

### FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S586

Silva, Flavia Camila Vieira da.

RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LIPÍDIOS DE "Vigna unguiculata" (L. WALP., FEIJÃO-DE-CORDA) : INIBIÇÃO DE  $\alpha$ -AMILASE, DO CRESCIMENTO DE FUNGOS LEVEDURIFORMES E DESCRIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DETERMINANTES PARA ESTAS ATIVIDADES / Flavia Camila Vieira da Silva. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

87 f. : il.

Bibliografia: 58 - 74.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2019.

Orientador: Andre de Oliveira Carvalho.

1. peptídeos sintéticos. 2. ação antifúngica. 3. inibição enzimática. 4. estrutura tridimensional. 5. docking. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PROTEÍNA  
TRANSPORTADORA DE LIPÍDIOS DE *Vigna unguiculata* (L. WALP., FEIJÃO-DE-  
CORDA): INIBIÇÃO DE  $\alpha$ -AMILASE, DO CRESCIMENTO DE FUNGOS  
LEVEDURIFORMES E DESCRIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DETERMINANTES PARA  
ESTAS ATIVIDADES

**FLÁVIA CAMILA VIEIRA DA SILVA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

Julho de 2019

RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PROTEÍNA  
TRANSPORTADORA DE LIPÍDIOS DE *Vigna unguiculata* (L. WALP., FEIJÃO-DE-  
CORDA): INIBIÇÃO DE  $\alpha$ -AMILASE, DO CRESCIMENTO DE FUNGOS  
LEVEDURIFORMES E DESCRIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DETERMINANTES PARA  
ESTAS ATIVIDADES

**FLÁVIA CAMILA VIEIRA DA SILVA**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e  
Biotecnologia da Universidade Estadual do  
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte  
das exigências para a obtenção do título de  
Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. André de Oliveira Carvalho

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos  
– LFBM, no Centro de Biociências e Biotecnologia – CBB

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ

Julho/2019

RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PROTEÍNA  
TRANSPORTADORA DE LIPÍDIOS DE *Vigna unguiculata* (L. WALP., FEIJÃO-DE-  
CORDA): INIBIÇÃO DE  $\alpha$ -AMILASE, DO CRESCIMENTO DE FUNGOS  
LEVEDURIFORMES E DESCRIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DETERMINANTES PARA  
ESTAS ATIVIDADES

**FLÁVIA CAMILA VIEIRA DA SILVA**

Aprovada em 30 de julho de 2019.

Comissão examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup>. Anna Lvovna Okorokova Façanha (Dr.<sup>a</sup>., Química Biológica) - UENF

---

Prof. Francisco José Alves Lemos (Dr., Ciências Biológicas) - UENF

---

Prof.<sup>a</sup>. Desiely Silva Gusmão (Dr.<sup>a</sup>., Biociências e Biotecnologia) - IFF

---

Prof. André de Oliveira Carvalho (Dr., Biociências e Biotecnologia) – UENF

Orientador

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus pelo sustento e força que me levou adiante nas dificuldades e desafios permitindo conquistar mais essa vitória em minha vida.

Agradeço aos meus irmãos Carol e Emanuel e, principalmente, a minha mãe que sempre me incentivou e acreditou nos meus sonhos. Sempre treinava as apresentações comigo mesmo sem entender o que eu estava falando. Te amo, mãe!

Agradeço ao meu esposo, Theo, que sempre entendeu a minha dedicação na realização desse sonho e fingia ser plateia para eu ensaiar e sempre me tranquilizava dizendo: “vai dar tudo certo.” Te amo, meu amor!

Agradeço a Géssika e Lídia, minhas amigas que me ajudaram durante todo o processo no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador prof. André de Oliveira Carvalho, pelos conselhos dados e conhecimento científico compartilhado.

Aos amigos do LFBM pela ajuda e conversas descontraídas.

Aos professores membros da banca por disporem generosamente de seu tempo para a leitura e discussão deste trabalho.

Agradeço aos órgãos de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa -RJ) pelo apoio financeiro.

## Índice

<b>Agradecimentos.....</b>	<b>I</b>
<b>Índice.....</b>	<b>II</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>IV</b>
<b>Lista de tabelas.....</b>	<b>VI</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>IX</b>
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 -Aspectos estruturais e classificação em famílias.....	2
1.2- Expressão gênica e localização.....	5
1.3 - Atividades biológicas.....	6
1.4- Infecções fúngicas e seus potenciais terapêuticos.....	8
1.5- Inibidores de $\alpha$ -amilase e seu potencial biotecnológico.....	9
<b>2 - OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 - Objetivo geral .....	13
2.2 - Objetivos específicos.....	13
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1- Materiais biológicos.....	14
3.1.1- LTPs e peptídeos sintéticos.....	14

3.1.2- Manutenção das leveduras.....	15
<b>Seção I - Estudo do mecanismo de inibição da rVu-LTP1.1 sobre a <math>\alpha</math>-amilase salivar humana.....</b>	<b>15</b>
3.2- Síntese dos peptídeos sintéticos M <sub>1</sub> Q <sub>12</sub> e N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub> <sup>mQ</sup> .....	15
3.3- Ensaio de inibição da $\alpha$ -amilase com o peptídeo sintético M <sub>1</sub> -Q <sub>12</sub> baseado na sequência da rVu-LTP1.1.....	16
3.4- Alinhamento das sequências de LTPs .....	16
3.5- Desenho de um peptídeo com a substituição de um aminoácido.....	17
3.6- Modelagem I-2.....	17
<b>Seção II - Análise <i>in silico</i> do mecanismo de inibição da Vu-LTP1.1 sobre a <math>\alpha</math>-amilase salivar humana.....</b>	<b>18</b>
3.7- Vu-LTP1.1, HSA e tendamistat: estruturas primária e terciária.....	18
3.8- Vu-LTP1.1 e <i>docking</i> molecular com a $\alpha$ -amilase salivar humana.....	18
<b>Seção III - Estudo da atividade inibitória de peptídeos baseados na sequência da rVu-LTP1.1 sobre leveduras.....</b>	<b>19</b>
3.9- Ensaio de inibição de crescimento das leveduras pela rVu-LTP1.1.....	19
3.10- Ensaio de inibição das células de <i>C. tropicalis</i> pelos peptídeos baseados na sequência da rVu-LTP1.1.....	20
3.11- Ensaio de inibição das células de <i>C. tropicalis</i> pelo peptídeo modificado N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub> <sup>mQ</sup> ...	20
3.12- Predição da estrutura secundária e atividade biológica do peptídeo mais ativo sobre <i>C. tropicalis</i> .....	20
3.13- Análise estatística.....	20

<b>4- RESULTADOS.....</b>	21
<b>Seção I - Estudo do mecanismo de inibição da rVu-LTP1.1 sobre a <math>\alpha</math>-amilase salivar humana.....</b>	21
4.1- Ensaio de inibição da $\alpha$ -amilase salivar humana com o peptídeo sintético M <sub>1</sub> -Q <sub>12</sub> baseado na sequência da rVu-LTP1.1 .....	21
4.2- Busca em banco de dados e alinhamento com outros inibidores de $\alpha$ -amilase .....	21
4.3- Modelagem da I-2.....	24
4.4- Sobreposição da estrutura tridimensional da I-2 com a rVu-LTP1.....	26
4.5- Ensaio de inibição da HSA com o peptídeo sintético modificado N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub> <sup>mQ</sup> .....	27
4.6 - Alinhamento das sequências de LTPs.....	28
<b>Seção II - Análise <i>in silico</i> do mecanismo de inibição da Vu-LTP1.1 sobre a <math>\alpha</math>-amilase salivar humana.....</b>	29
4.7 - Estudo de docking interação entre HSA e Vu-LTP1.1.....	29
4.8 - Estudo de docking interação entre HSA e peptídeos sintéticos N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub> e $\alpha$ G <sub>74</sub> -N <sub>91</sub> .....	33
4.9 - Estudo de <i>docking</i> interação entre HSA e I-2.....	35
<b>Seção III - Estudo da atividade inibitória de peptídeos baseados na sequência de aminoácidos da rVu-LTP1.1 sobre leveduras.....</b>	36
4.10- Ensaio de inibição do crescimento de leveduras com rVu-LTP1.1.....	36
4.11 - Ensaio de inibição do crescimento de <i>C. tropicalis</i> pelos peptídeos sintéticos baseados na sequência de aminoácidos da rVuLTP1.1.....	39
4.12 - Ensaio de inibição do crescimento das células de <i>C. tropicalis</i> pelo peptídeo modificado.....	40
4.13 - Predição da estrutura secundária e atividade biológica do peptídeo mais ativo N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub> .....	41



