito LO, Lopes AR, Parra JRP, Terra WR, Silva-Filho, MC (2001) Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by synthesis of new proteinases. Comp. Biochem. Physiol. 128:365-375.

Chrispeels MJ, Raikhel NV (1991) Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. Plant Cell 3:1-9.

Christeller JT, Farley PC, Ramsay RJ, Sullivan PA, Laing WA (1998) Purification, characterization and clonning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. Eur. J. Biochem. 254:160-167.

de Bruxelles GL, Roberts MR (2001) Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. Crit. Ver. Plant Sci. 20:487-521.

Ehrlich PR, Raven PH (1964) Butterflies and plants: A study in coevolution. Evolution 18:586-608.

Falco MC, Marbach PAS, Pompermayer P, Lopes FCC, Silva-Filho MC (2001) Mechanisms of sugarcane response to herbivory. Genet. Mol. Biol. 24:113-122.

Ferreira-da-Silva CT, Gombarovits ME, Masuda H, Oliveira CM, Carlini CR (2000) Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. Arch. Insect Biochem. Physiol. 44:162-171.

Fordyce JA, Agrawal AA (2001) The role of plant trichomes and caterpillar group size on growth and defense of the pipevine swallowtail *Battus philenor*. J. Animal Ecol. 70:997-1005.

Franco OL, Rigdn DJ, Melo FR, Grossi-de-Sá MF (2002) Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases. Eur. J. Biochem. 269:397-412.

Frey M, Stettner C, Paré PW, Schmelz EA, Tumlinson JH, Gierl A (2000) An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97:14801-14806.

Gatehouse AMR, Davison GM, Stewart JN, Galehouse LN, Kumar A, Geoghegan IE, Birch ANE, Gatehouse JA (1999) Concanavalin A inhibits development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) and pesch-potato aphid (*Myzus persicae*) when expressed in transgenic potato plants. Mol. Breed. 5:153-165.

Girard C, Métayer ML, Bonadé-Bottino M, Pham-Delègue M-H, Jouanin L (1998) High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in bettle larvae. Insect Biochem. Mol. Biol. 28:229-237.

Guerreiro Filho O, Mazzafera P (2000) Caffeine does not protect coffee against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. J. Chem. Ecol. 26:1447-1464.

Halitschke R, Schittko U, Pohnert G, Boland W, Baldwin IT (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidopetra, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty Acid-Amino Acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. Plant Physiol. 125:711-717.

Haruta M, Major IT, Christopher ME, Patton JJ, Constabel CP (2001) A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): clonning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. Plant Mol. Biol. 46:347-359.

Hermsmeier D, Schittko U, Baldwin IT (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidopetra, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. Plant Physiol. 125:6883-7000.

Hunter MD, McNeil JN (1997) Host-plant quality influences diapause and voltinism in a polyphagous insect herbivore. Ecology 78:977-986.

Jongsma MA, Bolter C (1997) The adaptation of insects to plant protease inhibitors. J. Insect Physiol. 43:885-895.

Kessler A, Baldwin IT (2001) Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. Science 291:2141-2144.

Kliebenstein DJ, Kroymann J, Brown P, Figuth A, Pedersen D, Gershenzon J, Mitchell-Olds T (2001) Genetic control of natural variation in Arabidopsis glucosinolate accumulation. Plant Physiol. 126:8811-8825.

Lazarevic J, Peric-Mataruga V, Ivanovic J, Andjelkovic M (1998) Host plant effects on the genetic variation and correlations in the individual performance of the gypsy moth. Funct. Ecol. 12:141-148.

Macedo MLR, Andrade LBS, Moraes RA, Xavier-Filho J (1993) Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). Comp. Biochem. Physiol. 105C:89-94.

Mattiacci L, Dicke M, Posthumus MA (1995) β-glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. Proc. Natl Acad. Sci. USA 92:2036-2040.

Mazumdar-Leighton S, Broadway RM (2001a) Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. Insect Biochem. Mol. Biol. 31:645-657.

Mazumdar-Leighton S, Broadway RM (2001b) Identification of six chymotrypsin cDNAs from larval midguts of *Helicoverpa zea* and *Agrotis ipsilon* feeding on the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor. Insect Biochem. Mol. Biol. 31:633-644.

Moreno J, Chrispeels MJ (1989) A lectin gene encodes the alpha-amylase inhibitor of the common bean. . Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:7885-7889.

Moura DS, Ryan, CA (2001) Wound-inducible proteinase inhibitors in peper. Differential regulation upon wounding, systemin, and methyl jasmonate. Plant Physiol. 126:289-298.

Musser RO, Hum-Musser SM, Eichenseer H, Peiffer M, Ervin G, Murphy JB, Felton GW (2002) Caterpillar saliva beats plant defences. Nature 416:599-600.

Negreiros AN, Carvalho MM, Xavier-Filho J, Blanco-Labra A, Shewry PR, Richardson M (1991) The complete amino acid sequence of the major Kunitz trypsin inhibitor from the seeds of Prosopsis juliflora. Phytochemistry 30:2829-2833.

Nishida R (2002) Sequestration of defensive substances from plants by lepidoptera. Annu. Rev. Entomol. 47:57-92.

Oliveira AEA, Sales MP, Machado OLT, Fernandes KVS, Xavier-Filho J (1999) The toxicity of the jack bean (*Canavalia ensiformis*) cotyledonary and testa proteins to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). Entomol. Exp. Appl. 92:249-255.

Orozco-Cárdenas ML, Narváez-Vásquez J, Ryan CA (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in

response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. The Plant Cell 13:179-191.

Panda N, Khush GS (1995) Host plant resistance to insects. CAB International, Wallingford.

Paré PW, Tumlinson JH (1999) Plant volatiles as a defense against insect herbivores. Plant Physiol. 121:325-331.

Patankar AG, Giri AP, Harsulkar AM, Sainani MN, Deshpande VV, Ranjekar PK, Gupta VS (2001) Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. Insect Biochem. Mol. Biol. 31:453-4644.

Paul ND, Hatcher PE, Taylor JE (2000) Coping with multiple enemies: an integration of molecular and ecological perspectives. Trends Plant Sci. 5:220-225.

Paulillo LCMS, Lopes AR, Cristofoletti PT, Parra JRP, Terra WR, Silva-Filho MC (2000) Changes in midgut endopeptidase activity of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. J. Econ. Entomol. 93:892-896.

Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. Science 253:8995-8998.

Pompermayer P, Lopes AR, Terra WR, Parra JRP, Falco MC, Silva-Filho MC (2001) Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. Entomol. Exp. Appl. 99:79-85.

Price PW (1997) Insect Ecology. 3rd edn. John Wiley & Sons, Inc, New York.

Ramos MV, Sampaio AH, Cavada BS, Calvete JJ, Grangeiro TB, Debray H (2001) Characterization of the sugar-binding specificity of the toxic lectins isolated from *Abrus pulchellus* seeds. Glycoconj. J. 18:391-400.

Rakwal R, Agrawal GK, Jwa NS (2001) Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor:tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. Gene 263:189-198.

Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. The Plant Cell 12:707-719.

Roy I, Gupta MN (2000) Purification of a "double-headed" inhibitor of alpha-amylase/proteinase K from wheat germ by expanded bed chromatography. Bioseparation 9:239-245.

Ryan CA, Pearce G (2001) Polypeptide hormones. Plant Physiol. 125:65-68.

Sales MP, Macedo MLR, Xavier-Filho J (1992) Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and bruchid midgut proteinases. Comp. Biochem. Physiol. 103B:945-950.

Sales MP, Gerhardt IR, Grossi-de-Sá MF, Xavier-Filho J (2000) Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? Plant Physiol. 124:515-522.

Scott JG, Wen ZM (2001) Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. Pest Manag. Sci. 57:958-967.

Silva CP, Terra WR, de Sá MFG, Samuels RI, Isejima EM, Bifano TD, Almeida JS (2001) Induction of digestive α-amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α-amylase inhibitor 1. J. Insect Physiol. 47:1283-1290.

Siqueira-Junior CL, Fernandes KVS, Machado OLT, da Cunha M, Gomes VM, Moura D, Jacinto T (2002) 87kDa tomato cystatin exhibits properties of a defense protein and forms protein crystals in prosystemin overexpressing transgenic plants. Plant Physiol. Biochem. 40:247-254.

Slansky JrF, Wheeler GS (1989) Compensatory increases in food consumption and utilization efficiencies by velvetbean caterpillars mitigate impact of diluted diets on growth. Entomol. Exp. Appl. 51:175-187.

Stotz, HU, Pittendrigh BR, Kroymann J, Weniger K, Fritsche J, Bauke A, Mitchell-Olds T (2000) Induced plant defense responses against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of Arabidopsis against egyptian cotton worm but not diamondback moth. Plant Physiol. 124:1007-1017.

Stowe KA (1998) Experimental evolution of resistance in *Brassica rapa*: Correlated response of tolerance in lines selected for glucosinolate content. Evolution 52:703-712.

Tiffin P, Gaut BS (2001) Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip1 in zea and related genera. Mol. Biol. Evol. 18:2092-2101.

Tikkanen O-P, Niemelä P, Keränen J (2000) Growth and development of a generalist insect herbivore, *Operophtera brumata*, on original and alternative host plants. Oecologia 122:529-536.

Zangerl AR (1990) Furanocoumarin induction in wild parsnip: evidence for an induced defense against herbivores. Ecology 71:1926-1932.

Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants.

Marcia O. Mello, Aparecida S. Tanaka, Marcio C. Silva-Filho

Molecular Phylogenetics and Evolution, 2002.

YMPEV 1253
DISK / 7/10/02
ARTICLE IN PRESS
No. of pages: 10
DTD 4.3.1/SPS

ACADEMIC PRESS

Molecular Phylogenetics and Evolution xxx (2002) xxx–xxx

MOLECULAR PHYLOGENETICS AND EVOLUTION

www.academicpress.com

Molecular evolution of Bowman–Birk type proteinase inhibitors in flowering plants

Marcia O. Mello,[a] Aparecida S. Tanaka,[b] and Marcio C. Silva-Filho[a,*]

[a] *Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, C.P. 83, 13400-970 Piracicaba, SP, Brazil*

[b] *Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, Rua 3 de Maio, 100, 04044-020 São Paulo, SP, Brazil*

Received 16 May 2002; Revised in revised from 21 August 2002

Abstract

The Bowman–Birk family (BBI) of proteinase inhibitors is probably the most studied family of plant inhibitors. We describe the primary structure and the gene expression profile of 14 putative BBIs from the sugarcane expressed sequence tag database and show how we used these newly discovered sequences together with 87 previously described BBI sequences from the GenBank database to construct phylogenetic trees for the BBI family. Phylogenetic analysis revealed that BBI-type inhibitors from monocotyledonous and dicotyledonous plants could be clearly separated into different groups, while the overall topology of the BBI tree suggests a different pattern of evolution for BBI families in flowering plants. We also found that BBI proteinase inhibitors from dicotyledonous plants were well conserved, accumulating only slight differences during their evolution. In addition, we found that BBIs from monocotyledonous plants were highly variable, indicating an interesting process of evolution based on internal gene duplications and mutation events.

© 2002 Published by Elsevier Science (USA).

1. Introduction

Plants contain a variety of serine proteinase inhibitors which are divided into 16 classes (Ryan, 1990); with soybean trypsin inhibitors (Kunitz), Bowman–Birk inhibitors, potato inhibitors I and II being four of the better studied classes. Bowman–Birk proteinase inhibitors (BBI) were first isolated and characterized in soybean seeds (Birk et al., 1963; Bowman, 1946) and later found in other leguminous plants (Norioka and Ikenaka, 1983; Tanaka et al., 1997) and in the Poaceae (Odani et al., 1986). A cyclic, 14 amino acid, BBI from sunflower seeds has been characterized and suggested as being the most potent BBI yet discovered (Korsinczky et al., 2001).

BBI proteinase inhibitors are double-headed serine proteinase inhibitors with a low molecular mass of 8–20 kDa and a high cysteine content (Odani and Ikenaka, 1976), the cysteines being important in maintaining the active conformation of the inhibitor with the disulphide link between two cysteines holding the inhibitory loops of the inhibitor open, thus allowing the target enzyme to gain access (Prakash et al., 1996). Three-dimensional structure of peanut, soybean, and barley BBIs (Song et al., 1999; Suzuki et al., 1987; Werner and Wemmer, 1992) revealed that disulphide bridges occur mostly between two conserved cysteine residues (e.g., C_1–C_{14}, C_2–C_6, C_3–C_{13}, C_4–C_5, C_7–C_9, C_8–C_{12}, C_{10}–C_{11}) in all three studied inhibitors. It makes them very conserved residues during evolution. The loops (or reactive sites) are known to inhibit trypsin and chymotrypsin in monocotyledonous plants and trypsin, chymotrypsin, and elastase in dicotyledonous plants.

The physiological significance of BBI-type proteins is associated with their three major roles in plants: regulation of endogenous seed proteinases, storage of sulfur amino acids, and defense against pathogens and insect attack. In the latter case, they appear to have an anti-digestive effect, through proteolysis inhibition (Pompermayer et al., 2001; Tanaka et al., 1996; Tiffin and Gaut, 2001). Supporting evidence for their role in plant defense is, that herbivore or wound induced trypsin inhibitors belonging to the Bowman–Birk family have

* Corresponding author. Fax: +55-19-34336706.
E-mail address: mdcsilva@esalq.usp.br (M.C. Silva-Filho).

1055-7903/02/$ - see front matter © 2002 Published by Elsevier Science (USA).

been isolated and characterized from maize coleoptiles (Rohrmeier and Lehle, 1993), alfalfa (McGurl et al., 1995), and rice leaves (Rakwal et al., 2001).

In the study reported in this paper we identified 14 sugarcane BBI-type sequences and examined the heterogeneity of their amino acid composition and the pattern of BBI gene expression throughout the plant using computer-aided analysis. We also present a new phylogenetic study based on the analysis and characterization of another 87 BBI-type proteins from monocotyledonous and dicotyledonous plants present in the GenBank databank. In our survey of naturally occurring BBI variation, we propose a scheme of evolutionary events for BBIs that act in flowering plants based on multiple alignment and phylogenetic tree. A possible evolutionary implication of this is also discussed.