<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>Seção I - Estudo do mecanismo de inibição da rVu-LTP1.1 sobre a <math>\alpha</math>-amilase salivar humana.....</b>	<b>43</b>
<b>Seção II – Análise <i>in silico</i> do mecanismo de inibição da Vu-LTP1.1 sobre a <math>\alpha</math>-amilase salivar humana.....</b>	<b>46</b>
<b>Seção III - Estudo da atividade inibitória de peptídeos baseados na sequência da rVu-LTP1.1 sobre leveduras.....</b>	<b>49</b>
<b>6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>56</b>
<b>7- BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação gráfica da estrutura tridimensional do complexo LTP de <i>Zea mays</i> (milho) com ácido palmítico (C16:0).....	3
Figura 2 - Visualização gráfica da atividade da enzima HSA na presença de 20 $\mu$ M do peptídeo sintético M <sub>1</sub> Q <sub>12</sub> . O experimento foi realizado em triplicata.....	21
Figura 3 - Alinhamento da rVu-LTP1.1 com as sequências de aminoácidos das LTP com atividade inibitória sobre $\alpha$ -amilase e sem atividade inibitória sobre $\alpha$ -amilase.....	23
Figura 4 - Estrutura tridimensional da I-2, modelada com Modeler e baseada na estrutura da <i>Z. mays</i> ns-LTP.....	24
Figura 5 - Visualização gráfica do mapa de Ramachandran do modelo estrutural da I-2.....	25
Figura 6 - Sobreposição da estrutura tridimensional da rVu-LTP1.1 e I-2.....	26
Figura 7 - Box mostrando o peptídeo sintético modificado N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub> <sup>mQ</sup> com a mesma sequência de aminoácidos do peptídeo N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub> realizando a substituição da Arg <sub>39</sub> por Glu..	27

Figura 8 - Alinhamento das sequências de aminoácidos madura e completa das LTP <sub>1s</sub> sem atividade inibitória sobre $\alpha$ -amilase (prováveis inibidores de amilase/protease PAPI <sub>Hv</sub> e PAPI <sub>Os</sub> ) e com atividade inibitória sobre $\alpha$ -amilase (rVu-LTP1.1 e I-2).....	28
Figura 9 - Imagem da estrutura tridimensional da HSA complexada com Vu-LTP1.1.....	30
Figura 10 - Imagem da estrutura tridimensional da HSA complexada com o peptídeo sintético N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub> .....	34
Figura 11 - Imagem da estrutura tridimensional da $\alpha$ -amilase salivar humana (HSA) complexada com o peptídeo sintético $\alpha$ G <sub>74</sub> -N <sub>91</sub> .....	35
Figura 12 - Imagem da estrutura tridimensional da HSA complexada com I-2.....	36
Figura 13 - Representação gráfica do ensaio de inibição do crescimento das células de <i>Candida albicans</i> com diferentes concentrações de rVu-LTP1.1.....	37
Figura 14 - Efeito antifúngico da rVu-LTP1.1 sobre leveduras.....	38
Figura 15 - Efeito antifúngico dos cinco peptídeos sintéticos sobre <i>C. tropicalis</i> .....	40
Figura 16 - Efeito antifúngico de N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub> <sup>mQ</sup> sobre <i>Candida tropicalis</i> .....	41
Figura 17 - Alinhamento das sequências de aminoácidos dos peptídeos N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub> e B2RP-ERa.....	42

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Principais características entre as duas classes de LTPs de plantas.....	4
Tabela 1. Nome, sequência e principais características bioquímicas dos peptídeos sintéticos baseados na sequência da rVu-LTP1.1.....	15
Tabela 2. Parâmetros da interação entre inibidores de $\alpha$ -amilase e $\alpha$ -amilases.....	32

## RESUMO

As proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs, do inglês *lipid transfer proteins*) são pequenos peptídeos catiônicos encontrados em diversas espécies de plantas. As LTPs são divididas em duas famílias, sendo a LTP<sub>1s</sub> composta por peptídeos de 10 kDa e a LTP<sub>2s</sub> de 7 kDa. As LTP<sub>1s</sub> são conhecidas por possuírem amplo espectro de atividades biológicas tais como: transporte de lipídeos *in vitro*, síntese de cutina,  $\beta$ -oxidação, embriogênese somática, alérgenos em alimentos, adaptação de plantas aos estresses abióticos, atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase e participação na defesa de plantas. Porém, ainda não foi descrita a relação entre estrutura e atividades biológicas das LTP<sub>1s</sub> exceto a ligação e transporte de lipídeos. Uma LTP de aproximadamente 9 kDa (pertencente à família 1) foi isolada de *Vigna unguiculata* L. Walp. (feijão-de-corda) e chamada de Vu-LTP1.1. Foi descoberta a capacidade da rVu-LTP1.1 (LTP recombinante de *V. unguiculata*) de inibir a atividade da  $\alpha$ -amilase salivar humana (HSA, do inglês *human salivary  $\alpha$ -amylase*). Estudos estruturais revelaram que dois peptídeos chamados N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> (compreendem as regiões de voltas da rVu-LTP1.1 contendo aminoácidos com carga positiva), detém a capacidade de inibir a atividade da HSA. O objetivo deste trabalho foi estudar a relação entre a estrutura da rVu-LTP1.1 e as atividades antifúngica e de inibição de  $\alpha$ -amilase. Neste trabalho foi realizada análise comparativa entre estruturas primárias de LTP<sub>1s</sub> que apresentavam atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilases com as LTP<sub>1s</sub> que não inibiam, e foi percebido que as LTP<sub>1s</sub> ativas sobre  $\alpha$ -amilase apresentavam regiões similares com aminoácidos carregados positivamente, enquanto que as LTP<sub>1s</sub> sem atividade sobre  $\alpha$ -amilase não possuíam estes aminoácidos. A partir desse estudo foi feita a síntese do peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> com uma substituição da Arg<sub>39</sub> por Gln (peptídeo modificado N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>) e sua atividade inibitória sobre HSA foi testada. Esta troca de aminoácidos levou a perda total da atividade inibitória sobre HSA, comprovando a importância de aminoácidos carregados positivamente para a inibição da enzima. Para entender a interação destes peptídeos com a HSA, nós realizamos estudos de *docking*. Observou-se que rVu-LTP1.1 se liga à fenda de ligação a carboidrato da enzima obstruindo a fenda e impedindo a entrada de carboidrato. Foi mostrado que a Arg<sub>39</sub>, identificada nos ensaios bioquímicos como o resíduo determinante para a inibição da HSA se insere no sítio ativo da enzima e interage com um dos aminoácidos da tríade catalítica, a Asp<sub>300</sub>, por uma ponte de hidrogênio. A interação Arg<sub>39</sub>-Asp<sub>300</sub> é suficiente para bloquear a atividade catalítica da enzima devido à exigência dos três aminoácidos do seu sítio catalítico de clivar a ligação