2. Materials and methods

2.1. Identification of BBI sequences

We searched the GenBank database and found 136 amino acid sequences of Bowman–Birk type proteinase inhibitors. These sequences were initially identified by basic local alignment search tool (BLAST) searches (Altschul et al., 1990) using the BBI-1 from *Glycine max* (P01055) as the query sequence (Odani and Ikenaka, 1972). To minimize duplication of nearly identical sequences of the same proteins, we compared the 136 sequences and selected 87 different sequences for further study. The BBI sequence alignments were performed with the progressive multiple sequence alignment CLUSTAL_W program (Thompson et al., 1994) using the standard alignment parameters. Protein distance matrices were calculated using the Gonnet matrix and un-rooted evolutionary trees constructed by the neighbor-joining method (Saiton and Nei, 1987). Support for nodes was estimated by the bootstrap procedure, using 1000 re-samplings of the data. The un-rooted phylogenetic trees were graphically displayed using the TreeView program, version 1.5 (Page, 1996).

2.2. SUCEST database

The Sugarcane Expressed Sequence Tag (SUCEST) transcriptome project (http://sucest.lad.ic.unicamp.br/en/) is a large scale Expressed Sequence Tag (EST) program, the database of which contains 43,000 EST clusters from 27 cDNA libraries prepared from several sugarcane tissues (Vettore et al., 2001). Computer-aided analysis and similarity searches against known sequences deposited in public databases have been performed in order to identify sugarcane ESTs.

2.3. Identification of sugarcane cluster consensi

Sugarcane EST cluster consensi were identified by a BLAST search using the soybean (P01055), rice (BAB40052), maize (P31862), and wheat (P81713) BBI sequences as query sequences for the SUCEST database. We used the identified SUCEST clusters as query sequence in a new BLAST search in the GenBank and only those closest related to a known Bowman–Birk inhibitor were considered as putative BBI sequences. The resulting sequences were further filtered to require the presence of specific inhibitory loops as well as conserved cysteine residues, yielding 14 strong candidates (AY093804, AY093805, AY093806, AY093807, AY093808, AY093809, AY093810, AY093811, AY093812, AY093813, AY093814, AY093815, AY093816, AY093817). Un-rooted trees were constructed using all the 101 sequences, i.e., the 87 BBI GenBank sequences plus the 14 SUCEST sequences.

2.4. Computer-simulated expression analysis

Assuming that synthesis, ligation of the cDNA to the vector and transformation events occur randomly, the quantity of an individual ESTs in a particular cDNA library is probably proportional to the expression level of the mRNAs for that sequence. The SUCEST database is composed of non-normalized cDNA libraries from different tissues, with a defined number of ESTs per library. Quantitative and qualitative expression analysis of the putative Bowman–Birk inhibitors in different sugarcane tissues was done by computer-simulated Northern blot experiments. In this way, a correlation was made between the number of BBI protein ESTs and the total number of ESTs in a particular cDNA library.

3. Results

3.1. Multiple alignment BBI sequences

The BBI family of proteinase inhibitors is widely distributed in flowering plants (Table 1). Tan and Stevens (1971) suggested that plant-derived BBIs have probably evolved from an ancestral single-headed inhibitor by internal gene duplication and subsequent mutations connoting differences in residue composition of the two reactive sites, the evolved double-headed inhibitor having approximately 100 residues and 14 cysteines. An evolutionary scenario has been proposed for the development of these proteins (Fig. 1).

The 101 BBI sequences used in our study were highly variable in length, ranging from 73 residues for *Vigna radiata* (JC1066) up to 262 residues from *Oryza sativa* (BAB40052). There is evidence to suggest that BBIs from monocotyledonous plants are larger molecules

Table 1
Selected plant species from the GenBank database

Plant species	Family	Designation
Arachis hypogaea	Fabaceae	ARAHY
Canavalia lineata	Fabaceae	CANLI
Coix lacryma-jobi	Poaceae	COILA
Dioclea glabra	Fabaceae	DIOGL
Dipteryx alata	Fabaceae	DIPAL
Dolichos biflorus	Fabaceae	DOLBI
Dolichos lablab	Fabaceae	DOLLA
Erythrina variegata	Fabaceae	ERYVA
Glycine max	Fabaceae	SOYBN
Hordeum vulgare	Poaceae	HORVU
Lonchocarpus capassa	Fabaceae	LONCA
Macrotyloma axillare	Fabaceae	DOLAX
Medicago sativa	Fabaceae	MEDSA
Medicago scutellata	Fabaceae	MEDSC
Oryza sativa	Poaceae	ORYSA
Phaseolus lunatus	Fabaceae	PHALU
Phaseolus vulgaris	Fabaceae	PHAVU
Pisum sativum	Fabaceae	PEA
Saccharum officinarum	Poaceae	SACOF
Setaria italica	Poaceae	SETIT
Torresea acreana	Fabaceae	TORAC
Torresea cearensis	Fabaceae	TORCE
Triticum aestivum	Poaceae	WHEAT
Vicia faba	Fabaceae	VICFA
Vicia sativa subsp. nigra	Fabaceae	VICAN
Vigna angularis	Fabaceae	PHAAN
Vigna mungo	Fabaceae	VIGMU
Vigna radiata	Fabaceae	PHAAU
Vigna unguiculata	Fabaceae	VIGUN
Zea mays	Poaceae	MAIZE

than those from dicotyledonous plants. Our sequence alignment studies indicate, that in monocotyledonous plants BBIs have undergone duplication events which have given rise to six distinct groups of inhibitors (MI-I, MI-II, MI-III, MI-IV, MI-V, and MI-VI). Tashiro et al. (1987) suggested that such events had occurred in the same case of a trypsin inhibitor from rice bran while Song et al. (1999) found the same for a BBI from barley seeds.

We found that the BBIs from dicotyledonous plants had about 104 residues, except for a *Vigna unguiculata* BBI (S09415) which had 146 residues and a *Pisum sativum* BBI (CAC24565) which had 133 residues. Sequence S09415 had a longer N terminal sequence while the CAC24565 had a C terminal extension that contributed to the differences in length. All BBIs from dicotyledonous plants had 14 cysteines linked by disulphide bonds (C_1–C_{14}, C_2–C_6, C_3–C_{13}, C_4–C_5, C_7–C_9, C_8–C_{12}, C_{10}–C_{11}) and two 7-amino-acid reactive sites between two of the cysteine residues (Fig. 1).

In the case of monocotyledonous plants BBI sequences seemed to be shorter, about 100 residues long, although they usually presented a similar structure to the BBIs found in dicotyledonous plants. Assuming that the larger BBI sequences (180–250 residues) arose by one (Song et al., 1999) or two duplications of the cysteine-containing region (Fig. 1), the amino acid changes that occurred along their respective reactive sites (Fig. 2) would include the key changes that caused functional differentiation, which might have resulted in divergence in their biological roles. The first reactive site in BBIs from monocotyledonous and dicotyledonous plants inhibits mostly trypsin serine proteinases. Although the second reactive site in BBIs from dicotyledonous plants shows greater variation at positions P2, P1, P4′, and P5′ than the first reactive site it can inhibit only trypsin and chymotrypsin, while in BBIs from monocotyledonous plants the second reactive site varies in both amino acid composition and the number of amino acids present and has yet to be established, whether this reactive site has the ability to efficiently inhibit serine proteinases.

3.2. Comparison of sugarcane BBI-type sequences

We retrieved 14 BBI-type protein sequences from sugarcane from the SUCEST database which we classified into six subgroups according to their amino acid similarity (Fig. 3). They all had some highly characteristic sequence motif, e.g., the first reactive site consisted of a 7–9 residue loop formed by a disulphide bridge between two cysteine (Cys) that is thought to bind trypsin and chymotrypsin. We also observed Cys residues at specific positions along the protein sequence.