glicosídica. Portanto, a inibição da HSA é devido à obstrução da fenda de ligação a carboidratos, e devido a interação entre Arg<sub>39</sub> e Asp<sub>300</sub> do sítio ativo da enzima. Sendo assim, foi descrita uma nova atividade biológica para rVu-LTP1.1, isto é, a atividade inibidora da  $\alpha$ -amilase que não é uma atividade biológica aleatória e provavelmente evoluiu para realizar uma função biológica que ainda é desconhecida e que possivelmente participa da defesa de plantas contra insetos. Em outra seção desse trabalho, para comprovar a multifuncionalidade das LTPs e relacionar atividades biológicas a regiões da rVu-LTP1.1, nos levou a estudar a possível região responsável pela inibição do crescimento de leveduras. Primeiramente, foi avaliada a atividade biológica da rVu-LTP1.1 na presença de cinco espécies de leveduras. Todas as leveduras apresentaram uma taxa de inibição, porém a mais sensível foi *Candida tropicalis*, que teve o crescimento inibido em 40,71% e o efeito foi fungicida. Desta maneira *C. tropicalis* foi escolhida para testar a atividade biológica dos cinco peptídeos sintéticos baseados em regiões da rVu-LTP1.1 (M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>-C<sub>27</sub>, N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>,  $\alpha$ S<sub>49</sub>-K<sub>72</sub> e  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub>). Dentre os peptídeos testados, o peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> inibiu 84,14% do crescimento da levedura com efeito fungicida. O ensaio inibitório da *C. tropicalis* na presença do peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> com a substituição da Arg<sub>39</sub> por Gln (peptídeo modificado N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>) foi feito e mostrou que N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> não inibe o crescimento e não provoca a morte da *C. tropicalis*. Sendo assim, conclui-se que para o peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>, a Arg na posição 39, é crucial para a atividade antimicrobiana, indicando que a carga e também sua posição são importantes para essa atividade biológica. Os resultados deste estudo também expandem para possíveis aplicações biotecnológicas das LTPs.

## ABSTRACT

Lipid transfer proteins (LTPs) are small cationic peptides found in several plant species. LTPs are divided into two families, being LTP1s composed of 10 kDa peptides while LTP2s of 7 kDa peptides. LTP1s are known to have a broad spectrum of biological activities such as: *in vitro* lipid transport, cutin synthesis,  $\beta$ -oxidation, somatic embryogenesis, food allergens, adaptation of plants to abiotic stresses,  $\alpha$ -amylase inhibitory activity and participation in plant defense. However, the relationship between structure and biological activities of LTP1s has not been described yet except the lipid binding and transport. An approximately 9 kDa LTP (belonging to family 1) was isolated from *Vigna unguiculata* L. Walp. (cowpea) and named *Vu*-LTP1.1. The ability of r*Vu*-LTP 1.1 (recombinant *V. unguiculata* LTP) to inhibit the activity of human salivary  $\alpha$ -amylase (HSA) has been discovered. Structural studies revealed that two peptides called N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> and  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> (comprising the r*Vu*-LTP1.1 loop regions containing positively charged amino acids) have the ability to inhibit HSA activity. The aim of this work was to study the relationship between the r*Vu*-LTP1.1 structure and its antifungal and  $\alpha$ -amylase inhibition activities. In this work was performed the comparative analysis between primary structures of LTP1s that had  $\alpha$ -amylase inhibitory activity with non-inhibitory LTP1s, and it was found that  $\alpha$ -amylase-active LTP1s had similar regions with positively charged amino acids, while LTP<sub>1</sub>s without activity on  $\alpha$ -amylase lacked these amino acids. From this study the peptide N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> was synthesized with a replacement of Arg<sub>39</sub> by Gln (modified peptide N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>) and its inhibitory activity on HSA was tested. This amino acid exchange led to the total loss of inhibitory activity on HSA, proving the importance of positively charged amino acids for enzyme inhibition. To understand the interaction of these peptides with HSA, we performed docking studies. We have shown that r*Vu*-LTP1.1 binds to the enzyme's carbohydrate binding cleft blocking it and preventing carbohydrate from entering. We also show that Arg<sub>39</sub>, identified in biochemical assays as the determining residue for HSA inhibition, inserts into the enzyme's active site and interacts with one of the amino acids of the catalytic triad, Asp<sub>300</sub>, by a hydrogen bond. The Arg<sub>39</sub>-Asp<sub>300</sub> interaction is sufficient to block the catalytic activity of the enzyme due to the requirement of the three amino acids of its catalytic site to cleave the glycosidic bond. Therefore, inhibition of HSA is due to obstruction of the carbohydrate-binding cleft, and due to the interaction between Arg<sub>39</sub> and Asp<sub>300</sub> of the enzyme active site. Thus, we describe a new biological activity for r*Vu*-

LTP1.1, that is, the  $\alpha$ -amylase inhibitory activity is not a random biological activity and has probably evolved to perform a biological function that is still unknown and possibly participates in plant defense against insects. In another section of this paper, to prove the multifunctionality of LTP1s and to relate biological activities to rVu-LTP1.1 regions, led us to study the possible region responsible for inhibiting yeast growth. First, the biological activity of rVu-LTP1.1 was evaluated in the presence of five yeast species. All yeasts had an inhibition rate, but the most sensitive was *Candida tropicalis*, which had its growth inhibited by 40.71% and the effect was fungicidal. Thus *C. tropicalis* was chosen to test the biological activity of the five synthetic peptides based on rVu-LTP1.1 regions (M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>-C<sub>27</sub>, N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>,  $\alpha$ S<sub>49</sub>-K<sub>72</sub>, and  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub>). Among the tested peptides N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> inhibited 84.14% of yeast growth with fungicidal effect. The inhibitory assay of *C. tropicalis* in the presence of peptide N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> with the replacement of Arg<sub>39</sub> by Gln (modified peptide N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>) was done and showed N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> did not inhibit growth and did not cause the death of *C. tropicalis*. It was concluded that Arg<sub>39</sub>, present in peptide N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>, is crucial for an antimicrobial activity, indicating that charge and also its position are important for this biological activity. The results of this study also expand to possible biotechnological applications of LTPs.

## 1- INTRODUÇÃO

Há mais de 500 milhões de anos as plantas colonizaram a terra, e para o seu estabelecimento às condições “inóspitas” deste novo ambiente foi desenvolvida uma camada epidérmica formada por cutina e cera. Essa barreira física impedia a perda de água e gases, protegendo as plantas da desidratação, ataque de herbívoros e radiação. Para a montagem dessa camada impermeável era necessária a presença de um transportador dos precursores dos polímeros de cutina e cera do local de síntese para a superfície da planta. Acredita-se que este “transportador” seja a proteína transportadora de lipídeos (LTPs, do inglês *lipid transfer proteins*) (Salminen *et al.*, 2018).

As LTPs de plantas foram, inicialmente, caracterizadas pela sua capacidade de transportar fosfolipídios. A partir de experimentos *in vitro* com extrato proteico de tubérculo de batata, foi constatada a presença de um “agente” promotor do transporte de fosfolipídeos entre uma fração microsomal (membrana doadora) e uma membrana aceptora (mitocôndria) (Kader, 1975). O isolamento e caracterização das LTPs em plantas deu-se anos mais tarde, a partir do extrato proteico de folhas de espinafre com semelhante atividade de transporte de lipídeos *in vitro* e foram nomeadas de proteínas transportadoras de fosfolipídeos (Kader *et al.*, 1984).

Nos anos 90, descobriu-se que estes peptídeos (LTPs) também transportavam ácidos graxos, a partir de então o seu nome foi substituído por proteína transportadora de lipídeos. A princípio foi sugerido que estes peptídeos, as LTPs, participassem de maneira intracelular da biogênese de membranas e regulação da síntese e degradação de ácidos graxos (Arondel e Kader, 1990; Tsuboi *et al.*, 1992). Entretanto, outro estudo revelou a presença de um peptídeo sinal na porção N-terminal, em grande parte das LTPs revelando que elas também se encontravam em ambiente extracelular ou/e associadas com a parede celular (Bernhard *et al.*, 1991; Thoma *et al.*, 1993). Diante dessa informação, foi sugerida a participação das LTPs na via de transporte de lipídeos, atribuindo a este peptídeo várias possíveis funções fisiológicas em plantas como a biossíntese de cutina através da sua habilidade de transportar monômeros de cutina (Wang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009), o papel de defesa de plantas contra patógenos fúngicos e bacterianos (Molina e García-Olmedo, 1993; Regente e De La Canal, 2000), oxidação de ácidos graxos (Tsuboi *et al.*, 1992) e sinalização (Blein *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2002).

Desde então, as LTPs de plantas tem sido isoladas de diversas espécies de plantas como *Nicotiana tabacum* (Fleming *et al.*, 1992), *Hordeum vulgare* (Skriver *et al.*, 1992), *Triticum durum* (Dieryck *et al.*, 1992), *Oryza sativa* (Lee *et al.*, 1998), *Arabidopsis thaliana* (Arondel *et al.*, 2000), *Vigna unguiculata* (Carvalho *et al.*, 2001), *Vigna radiata* (Lin *et al.*, 2005), *Coffea*

*canefora* (Zottich *et al.*, 2011), *Capsicum annuum* (Diz *et al.*, 2011), *Panax ginseng* (Cai *et al.*, 2016), *Pisum sativum* (Bogdanov *et al.*, 2016), entre outras espécies, exceto clorófitas e algas verdes (Edstam *et al.*, 2011). Apesar de serem amplamente distribuídas no reino Plantae esses peptídeos compartilham características estruturais altamente conservadas (Salminen *et al.*, 2016).

### **1.1 -Aspectos estruturais e classificação em famílias das LTPs**

LTPs são peptídeos carregados positivamente com massa molecular variando entre 7-10 kDa (Carvalho e Gomes, 2007; Finkina *et al.*, 2016). De acordo com a diferença em seu tamanho as LTPs são subdivididas em duas classes: LTP<sub>1</sub>s com aproximadamente 90 aminoácidos e as LTP<sub>2</sub>s com aproximadamente 70 aminoácidos (Kalla *et al.*, 1994) (Quadro 1).

Ambas classes compartilham características em comum como (1) pequeno tamanho, (2) a presença de oito resíduos de cisteínas distribuídos na estrutura primária, (3) a estrutura secundária formada por  $\alpha$ -hélices e (4) a presença de uma cavidade hidrofóbica na estrutura terciária que possibilita estes peptídeos se ligarem e transportarem moléculas lipídicas (Carvalho e Gomes, 2007; Kirubakaran *et al.*, 2008; Yeats e Rose, 2008; Odintsova e Egorov, 2012).

As LTP<sub>1</sub>s foram as primeiras a serem descobertas, possuindo massa molecular de aproximadamente 10 kDa (90 a 95 resíduos de aminoácidos). São ricas em glicina, prolina, serina e alanina, com baixo número de resíduos aromáticos. As LTP<sub>1</sub>s são formadas por quatro  $\alpha$ -hélices (40% da estrutura terciária) conectadas por voltas, além de uma cauda flexível na porção C-terminal da proteína. Nesta região, em algumas LTPs, existe uma volta do tipo 3<sup>10</sup> (Shin *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1998). Nas LTP<sub>1</sub>s é possível observar a presença de uma cavidade hidrofóbica flexível, no formato de túnel que atravessa toda a molécula e possui duas entradas, uma pequena e outra grande. Estudos sobre a dinâmica molecular do complexo entre a LTP<sub>1</sub>s de *Zea mays* (milho) e o ácido palmítico (C16:0) evidenciaram a interação do lipídeo com a cavidade hidrofóbica da LTP. Na entrada grande da cavidade da LTP de milho existe um resíduo de tirosina conservado que auxilia na estabilização do ácido palmítico dentro da cavidade formando uma ponte de hidrogênio entre a hidroxila da tirosina e o grupo carboxila da cabeça polar do ácido graxo. Esse túnel é recoberto por cadeias laterais de resíduos de aminoácidos em sua maioria hidrofóbicos (alanina, arginina, isoleucina, leucina, lisina, prolina, serina, treonina, tirosina e valina), o que confere caráter hidrofóbico a esta cavidade (Arondel e Kader, 1990; Kader, 1996; Sodano *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2001; Carvalho e Gomes, 2007; Yeats e Rose, 2008).



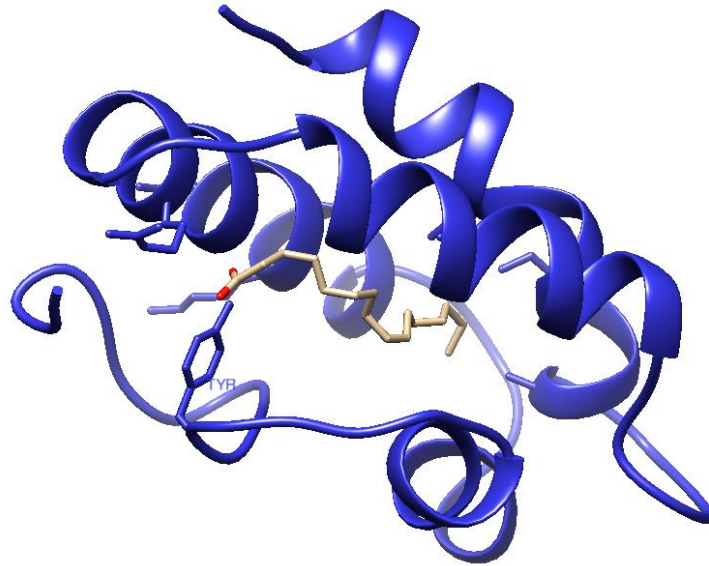
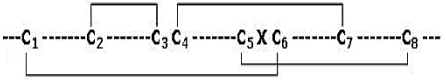
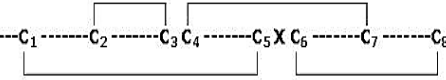
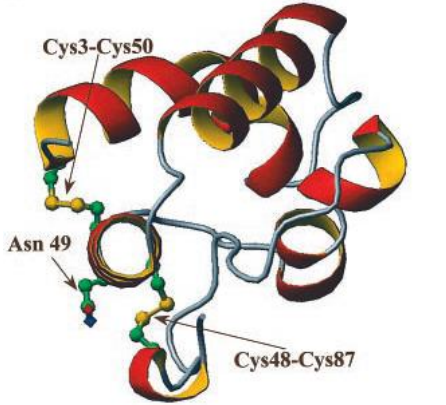
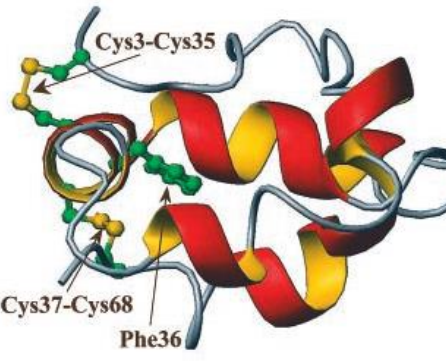


Figura 1 – Representação gráfica da estrutura tridimensional do complexo da LTP de *Zea mays* (milho) com ácido palmítico (C16:0). Em evidência a Tyr<sub>81</sub> interagindo com a cabeça polar do ácido palmítico. Esse esquema foi construído utilizando o PDB 1FK3, resultado do docking realizado por Han *et al.* (2001).

Diferentemente da classe das LTP<sub>1</sub>s, as LTP<sub>2</sub>s possuem massa molecular de cerca de 7 kDa (70 resíduos de aminoácidos aproximadamente). Sua estrutura secundária é semelhante às das LTP<sub>1</sub>s diferindo apenas no número de  $\alpha$ -hélices, as LTP<sub>2</sub>s possuem três  $\alpha$ -hélices e duas voltas simples na região C-terminal. Para a família LTP<sub>2</sub>s, estudos estruturais mostraram uma cavidade hidrofóbica menor quando comparada com a LTP<sub>1</sub>s e esta possui um formato triangular, sendo forrada pelos seguintes aminoácidos: alanina, cisteína, isoleucina, leucina, fenilalanina e valina. A cavidade das LTP<sub>2</sub>s é mais flexível, permitindo a acomodação de moléculas hidrofóbicas ainda maiores do que as transportadas pela família LTP<sub>1</sub>s (Samuel *et al.*, 2002; Yeats e Rose, 2008).