3.3. Phylogeny of Bowman–Birk type inhibitors in flowering plants

Fig. 4 shows a neighbor-joining un-rooted tree giving the phylogenetic relationships between the plant BBI sequences studied by us. When we used all the 101 retrieved sequences to produce a tree, the bootstrap values that give reliability to the branches were relatively low, but when we used the 48 full-length sequences, we found strong bootstrap values (Fig. 5). As expected, the fact that the majority of the retrieved BBI sequences were composed of either truncated or partial sequences contributed to the low bootstrapping rate and the relatively large distances.

We were able to delineate two major branches, one for BBIs from monocotyledonous plants and the other for BBIs from dicotyledonous plants, by both the Gonnet matrix and neighbor-joining methods (Fig. 5), these branches showing a clear separation between them. Bootstrap values of 100 segregate these inhibitors giving support to the proposition made by Prakash et al. (1996), that BBIs from monocotyledonous plants should be treated as a distinct class of the BBI family, an assumption which is also supported by the particular evolutionary process occurred with BBIs from monocotyledonous plants (discussed below).

We found that BBIs from monocotyledonous plants are distributed in three major branches in both

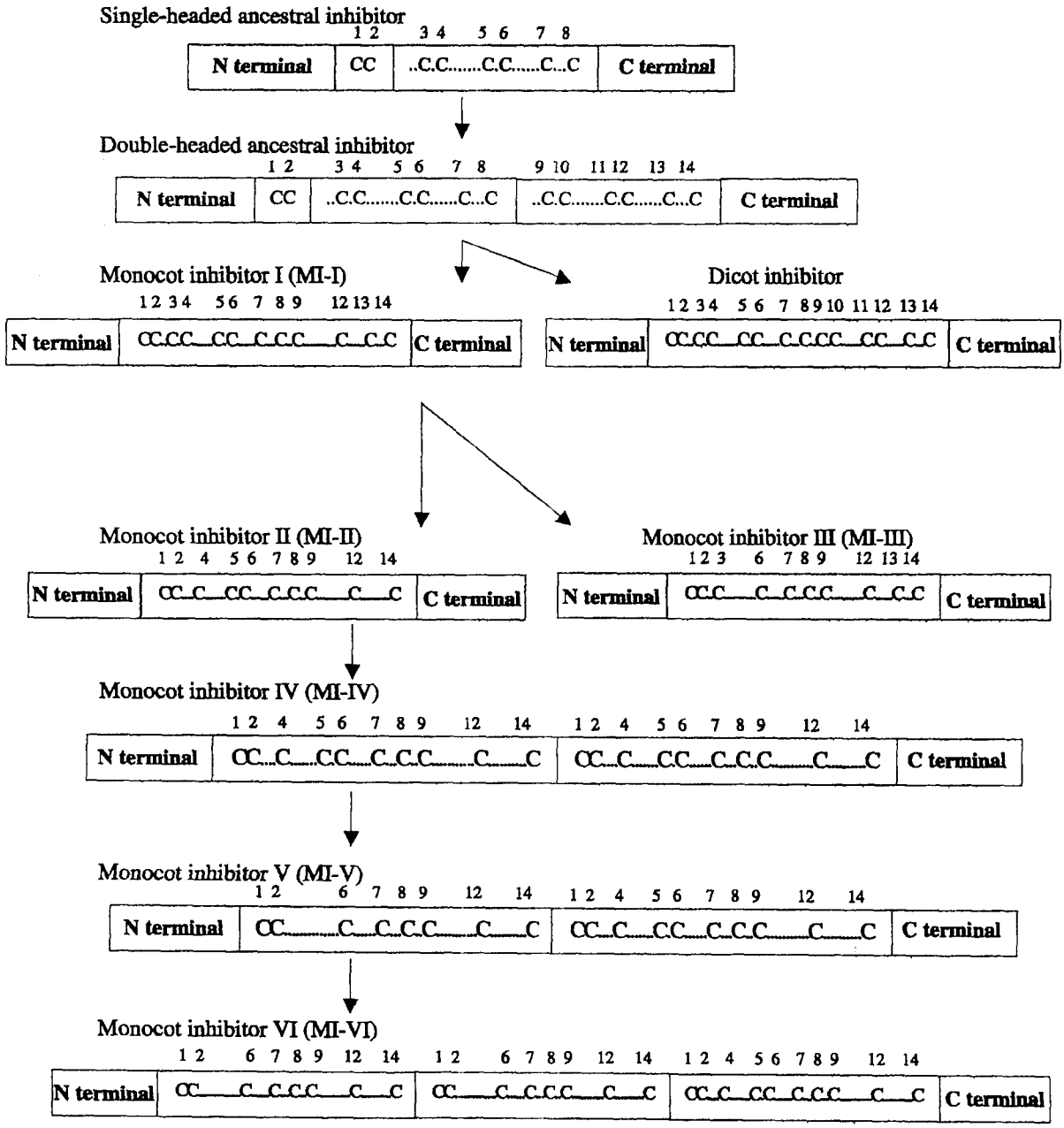

Fig. 1. A proposed evolutionary scheme for Bowman–Birk-type proteinase inhibitors (BBIs) from flowering plants. Cysteines are numbered in the order of appearance along the double-headed ancestral inhibitor.

phylogenetic trees (Figs. 4 and 5). The first branch contains BBI-type sequences from sugarcane that are also related to IBB3 from wheat, the bootstrap values from the two trees being 99 and 100. The second branch contains BBIs from sugarcane, rice and maize presenting characteristics of secretory glycoproteins, the bootstrap values being 98 and 100. The third branch, which, includes BBIs from the remaining monocotyledonous plants which might present one, two or three duplicated domains, the bootstrap values from the two trees being 75 and 100.

Our analysis of the BBIs from dicotyledonous plants indicates that the members of this branch are relatively closely related, although three secondary branches can be seen (Fig. 5). With the exception of IBB1, which can be considered as an outgroup, all soybean inhibitors are grouped in a separate secondary branch. Interestingly, BBIs from peanut constitute a distinct secondary branch with three subdivisions, one of them presenting an inter-branch distance point close to the BBIs from monocotyledonous plants. Norioka and Ikenaka (1983) have pointed out that BBIs from peanut have important

Reactive site 1

	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P6'
Dicot	C	T	K/R/A	S	X	P	P	X	C
Dicot (*Arachis*)	C	D	R	R	A	P	P	Y	F
Monocot	C	T/N/S/Y	K/R	K/M/S/D	X	P/I	P/R/A	X	C
Monocot (WI)	C	T/N	F	S	F	S	G	L/V	Y

Reactive site 2

	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P6'
Dicot	C	T/A/N/R/S	R/H/L/Y/F/K	S	X	P	P/A/G	Q/K/M/L	C
Dicot (*Arachis*)	C	T	R	S	N/I	P	P	Q	C
Monocot	Q/P/R/K	T/S/V	X	S/D/G/L	X	P	P	V/Q/R	F/Y/R
Monocot (WI)	A/V/P	A/V	Q/K/V/S	T/S	Y/H/D	S/P/K	G/V	K/W/T	M/K/R

Fig. 2. Consensus sequence of Bowman–Birk-type (BB) inhibitory loops (WI, wound inducible). X indicates any of the 20 amino acids.

differences as compared to BBIs from other dicotyledonous plants, including changes in the first reactive site, and it seems that these BBIs may be regarded as an intermediate type between BBIs from monocotyledonous plants and those from dicotyledonous plants.

3.4. Computer-assisted expression analysis

Until 1993, it was believed that the BBI family of proteins was only expressed and accumulated in seeds (Odani and Ikenaka, 1978; Odani et al., 1986; Tashiro et al., 1990) but it has now been shown that this class of inhibitors is also expressed in leaves and stems (Rakwal et al., 2001; Rohrmeier and Lehle, 1993).

In our study, the expression of 14 BBI-type proteins from sugarcane was investigated by computer-assisted Northern blotting analysis (Fig. 6). The inhibitors were classified into six groups according to their amino acid similarity (Fig. 3). Interestingly, all tissues analyzed presented different levels of gene expression, and although the pattern of gene expression was quantitatively and qualitatively variable, the higher levels of expression were observed in tissues related to plant growth and reproduction such as apical meristem, rolled leaves, flowers, and seed.

4. Discussion

Even though the amino acid composition of different BBIs have changed during the evolution, the cysteine residues of these molecules are highly conserved suggesting that they have functional similarities. We found that BBIs from different genera of dicotyledonous plants are composed of 14 cysteine residues and seven disulphide bonds, while BBIs from monocotyledonous plants also have conserved cysteine residues although their number varies even within a specific genus and may present 10–26 cysteines forming 5–13 disulphide bonds. These structural dissimilarities are not likely to reflect functional differences, rather it might suggest duplications of conserved sequences without affecting the properties of the inhibitor.

It appears that 100-amino-acid-long BBIs from monocotyledonous plants have lost two or four cysteine residues. When two cysteines are absent, it is most probable that these are residues 10 and 11, examples being sugarcane (Fig. 1; MI-I) and wheat (Poerio et al., 1994). The elimination of four cysteines implies that residues 3, 10, 11, and 13 (Fig. 1; MI-II) or 4, 5, 10, and 11 are missing (Fig. 1; MI-III), although Rohrmeier and Lehle (1993) have shown that maize WIP1 lacks the Cys-3 instead of the Cys-4 residue. This is probably due to a misinterpretation of the FASTA program caused by a reduced number of analyzed sequences (5) that interfered on sequence alignment. It appears that BBIs lacking four cysteines have probably evolved from the MI-I group with a further separation in two groups, the first being the MI-II group (Fig. 1) widespread in several species, e.g., wheat, rice and foxtail millet (Nagasue et al., 1988; Tashiro et al., 1990) and the second being the MI-III group from sugarcane, rice and maize, (Fig. 1). The MI-III group has a striking feature, i.e. a 15 amino acids sequence of hydrophobic amino acids with a potential N-glycosylation site (NFS), indicating that BBIs in this group could be secretory glycoproteins (Rohrmeier and Lehle, 1993).

In 180 residues long BBIs from monocotyledonous plants there are two internally similar regions (Fig. 1; MI-IV and MI-V) and it appears that these inhibitors probably arose from internal gene duplications in MI-II BBIs. The MI-IV pattern was only observed in a single

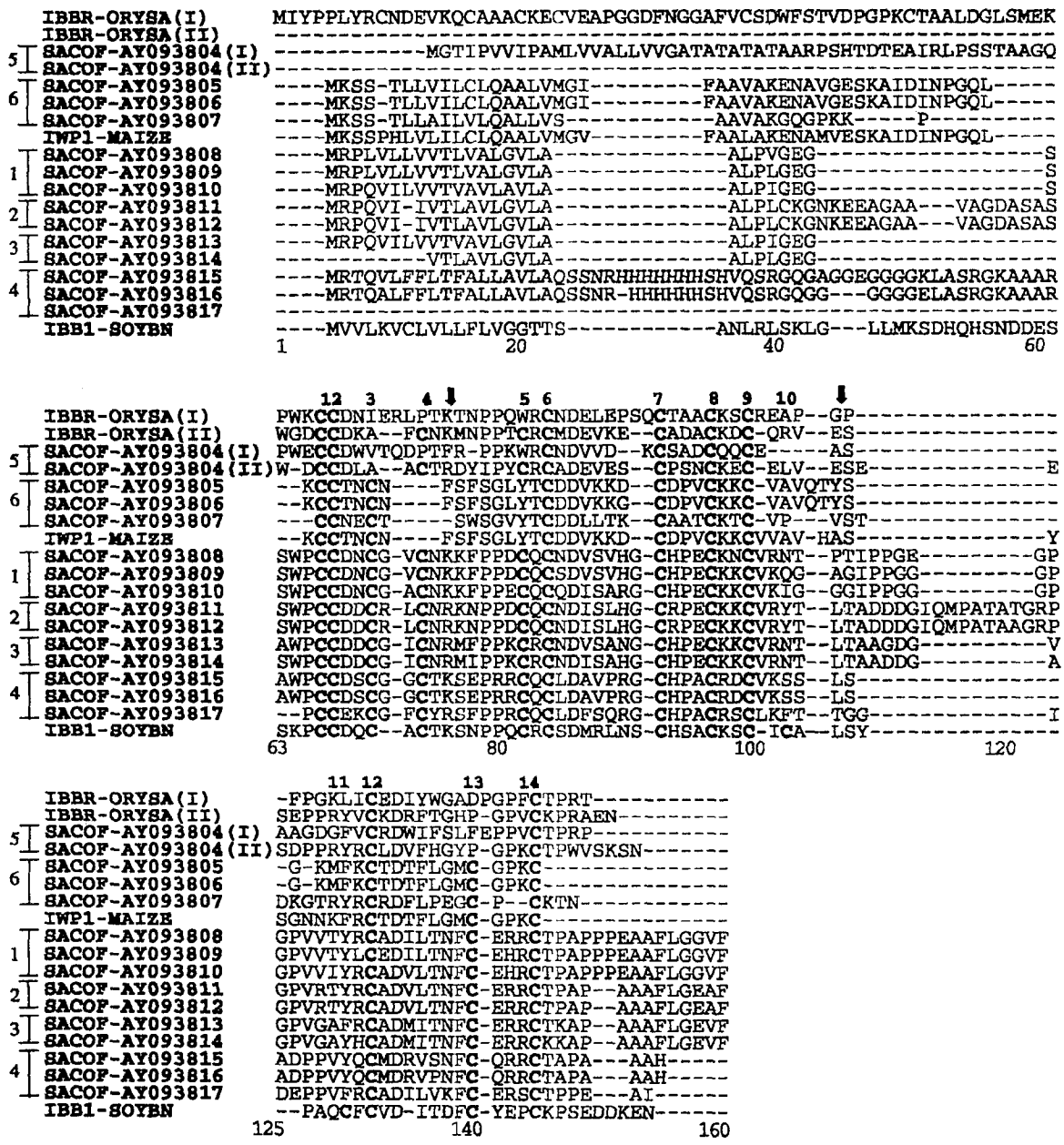

Fig. 3. Sequence comparison of 14 Bowman–Birk-type proteinase inhibitors (BBIs) proteins from sugarcane (group 1: AY093808, AY093809, AY093810; group 2: AY093811, AY093812; group 3: AY093813, AY093814; group 4: AY093815, AY093816, AY093817; group 5: AY093804; group 6: AY093805, AY093806, AY093807) and the orthologous sequences IBB1 (soybean P01055), IBBR (rice P07084) and IWP1 (maize P31862). I and II represent the first and the second copies of the tandem reapeats. Cysteine residues which participate in disulphide bridges are in bold and numbered. Arrows indicate the putative reactive binding sites.

barley EST consensus whereas MI-V was found in sugarcane, rice and maize. It appears that MI-IV has lost four cysteines (residues 3, 10, 11, and 13) in both duplicated regions while in MI-V one domain has lost the same residues whereas the second domain has lost six cysteines (residues 3, 4, 5, 10, 11, and 13). This indicates that a duplication event (of MI-II) has occurred in barley whereas in the other plants duplication was followed by another change (deletion, insertion, and/or mutation) leading to the loss of two additional cysteines. This agrees with the theory that gene duplication events are thought to have played a major role in molecular evolution (Li, 1997).