Entre as duas classes de LTPs ainda existem diferenças nos padrões de pareamento dos resíduos de cisteínas para a formação das pontes dissulfeto. Nas LTP<sub>1</sub>s as pontes dissulfeto são formadas entre Cys<sub>1</sub>-Cys<sub>6</sub> e Cys<sub>5</sub>-Cys<sub>8</sub> e nas LTP<sub>2</sub>s ocorre o pareamento da Cys<sub>1</sub>-Cys<sub>5</sub> e Cys<sub>6</sub>-Cys<sub>8</sub> (Odintsova e Egorov, 2012). A diferença mais importante ocorre nos resíduos entre as Cys<sub>5</sub> e Cys<sub>6</sub>, sendo estes resíduos hidrofílicos para as LTP<sub>1</sub>s e hidrofóbicos para LTP<sub>2</sub>s (Quadro 1). Em relação as atividades biológicas, as LTP<sub>1</sub>s são conhecidas por sua multifuncionalidade em plantas e as LTP<sub>2</sub>s participam na defesa de plantas (Carvalho e Gomes, 2007).

Quadro 1. Principais características entre as duas classes de LTPs de plantas.

Características	Classes	
	LTP <sub>1s</sub>	LTP <sub>2s</sub>
Massa molecular	10kDa	7kDa
Padrão pareamento de cisteína		
Diferença no padrão C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>	-C[resíduos hidrofílicos]C-	-C[resíduos hidrofóbicos]C-
Formato cavidade hidrofóbica	Túnel	Triangular
Estrutura tridimensional		

Foi criado um novo sistema de classificação para as subfamílias das LTPs que tem como critério a diferença no espaçamento das cisteínas (cys), nas posições dos íntrons, sítios de modificação glicosilfosfatidilinositol e na similaridade de sequências, sendo divididas em 10 grupos (tipos I, II, C, D, E, F, G, H, J e K) (Edstam *et al.*, 2011).

## 1.2- Expressão gênica e localização celular das LTPs

A análise de expressão gênica de algumas plantas revelou que as LTPs são codificadas por famílias multigênicas formadas por um conjunto de genes responsáveis pela expressão de diferentes isoformas de LTPs. Em *A. thaliana* (dicotiledônea) foi revelada a presença de 15 genes que codificam para LTPs e em *O. sativa* (monocotiledônea) foram identificados pelo menos três genes que codificam para LTPs sintetizadas em diversos tecidos e órgãos de plantas como folhas, flores, frutos, troncos, sementes e mais raramente em raízes (Salcedo *et al.*, 2007). Os órgãos aéreos são responsáveis pelos maiores níveis de expressão de LTPs em plantas, porém os padrões de expressão são modulados de acordo com a variação das condições ambientais (seca, frio e estresse salino), estresses bióticos e idade dos tecidos. Em um estudo de Tapia e colaboradores (2013) foi visto o aumento de expressão da LjLTP10, quando *Lotus japonicus* era mantida em condições de estresse hídrico. Estudos *in silico* sugerem que esta LTP transporta palmitoil-CoA para células epidérmicas das folhas e caules da *L. japonicus* para a síntese de cutina impedindo a perda de água pela planta (Tapia *et al.*, 2013).

Experimentos mostraram que a expressão das LTPs em *Brassica oleracea* (brócolis) é de 50% do total de proteínas sintetizadas por folhas jovens enquanto que as folhas mais velhas expressam apenas 4% (Pyee *et al.*, 1994). Os níveis de expressão de LTPs também podem ser aumentados quando a planta é atacada por micro-organismos como bactérias e fungos e até mesmo vírus (Sohal *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2006).

Análise no padrão de expressão de LTPs mostrou a importância dessas proteínas na defesa de plantas contra fitopatógenos. Durante investigação da expressão de genes responsáveis pela resistência de *Triticum aestivum* (trigo) ao fungo *Fusarium gramineum* foi identificada uma alta expressão da LTP, cerca de 50 vezes maior em plantas que carregam o alelo de resistência Qfhs.ifa-5A (Schweiger *et al.*, 2013).

Em outro estudo, *Arabidopsis* transgênica que superexpressa o gene da TdLTP4 de *Triticum durum* (trigo duro) apresentou maior resistência à infecção por *Alternaria solani* e *Botrytis cinérea*, revelando a importância desta LTP na resistência à infecção por fitopatógenos (Safi *et al.*, 2015).

A localização das LTPs nas células não é dependente da espécie vegetal. As LTPs são normalmente sintetizadas como pré-proteínas contendo peptídeo sinal que as direciona para o ambiente extracelular (Kader, 1997; Douliez *et al.*, 2000; Carvalho e Gomes, 2007). Porém existem algumas LTPs localizadas em diferentes organelas, como as LTPs de sementes de *Ricinus communis* (mamona) que são detectadas em glioxissomos (Tsuboi *et al.*, 1992), as LTPs

de sementes de *Triticum aestivum* (trigo) são encontradas em pequenas inclusões de grânulos de aleurona (Dubreil *et al.*, 1998), as LTPs de sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) são acumuladas em vacúolos proteicos, além da parede celular (Carvalho *et al.*, 2004) e as LTPs de sementes de *Capsicum annuum* (pimenta) são encontradas em vesículas (Diz *et al.*, 2011).

### 1.3 - Atividades biológicas das LTPs

As LTP<sub>1</sub>s possuem uma ampla gama de atividades biológicas, colocando as LTP na categoria de peptídeo multifuncional, em contraste com as LTP<sub>2</sub>s que participam do transporte de lipídeos *in vitro* e provável participação na sinalização em vias de resposta de defesa de plantas. Tem sido descrita a participação das LTP<sub>1</sub>s em: defesa de plantas contra alguns fitopatógenos fúngicos e bacterianos (Molina; Garcia e Olmedo, 1997; Kader, 1997; Krintensen *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2009), atividade inibitória sobre alguns fungos e bactérias *in vitro* (Segura *et al.*, 1993; Cammue *et al.*, 1995; Regente e De La Canal, 2000; Regente *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2008), atividade inibitória sobre proteases (Jones e Marinac, 1997; Sawano *et al.*, 2008) e atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase *in vitro* (Diz *et al.*, 2011, Zottich *et al.*, 2011; Vieira-Silva *et al.*, 2018a).

Sugere-se que o acúmulo de diferentes atividades biológicas pelas LTP<sub>1</sub>s foi desenvolvida a partir da duplicação gênica que originou genes parálogos. Com o passar do tempo, o gene duplicado passou por especialização e, assim, ganhou novas atividades biológicas, que, portanto, permitem que ele desempenhe novas funções dentro do organismo (Wang *et al.*, 2012; Khersonsky *et al.*, 2006). Acredita-se que essas novas funções tenham contribuído para o estabelecimento e sobrevivência de muitas espécies ao longo da evolução (Nobeli *et al.*, 2009). Uma evidência é a presença de LTPs em plantas terrestres exceto em algas, sugerindo sua importância na adaptação de plantas ao meio terrestre (Edstam *et al.*, 2011).

Para as LTP<sub>1</sub>s a única atividade biológica que apresenta estudos de relação entre estrutura e atividade biológica é o transporte de lipídeos *in vitro*. Esta atividade está relacionada à presença de uma cavidade hidrofóbica no interior das LTP<sub>1</sub>s (Han *et al.*, 2001). O transporte de lipídeos observado *in vitro* pode ser relacionado com algumas prováveis funções biológicas, como a síntese de cutina (Wang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009) e a  $\beta$ -oxidação (Tsuboi *et al.*, 1992). Acredita-se que apenas o transporte de lipídeos tenha um papel biológico em plantas. Entre as evidências está o trabalho de Jacq e colaboradores (2017) em que foi desenvolvida uma *A. thaliana* mutante que não expressava a AtLTP2, posteriormente renomeada de

AtLTP1.4 por pertencer a classe das LTP<sub>1</sub>s devido à sua massa molecular de 9,6 kDa (Salminen *et al.*, 2018). AtLTP1.4 é expressa na epiderme de órgãos aéreos e foi observado que a *A. thaliana* mutante apresentou aumento da permeabilidade da cutícula quando comparada ao tipo selvagem. Apesar de apresentar diferenças pequenas na composição lipídica da cutícula esse mutante exibe deformidades na interface parede celular-cutícula. Estes resultados revelaram a importância da expressão endógena da AtLTP1.4, proteína com importante papel estrutural no processo de aderência entre a cutícula hidrofóbica e a parede celular hidrofílica.