Both phylogenetic trees (Figs. 4 and 5) support our hypothesis. They show that inhibitors MI-I are all together in a first branch, from which the other inhibitors derive. From the second branch, a clear separation can be seen; a third branch which groups the inhibitors

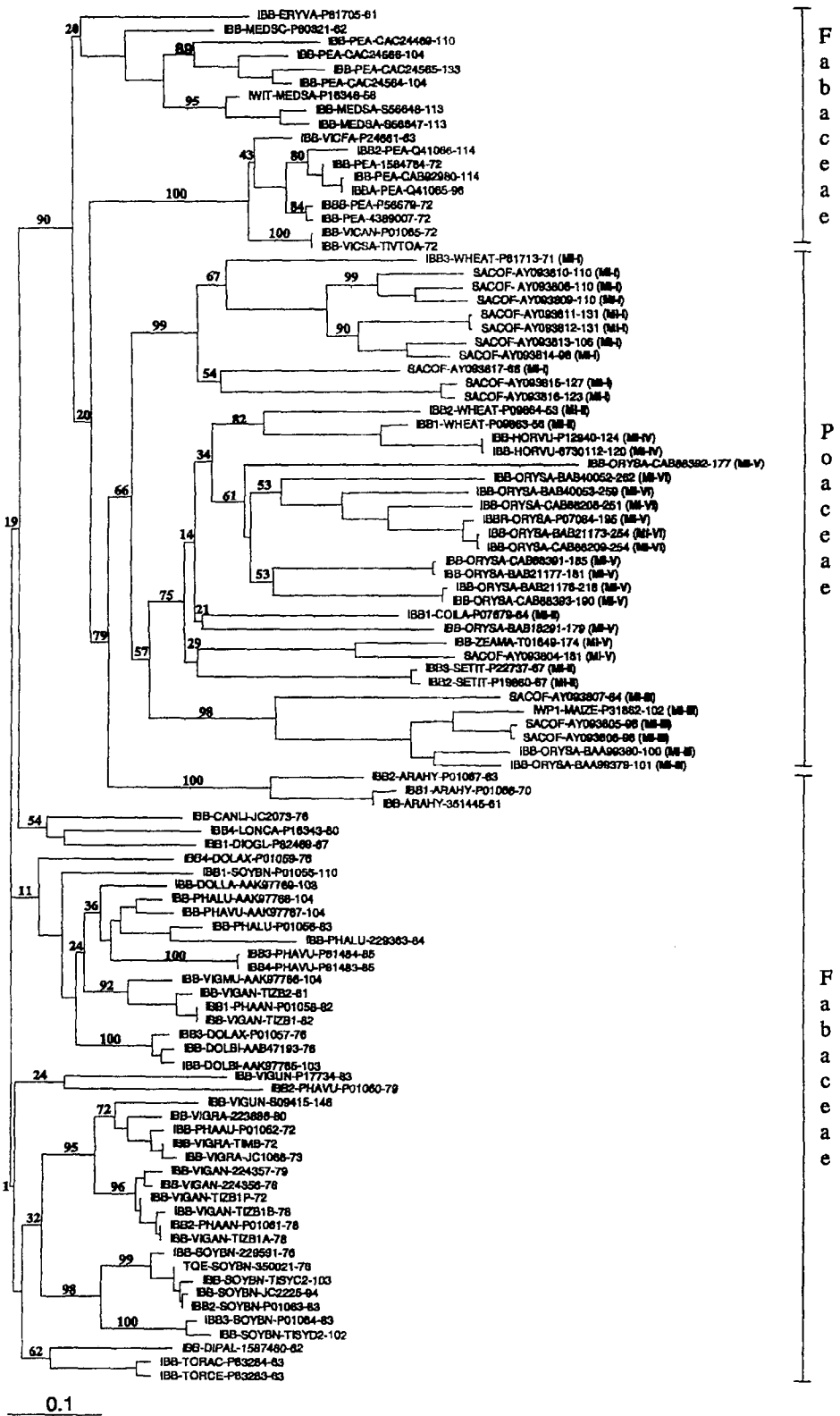

Fig. 4. Phylogenetic tree of BBIs from flowering plants. Each inhibitor description is followed by the GenBank database access and amino acid numbers.