A atividade biológica melhor entendida e que está diretamente relacionada à função de defesa de plantas é a atividade antimicrobiana (Molina e García-Olmedo, 1993; Regente e De La Canal, 2000). As primeiras evidências da participação das LTPs em defesa de plantas contra fitopatógenos vieram a partir de experimentos *in vitro* que evidenciavam a ação antimicrobiana desta classe de peptídeos. Entre estes estudos nós podemos destacar o estudo realizado com a LTP de semente de *Raphanus sativus* (rabanete) que inibiu o crescimento de diversos fungos (Terras *et al.*, 1992). Em outro experimento utilizando LTPs extraídas de folhas *A. thaliana* e *Spinacia oleracea* (espinafre) foi possível observar a ação antifúngica e antibacteriana destes peptídeos (Segura *et al.*, 1993), sendo também possível observar o aumento da expressão gênica da LTP em *Hordeum vulgare* (cevada) após inoculação do fungo *Erysiphe graminis* (Molina *et al.*, 1993). A direta correlação das LTPs com defesa de plantas foi consolidada a partir de três fatores: (1) aumento da expressão de genes de LTP<sub>1</sub>s em resposta à infecção por patógenos (Jiang *et al.*, 2011), (2) atividade antimicrobiana direta demonstrada *in vitro* (Segura *et al.*, 1993; Regente e De La Canal, 2000) e a (3) produção de plantas transgênicas resistentes à patógenos produzidas de maneira recombinante expressando os genes das LTP<sub>1</sub>s (Zhu *et al.*, 2012).

Sendo assim, a atividade antimicrobiana se tornou a atividade biológica mais descrita para as LTP<sub>1</sub>s, sendo mostrada em: folhas de *S. oleracea* (espinafre), *H. vulgare* (cevada), *Z. mays* (milho) e *Beta vulgaris* (beterraba) e de sementes de *T. aestivum* (trigo), *R. sativus* (rabanete), *Helianthus annuus* (girassol) e *Z. mays* que apresentaram propriedades inibitórias sobre fitopatógenos, como, por exemplo, *Pseudomonas solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma viride* e *Cercospora beticola* (Segura *et al.*, 1993; Dubreil *et al.*, 1998; Kristensen *et al.*, 2000; Regente e De La Canal, 2000; Velazhahan *et al.*, 2001).

Existem também LTPs que possuem ação antifúngica: como em *Phaseolus mungo* (feijão) sobre *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolfsii* (Wang *et al.*, 2004); em *Panax ginseng* (ginseng) sobre os fungos *Sclerotinia sp.*, *R. solani* e *P. cactorum* (Cai *et al.*,

2016); em *Pisum sativum* (ervilha) sobre os fungos *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Neurospora crassa* (Bogdanov *et al.*, 2016). O efeito antifúngico *in vitro* das LTPs reforça o seu importante papel na função de defesa de plantas que é corroborado por experimentos que mostram plantas transgênicas que superexpressam gene de LTP são resistentes às infecções por fitopatógenos (Roy-Barman *et al.*, 2006; Sarowar *et al.*, 2008; Safi *et al.*, 2015).

#### **1.4- Infecções fúngicas e seus potenciais terapêuticos dos peptídeos antimicrobianos**

O desenvolvimento de novas substâncias terapêuticas tem se tornado necessário diante do atual cenário da saúde mundial em que o número de micro-organismos patogênicos resistentes aos tratamentos e medicamentos clássicos tem crescido (Ciociola *et al.*, 2016). As infecções fúngicas têm crescido a números alarmantes devido à falta de um diagnóstico preciso e pelo tratamento com drogas inadequadas (Denning *et al.*, 2017).

A grande maioria dos fungos que causam morte de seres humanos são dos gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* ou *Pneumocystis* (Brown *et al.*, 2012; Cowen *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014), sendo as espécies de *Candida*, os fungos leveduriformes mais frequentes em infecções hospitalares. *Candida* é um micro-organismo comensal que em indivíduos saudáveis colonizam pele, sistema gastrointestinal, flora vaginal entre outros tecidos e sistemas, sem causar nenhum tipo de doença, entretanto diante do comprometimento do sistema imune podem atuar como micro-organismos oportunistas causando doenças como candidíase e candidemia ao hospedeiro (Lum *et al.*, 2015). A candidíase exige longos períodos de tratamento, além de causar uma alta taxa de mortalidade de cerca de 50% em pacientes hospitalizados e imunocomprometidos (Doi *et al.*, 2016).

Entre as espécies de *Candida*, *C. albicans* dominava as infecções fúngicas com cerca de 70-80% dos isolados clínicos, porém nos últimos anos outras espécies de *Candida* tem emergido como a *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (Silva *et al.*, 2011; Zuza-Alves, 2017).

Os dados indicam a necessidade de estratégias mais racionais tanto de prevenção quanto de tratamento da infecção. Adicionalmente tem se notado alguns casos de resistência desses patógenos aos antifúngicos clínicos como fluconazol e anfotericina B, tornando o problema mais sério (Sanglard *et al.*, 2003; Anderson, 2005). Como os antifúngicos atualmente utilizados possuem um número limitado de alvos intracelulares, os peptídeos antimicrobianos (AMP, do inglês *antimicrobial peptides*) ou peptídeos baseados em AMPs têm chamado a atenção de pesquisadores como promissoras novas drogas, devido interação com a membrana do micro-

organismo e em muitos casos possui múltiplos alvos intracelulares, além de características imunomodulatórias (Porto *et al.*, 2018).

Na literatura nós encontramos publicações que correlacionam regiões da estrutura de AMPs com atividades antimicrobianas. Nestes estudos são sintetizados peptídeos baseados na sequência de aminoácidos de AMPs naturais, a fim de descobrir qual região é responsável por sua atividade biológica, assim como a região mínima responsável pela atividade biológica (Liu *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007). Essas pequenas regiões análogas aos AMPs têm se mostrado muito efetivas na inibição do crescimento e perda da viabilidade de células microbianas. A redução no tamanho dos AMPs agregam vantagens como redução das concentrações inibitórias aumentando sua efetividade, apresentam baixa toxicidade as células de mamíferos, diminuição do custo de produção e possuem amplo espectro de ação tornando possível o desenvolvimento de fármacos a partir de AMP (Afacan *et al.*, 2012; Porto *et al.*, 2018).

### **1.5- Inibidores de $\alpha$ -amilase e seu potencial biotecnológico**

Como antes mencionado no item 1.3, as LTPs tem sido descritas também como inibidores de  $\alpha$ -amilases (Diz *et al.*, 2011; Zottich *et al.*, 2011). Essa atividade foi inicialmente sugerida na década de 1980 por um estudo de Svensson e colaboradores (1986) no qual foi isolada uma proteína de semente de *H. vulgare* com 10 kDa, que possuía sequência primária semelhante a um inibidor de protease/ $\alpha$ -amilase. Estudos de homologia revelaram que essa proteína (ainda não era identificada como uma LTP) possuía identidade de 50% com o inibidor I-2 (*Eleusine coracana*), um inibidor de  $\alpha$ -amilases também de origem vegetal. No entanto, em testes de inibição essa proteína não se mostrou capaz de inibir enzimas, incluindo  $\alpha$ -amilases. Bernhard e Somerville (1989) realizaram um alinhamento das sequências primárias da proteína de *H. vulgare* e do inibidor I-2 com sequências de LTPs de várias espécies, contidas em bancos de dados. Este alinhamento revelou alto grau de similaridade entre os inibidores e as LTPs sendo possível classificar essas proteínas como pertencentes à família de proteínas transportadoras de fosfolipídeos (antigo nome da família das LTPs). Durante mais de 20 anos a atividade de inibir  $\alpha$ -amilases das LTPs não foi estudada e a retomada do estudo da atividade inibitória *in vitro* se deu anos mais tarde com Zottich *et al.* (2011) onde foi apresentada a atividade inibitória da LTP de *C. canephora* sobre  $\alpha$ -amilase salivar humana. Posteriormente a mesma atividade foi mostrada para LTP de *Capsicum annuum* (pimenta) (Diz *et al.*, 2011) e LTP de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) (Vieira-Silva *et al.*, 2018a).