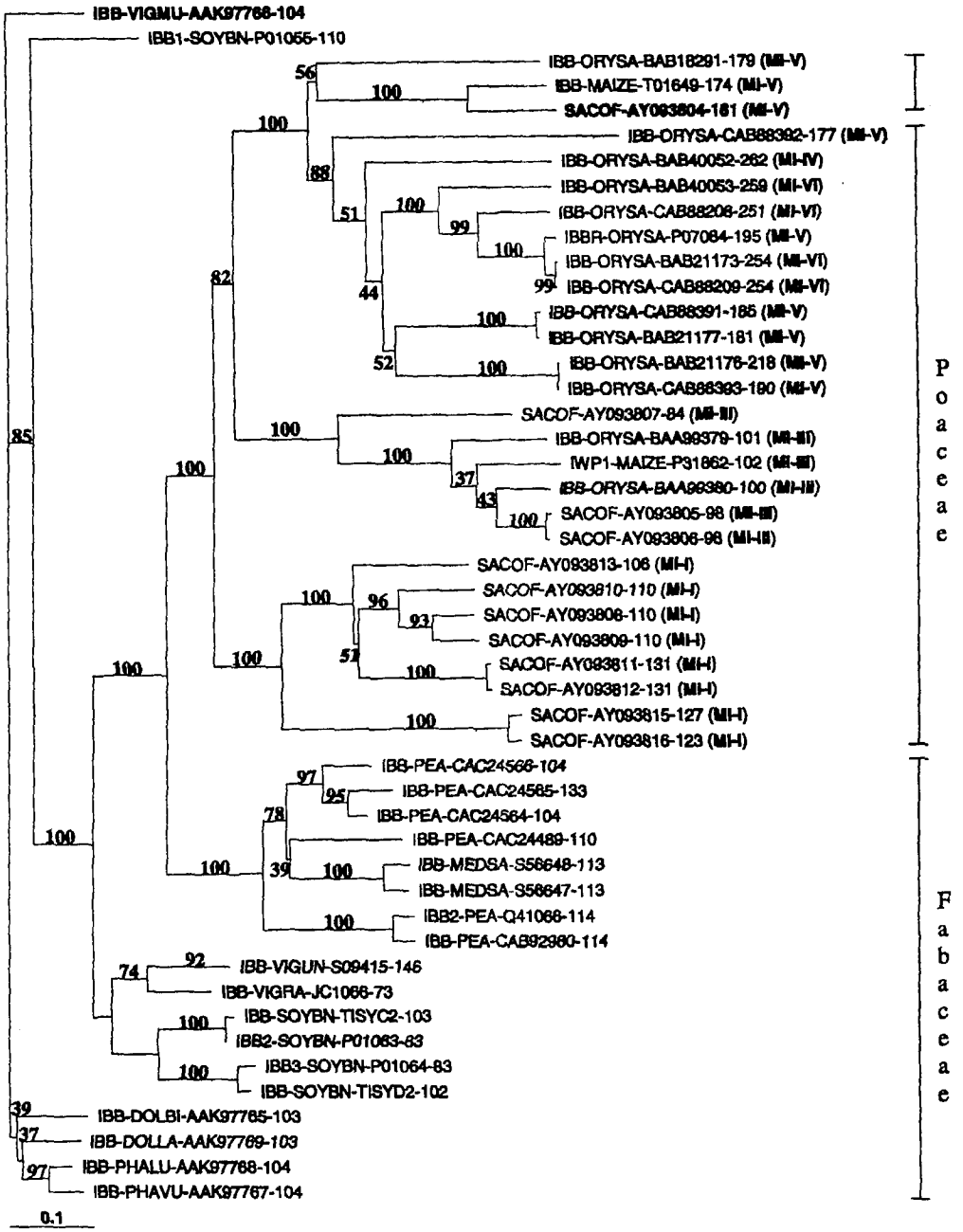

Fig. 5. Phylogenetic tree of full-length BBIs from flowering plants. Each inhibitor description is followed by the GenBank database access and amino acid numbers.

MI-III and a fourth branch which shows the inhibitor MI-II giving rise to inhibitors MI-IV, MI-V, and MI-VI.

We found that a group of BBIs from rice, the MI-VI group, consists of larger molecules of about 250 amino acid residues which have probably evolved from members of the MI-V group, since they have an additional duplication of the first region, followed by the same conserved residues as occur in the second region of MI-V group. Thus, we found that the MI-VI group of inhibitor is characterized by three duplications in tandem, the first two duplicated regions having lost cysteines 3, 4, 5, 10, 11, and 13, whereas residues 3, 10, 11, and 13 are missing from the third region (Fig. 1; MI-VI).

We found that the monocotyledonous plants sugarcane and rice show a variety of BBI types, in sugarcane we found BBIs I, III, and V while in rice we found BBIs I, II, V, and VI. Reference to the rice chromosome map shows that all these inhibitors are located on chromosome 1, indicating that an original BBI gene was entirely duplicated before events such as internal

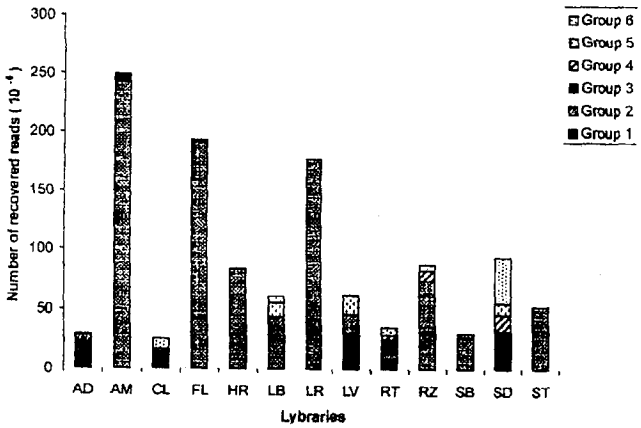

Fig. 6. Computer-assisted expression analysis of sugarcane BBIs from cDNA libraries from different tissues. Abbreviations of libraries: AD, plantlets without developed leaves and roots infected with *Acetobacter diazotroficans* growing in vitro; AM, apical meristem; CL, callus submitted to light/dark and temperature (4 °C and 37 °C) stress; FL, flowers; HR, plantlets without developed leaves and roots infected with *Herbaspirillum rubrisubalbicans* growing in vitro; LB, lateral buds; LR, rolled leaves; LV, etiolated leaves; RT, root; RZ, leaf-root transition zone; SB, stem bark; SD, seeds; ST, stem. Expressed sequence tag (EST) clusters (named groups) 1: AY093808, AY093809, AY093810, 2: AY093811, AY093812, 3: AY093813, AY093814, 4: AY093815, AY093816, AY093817, 5: AY093804, 6: AY093805, AY093806, AY093807.

duplication, deletion, insertion, and point mutation took place.

It is interesting to note that the pattern of evolution of BBIs in monocotyledonous and dicotyledonous plants is different, especially in respect to duplication events. The reason for this is still unknown, although some attempts to explain the mechanism have been proposed. Tashiro et al. (1987) suggested that duplicated molecules would consist of tandemly repeated sequences (as seen in the structures of avian ovomucoids) and the connecting peptides between domains could be hydrolyzed by a proteinase to yield different types of BBIs. Tiffin and Gaut (2001) stated that the inhibitory activity of the second reactive site (loop two) in both domains is rarely observed (inferences about the loss of this reactive site during evolution having been presented by Tashiro et al. (1990), but structural and inhibition experiments will be necessary to sort out the real role of these duplicated domains. Absence of cysteines 4 and 5 as well as 10 and 11, which give support to the reactive regions (inhibitory loops), do not necessarily mean a complete loss of the properties of the BBI because it is known that active wound-induced BBIs may not present these cysteine residues (Rohrmeier and Lehle, 1993).

The biological role of BBIs from monocotyledonous and dicotyledonous plants also appears to be different. Analysis of the amino acid composition of the reactive site shows that most BBIs from dicotyledonous plants have seven residues. In peanut, however, an insertion of two amino acids occurs at the first reactive site where the position of the peptide bond is R–R instead of R/K/A–S. These differences indicate that the BBIs from peanut could be a subgroup of BBIs from dicotyledonous plants. On the other hand, the reactive sites of BBIs from monocotyledonous plants are extremely variable since cysteine residues that are responsible for the formation of the reactive sites have been lost. All types of BBIs from monocotyledonous plants shown in Fig. 1 have lost two cysteines or multiples thereof. When the lost residues were analyzed, we observed that in all cases, the two missing cysteines corresponded to those linked by disulphide bonds. The three-dimensional structure of the peanut, soybean, and barley BBIs (Song et al., 1999; Suzuki et al., 1987; Werner and Wemmer, 1992) shows that cysteine residues 1 and 14, 2 and 6, 3 and 13, 4 and 5, 7 and 9, 8 and 12, 10 and 11 are responsible for the formation of the seven disulphide bonds. We can than infer that when one cysteine has been lost, the other residue that formed the disulphide bridge has lost its structural role and therefore, has also been removed.

Our expression analyses of sugarcane BBI-type molecules using a computer-assisted approach showed for the first time that this class of inhibitors is expressed in all plant tissues. This could suggest that BBI-encoding genes are necessary to regulate protein degradation in different cell types and to protect plant tissues against pathogens and insect attack, although they may include other roles as well. In addition, expression of group 2 BBIs was significantly higher in comparison to the other sugarcane BBIs, group 2 BBIs being present in all tissues (except callus and roots) which indicates that they probably perform an important role in sugarcane development and protection.