Atualmente, são conhecidas sete classes de inibidores de  $\alpha$ -amilase proteicos, seis plantas: (1) inibidores semelhante à knotina, (2) inibidores semelhantes à defensina, (3)

inibidores proteínas CM (cereal), (4) inibidores semelhantes à Kunitz, (5) inibidores semelhantes à taumatina e (6) inibidores semelhantes à lectina. A sétima classe é de micro-organismos: inibidores semelhantes à *Streptomyces* (Svensson *et al.*, 2004). Muitos representantes dessas classes foram estruturalmente analisados em complexos com  $\alpha$ -amilases, então o mecanismo de inibição foi melhor compreendido. Muitas  $\alpha$ -amilases foram identificadas, e quase todas possuem uma tríade de aminoácidos carregados negativamente, Asp-Glu-Asp, no sítio ativo no domínio A da enzima (Matsuura, 2002). Estudos de complexos identificaram os aminoácidos do inibidor que interagem com os aminoácidos do sítio ativo das  $\alpha$ -amilases, que inibem a atividade enzimática. Alguns destes estudos revelaram que um aminoácido carregado positivamente do inibidor interagiu fisicamente com um ou mais resíduos carregados negativamente da tríade no sítio catalítico da enzima. Por exemplo, Arg<sub>19</sub> em Tendamistat (um inibidor semelhante à *Streptomyces*) forma uma ponte salina com Glu<sub>233</sub> da tríade catalítica da  $\alpha$ -amilase pancreática suína (Wiegand *et al.*, 1995); Arg<sub>7</sub> em AAI (um inibidor de  $\alpha$ -amilase de amaranto de *Amaranthus hypochondriacus*, um inibidor semelhante à knotina) forma uma ponte salina com Asp<sub>287</sub> na  $\alpha$ -amilase de *Tenebrio molitor* (TMA, do inglês *Tenebrio molitor  $\alpha$ -amylase*) (Pereira *et al.*, 1999).

Em outro trabalho foi observado que a VrD1 (defensina 1 de *Vigna radiata*, um inibidor semelhante à defensina) possui uma volta entre as folhas  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3 correlacionada com a atividade inibitória sobre TMA (Liu *et al.*, 2006). Utilizando metodologia de engenharia estrutural, foi realizada a substituição da volta original da defensina 2 de *V. radiata* (VrD<sub>2</sub>) incapaz de inibir a atividade da  $\alpha$ -amilase a volta ativa da VrD<sub>1</sub>. Após ensaios bioquímicos observou-se que a VrD<sub>2</sub> modificada tornou-se capaz de inibir a atividade da TMA, e um resíduo básico (Arg<sub>38</sub>) da volta VrD<sub>1</sub> está envolvido na inibição (Lin *et al.*, 2007). Outros exemplos de inibidores têm outros padrões de interações dos aminoácidos com  $\alpha$ -amilases (Svensson *et al.*, 2004). O exemplo de VrD1, cuja atividade biológica está contida em uma sequência organizada em uma volta (Liu *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007) é observada para outras proteínas biologicamente ativas.

Brazzeina, um peptídeo similar à defensina da planta africana *Pentadiplandra brazzeana*, induz um gosto intensamente doce em primatas do velho mundo, incluindo seres humanos. A indução funcional do sabor doce é devido a três regiões na estrutura tridimensional da brazzeina que forma voltas nas quais resíduos carregados positivamente, especialmente Arg<sub>33</sub> e Arg<sub>43</sub>, são determinantes para a indução do gosto doce (Assadi-Porter *et al.*, 2010). A volta entre as cadeias  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3 da defensina Rs-AFP2 de *R. sativus* retém a atividade antifúngica de todo o peptídeo (Schaaper *et al.*, 2001). A volta  $\beta$ -hairpin (CGGWHRLRC) em MGD1, uma defensina do mexilhão comestível *Mytilus galloprovincialis*, é responsável pela atividade



antimicrobiana do peptídeo (Romestand *et al.*, 2003). Com base na análise dos inibidores proteicos da  $\alpha$ -amilase complexados com a enzima, percebemos que aminoácidos carregados positivamente expostos ao solvente nos inibidores são responsáveis pela atividade inibitória. E também que a atividade biológica de algumas proteínas é devido a uma sequência estruturalmente organizada em uma volta. Comparando estas informações com nosso conhecimento sobre a classe LTP<sub>1</sub>, que é muito rica em aminoácidos carregados positivamente, principalmente Arg e Lys (Carvalho e Gomes, 2007) e que a rVu-LTP1.1 tem quatro resíduos de Arg e quatro resíduos de Lys (Carvalho *et al.*, 2006).

Os inibidores de  $\alpha$ -amilase têm potencial uso biotecnológico em indústria, agronomia e medicina. Nos processos industriais nos quais os carboidratos devem ser preservados, inibidores de  $\alpha$ -amilase são requeridos (Zawistowska *et al.*, 1988), e sendo demonstrado, portanto, que o inibidor de  $\alpha$ -amilase de cevada-I melhora a qualidade da espuma de cerveja (Okada *et al.*, 2008) e a mesma propriedade tinha sido relatada para LTP<sub>1</sub>s (Okada *et al.*, 2008; Van Nierop *et al.*, 2004). Na agricultura, o uso mais provável é na proteção de plantas cultivadas contra o ataque de insetos com a vantagem do aumento da produção agrícola através da redução da predação de grãos com a característica aditiva de evitar insetos não-alvo, e diminuição da contaminação de consumidores pela redução do uso de agrotóxicos. Essa abordagem foi apresentada pela resistência adquirida à principal praga das ervilhas, *Bruchus pisorum* (gorgulho da ervilha), por *P. sativum* transformada com  $\alpha$ AI-1 de *Phaseolus vulgaris* (feijão) em condições de campo (Morton *et al.*, 2000). Na medicina, o principal uso de inibidores de  $\alpha$ -amilase é a prevenção de doenças pós-prandiais, digestão de carboidratos em humanos. Esta abordagem apresenta o potencial para melhorar a qualidade de vida dos pacientes que sofrem de obesidade e suas consequências clínicas (Udani *et al.*, 2004; Tormo *et al.*, 2004; 2006).

Nosso grupo de pesquisa caracterizou as LTP<sub>1</sub>s isoladas de *C. canephora* e *C. annuum* capazes de inibir a atividade da  $\alpha$ -amilase salivar humana (HSA, do inglês human salivary  $\alpha$ -amylase) (Zottich *et al.*, 2001; Diz *et al.*, 2011). A grande pergunta é se a atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase nas LTP<sub>1</sub>s é fortuita ou evoluiu para realizar uma função biológica, para responder a essa pergunta, usamos uma LTP<sub>1</sub>s previamente isolada de semente de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) denominada VuLTP1.1. O objeto de estudo desse trabalho é usar uma LTP<sub>1</sub> previamente isolada da semente de *V. unguiculata* (Carvalho *et al.*, 2001) como ferramenta para estudar a atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase de LTP<sub>1</sub>s. Inicialmente nós caracterizamos a atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilases salivar humana e intestinal de *Callosobruchus maculatus* pela rVuLTP1.1. E para descobrir se existia alguma região estrutural responsável pela inibição da HSA, primeiramente realizamos o estudo da estrutura tridimensional da rVuLTP1.1,

selecionamos cinco regiões baseadas na sequência primária da proteína e sintetizamos comercialmente quatro regiões, exceto a região N-terminal. Posteriormente nós realizamos o ensaio de inibição da HSA e descobrimos que duas regiões, N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub>, baseadas em regiões estruturais da rVuLTP1.1 eram responsáveis pela inibição da HSA.

Neste trabalho, nós realizamos o alinhamento de diversas LTP<sub>1</sub>s com e sem atividade sobre  $\alpha$ -amilase e descobrimos que elas possuem similaridades em determinadas regiões estruturais, diante disso nós sintetizamos um peptídeo modificado (N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>) baseado em um dos peptídeos que detinha atividade sobre  $\alpha$ -amilase substituindo a Arg<sub>39</sub> por uma Gln. O peptídeo modificado perdeu a capacidade de inibir  $\alpha$ -amilase confirmando a importância de R<sub>39</sub> na inibição da enzima. Para confirmar a participação da Arg<sub>39</sub> na inibição da  $\alpha$ -amilase salivar humana foram realizados estudos de *docking* que confirmaram a participação deste resíduo tanto na inibição do peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> quanto na rVuLTP1.1 inteira.