Interestingly, BBIs have been only identified in Fabaceae and Poaceae. Searching for BBI-related sequences in public databases revealed, that these genes have been apparently lost during evolution in most of the plant kingdom. What could the explanation be for the absence of BBIs in the majority of plant species? One reasonable possibility is that functionally related proteins might play similar roles in the control of proteolysis. We could thus hypothesize that Fabaceae and Poaceae retained the BBI sequences whereas similar function was carried out by another set of more divergent proteins. Evaluation of the precise role of BBI in plant cells would certainly help in understanding the differential pattern of evolution of this protein.

This overview of the evolutionary process of BBI genes raises intriguing questions about the biological role of the reactive sites that have lost their cysteine residues. Studies on inhibition and protein structure will help to answer these questions and to better understand the whole process.

Acknowledgments

We thank Giancarlo CX Oliveira, Phellippe AS Marbach and an anonymous referee for helpful comments and suggestions. This work was supported by Fundaçsimao de Amparo a Pesquisa do Estado de Ssimao Paulo (FAPESP), Grant 97/04934-3. M.O.M. was supported by a graduate fellowship from FAPESP. M.C.S.F. and A.S.T. are staff members of their respective departments and research fellows of CNPq (Brasília, Brazil).

References

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403–410.

Birk, Y., Gertler, A., Khalef, S., 1963. A pure trypsin inhibitor from soya beans. Biochem. J. 87, 281–284.

Bowman, D.E., 1946. Differentiation of soy bean anti-tryptic factors. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 63, 547–550.

Korsinczky, M.L.J., Schirra, H.J., Rosengren, K.J., et al., 2001. Solution structure by ^{1}H NMR of the novel cyclic trypsin inhibitor SFTI-1 from sunflower seeds and an acyclic permutant. J. Mol. Biol. 311, 579–591.

Li, W.H., 1997. In: Molecular Evolution. Sinauer Associates, Sunderland, MA, p. 487.

McGurl, B., Mukherjee, S., Kahn, M., Ryan, C.A., 1995. Characterization of two proteinase inhibitor (ATI) cDNAs from alfalfa leaves (*Medicago sativa* var, Vernema): the expression of ATI genes in response to wounding and soil microorganisms. Plant Mol. Biol. 27, 995–1001.

Nagasue, A., Fukamachi, H., Ikenaga, H., Funatsu, G., 1988. The amino acid sequence of barley rootlet trypsin inhibitor. Agric. Biol. Chem. 52, 1505–1514.

Norioka, S., Ikenaka, T., 1983. Amino acid sequence of trypsin chymotrypsin inhibitors (AI, AII, BI and BII) from peanut (*Arachis hypogaea*): a discussion on molecular evolution of legume Bowman–Birk type inhibitors. J. Biochem. 94, 589–599.

Odani, S., Ikenaka, T., 1972. Studies on soybean trypsin inhibitors: IV-Complete amino acid sequence and anti-proteinase sites of Bowman–Birk soybean proteinase inhibitor. J. Biochem. 71, 839–848.

Odani, S., Ikenaka, T., 1976. The amino acid sequence of two soybean double headed proteinase inhibitors and evolutionary consideration on the legume proteinase inhibitors. J. Biochem. 80, 641–643.

Odani, S., Ikenaka, T., 1978. Studies on Soybean trypsin inhibitors: XIV-Change of the inhibitory activity of Bowman–Birk inhibitor upon replacements of the α-chymotrypsin reactive site serine residue by other amino acids. J. Biochem. 84, 1–9.

Odani, S., Koide, T., Ono, T., 1986. Wheat germ trypsin inhibitors. Isolation and structural characterization of single-headed and double-headed inhibitors of the Bowman–Birk type. J. Biochem. 100, 975–983.

Page, R.D.M., 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput. Appl. Biosci. 12, 357–358.

Poerio, E., Caporale, C., Carrano, L., Caruso, C., Vacca, F., Buonocore, V., 1994. The amino acid sequence and reactive site of a single-headed trypsin inhibitor from wheat endosperm. J. Protein Chem. 13, 187–194.

Pompermayer, P., Lopes, A.R., Terra, W.R., Parra, J.R.P., Falco, M.C., Silva-Filho, M.C., 2001. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. Entomol. Exp. Appl. 99, 79–85.

Prakash, B., Murthy, M.R.N., Sreerama, Y.N., Rao, D.R., Gowga, L.R., 1996. Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman–Birk inhibitors. J. Mol. Evol. 42, 560–569.

Rakwal, R., Agrawal, G.K., Jwa, N.S., 2001. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman–Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. Gene 263, 189–198.

Ryan, C.A., 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insect and pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 28, 425–449.

Rohrmeier, T., Lehle, L., 1993. WIP1, a wound-inducible gene from maize with homology to Bowman–Birk proteinase inhibitors. Plant Mol. Biol. 22, 783–792.

Saiton, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425.

Song, H.K., Kim, Y.S., Yang, J.K., Moon, J., Lee, J.Y., Suh, S.W., 1999. Crystal structure of a 16 kDa double-headed Bowman–Birk trypsin inhibitor from barley seeds at 1.9 Å resolution. J. Mol. Biol. 293, 1133–1144.

Suzuki, A., Tsunogae, Y., Tanaka, I., Yamane, T., Ashida, T., Norioka, S., Hara, S., Ikenaka, T., 1987. The structure of Bowman–Birk type protease inhibitor A-II from peanut (*Arachis hypogaea*) at 3.3 Å resolution. J. Biochem. 101, 267–274.

Tan, C.G.L., Stevens, F.C., 1971. Amino acid sequence of lima bean protease inhibitor component- IV: Isolation and sequence determination of tryptic peptides. Eur. J. Biochem. 18, 515–523.

Tanaka, A.S., Sampaio, U.M., Mentele, R., Auerswald, E.A., Sampaio, C.A.M., 1996. Sequence of a new Bowman-Birk inhibitor from *Torresea acreana* seeds and comparison with *Torresea cearensis* trypsin inhibitor (TcTI2). J. Protein Chem. 15, 553–560.

Tanaka, A.S., Sampaio, U.M., Marangoni, S., et al., 1997. Purification and primary structure determination of a Bowman–Birk trypsin inhibitor from *Torresea cearensis* seeds. Biol. Chem. 378, 273–281.

Tashiro, M., Hashino, K., Shiozaki, M., Ibuki, F., Maki, Z., 1987. The complete amino acid sequence of rice bran trypsin inhibitor. J. Biochem. 102, 297–306.

Tashiro, M., Asao, T., Hirata, C., Takahashi, K., Kanamori, M., 1990. The complete amino acid sequence of a major trypsin inhibitor from seeds of foxtail millet (*Setaria italica*). J. Biochem. 108, 669–672.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673–4680.

Tiffin, P., Gaut, B.S., 2001. Molecular evolution of the wound-induced seine proteinase inhibitor wip1 in *Zea* and related genera. Mol. Biol. Evol. 18, 2092–2101.

Vettore, A.L., da Silva, F.R., Kemper, E.L., Arruda, P., 2001. The libraries that made SUCEST. Genet. Mol. Biol. 24, 1–7.

Werner, M.H., Wemmer, D.E., 1992. Three-dimensional structure of soybean trypsin/chymotrypsin Bowman–Birk inhibitor in solution. Biochemistry 31, 999–1010.