Na continuação dos nossos estudos e para uma melhor caracterização da atividade antifúngica das LTP<sub>1</sub>s realizamos o estudo da relação entre estrutura e atividade da rVuLTP1.1, agora sobre leveduras. Nesta parte do trabalho nós utilizamos os mesmos peptídeos usados no estudo da inibição de  $\alpha$ -amilases. Coincidentemente o peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> da rVuLTP1.1 também inibiu o crescimento da levedura *Candida tropicalis*, além de causar perda da viabilidade das células deste micro-organismo. Em ensaios utilizando o peptídeo modificado N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> descobrimos a importância da Arg<sub>39</sub> também para a atividade antifúngica da rVuLTP1.1.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a relação entre a estrutura e atividades biológicas da LTP<sub>1S</sub> usando a atividade inibitória da rVu-LTP1.1 sobre a  $\alpha$ -amilase salivar humana e sobre fungos leveduriformes.

### 2.2 - Objetivos específicos

1. Realizar o desenho do peptídeo correspondente a porção N-terminal da rVu-LTP1.1 (M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub>);
2. Testar a atividade inibitória do peptídeo M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub> sobre  $\alpha$ -amilase salivar humana;
3. Buscar em banco de dados por LTPs com a capacidade de inibir  $\alpha$ -amilase e alinhar estas LTPs com a rVu-LTP1.1, sobrepondo este alinhamento com as regiões (peptídeos sintéticos) da rVu-LTP1.1 inibidores de  $\alpha$ -amilase;
4. Resolver o modelo tridimensional do peptídeo similar a LTPs, I-2;
5. Realizar o desenho do peptídeo modificado N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>;
6. Testar a atividade inibitória do peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> sobre  $\alpha$ -amilase salivar humana;
7. Resolver um novo modelo tridimensional para rVu-LTP1.1;
8. Construir, avaliar e comparar os complexos teóricos entre rVu-LTP1.1, tendamistat, N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e,  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> e N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> com  $\alpha$ -amilase salivar humana;
9. Avaliar a atividade inibitória da rVu-LTP1.1 sobre o crescimento das leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida buinesis*, *Candida pelliculosa* e *Candida parapsilosis*;
10. Comparar a atividade inibitória da rVu-LTP1.1 e dos peptídeos sintéticos sobre *C. tropicalis*;
11. Avaliar a atividade inibitória do peptídeo sintético modificado N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> sobre *C. tropicalis*.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Materiais biológicos

##### 3.1.1- LTPs e peptídeos sintéticos

A rVu-LTP1.1 foi obtida de maneira recombinante sendo a expressão e purificação feitas de acordo com protocolo de Vieira-Silva *et al.* (2018a).

Neste trabalho foi inicialmente sintetizado o peptídeo sintético M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub>, que corresponde a porção N-terminal da rVu-LTP1.1. Este peptídeo foi obtido comercialmente pela empresa Genone (São Paulo). O peptídeo M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub> sofreu substituição dos resíduos de L-cisteína pelos resíduos de L-alanina. Os peptídeos C<sub>13</sub>-C<sub>27</sub>, αS<sub>49</sub>-K<sub>72</sub>, N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>, abrangem parte das α-hélices e as voltas de ligação entre elas e o quinto peptídeo, αG<sub>74</sub>-N<sub>91</sub>, foi baseado na região C-terminal da rVu-LTP1.1. Estes peptídeos foram obtidos como descrito em Vieira-Silva *et al.* (2018b) e foram utilizados nos ensaios com as leveduras.

Os peptídeos sintéticos M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub> tiveram seu resíduo de cisteína trocado por L-alanina e αS<sub>49</sub>-K<sub>72</sub> e αG<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> tiveram seus resíduos de cisteína trocados pelo resíduo do ácido L-α-aminoisobutírico. A alanina e o ácido L-α-aminoisobutírico foram escolhidos porque são aminoácidos pouco volumosos e não carregados. Ambas as substituições foram realizadas para evitar a formação de pontes dissulfeto que não existem na rVu-LTP1.1 e também para evitar resíduos livres de cisteína. As principais características bioquímicas dos peptídeos são mostradas na Tabela 1.

**Tabela 1. Nome, sequência e principais características bioquímicas dos peptídeos sintéticos baseados na sequência da rVu-LTP1.1.**

Nome do peptídeo	Sequência de aminoácidos	Taxa de hidrofobicidade	Carga (pH7.0)	Massa molecular (Da)
M <sub>1</sub> -Q <sub>12</sub>	<u>MTAGQVQGNLAQ</u>	41,67%	0	1217,36
C <sub>13</sub> -C <sub>27</sub>	*CIGFLQNGGIVPPAC*	53,33%	0	1488,78
N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub>	NGVKNILNG <u>ARTTADRRGI</u>	31,58%	+3	2026,29
αS <sub>49</sub> -K <sub>72</sub>	SαLKSAAGAV <u>RGLNPANAQALPGK</u>	54,17%	+3	2276,62
αG <sub>74</sub> -N <sub>91</sub>	<u>GVNIPWKISSSTN</u> αNTIN	38,89%	+1	1930,16

\* indicam que estes aminoácidos foram ligados por pontes dissulfeto (peptídeo cíclico);

α indica que os resíduos de cisteínas foram substituídos por resíduos de ácido L-α-aminoisobutírico.

### 3.1.2- Manutenção das leveduras

As cepas das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (1038), *Candida albicans* (CE022), *Candida tropicalis* (CE017), *Candida buinesis* (3982), *Candida pelliculosa* (3974) e *Candida parapsilosis* (CE002) foram mantidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. As leveduras foram mantidas em ágar Sabouraud (peptona de carne 10 g/L, peptona de caseína 5 g/L, D (+) glicose 20 g/L e ágar 17 g/L) (Merck Millipore Brasil) a 4 °C e para manutenção das células a cada três meses elas foram transferidas para novo meio, crescidas a 30 °C por 24 h e então mantidas a 4 °C até novo repique.

### 3.2- Síntese dos peptídeos sintéticos M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub> e N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>

Os peptídeos que compreendem a região N-terminal da Vu-LTP1.1 (M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub>) e o peptídeo modificado (N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>) foram sintetizados pela empresa Genone (São Paulo). Um miligrama do peptídeo sintético foi solubilizado em água ultra-pura contendo 3% de dimetilsulfóxido (DMSO). Os peptídeos dissolvidos foram armazenados em alíquotas de 50 µL a -70 °C.

## Seção I - Estudo do mecanismo de inibição da rVu-LTP1.1 sobre a $\alpha$ -amilase salivar humana

### 3.3- Ensaio de inibição da $\alpha$ -amilase com o peptídeo sintético M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub>

O ensaio foi baseado em parâmetros pré-determinados para a inibição da  $\alpha$ -amilase salivar humana (HSA, do inglês *human salivary  $\alpha$ -amylase*) pela rVu-LTP1.1 (Vieira-Silva *et al.*, 2018a) como tempo de incubação de 15 min, temperatura de reação 37 °C, 5 U da HSA e 20  $\mu$ M de rVu-LTP1.1 que mais inibiu a enzima. O ensaio de inibição foi realizado como descrito por Vieira-Silva *et al.* (2018a) para o peptídeo sintético M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub>. Resumidamente, a hidrólise do amido foi quantificada pela redução da liberação de açúcar com base no ensaio colorimétrico com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Bernfeld, 1955). A atividade da HSA (tipo IX-A, Sigma-Aldrich) foi determinada pela incubação da enzima em três volumes diferentes (estoque em frasco 1 mg/mL) com 1% de solução de amido (Sigma-Aldrich) a 37 °C durante 15 min (volume final de 50  $\mu$ L). Após a incubação, 200  $\mu$ L da solução de DNS foi adicionada à reação e aquecida a 100 °C durante 5 min. Após resfriamento à temperatura ambiente, as amostras foram lidas a 540 nm (Spectroquant Pharo 100, Merck). A unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade da enzima que aumentou a absorvância de 540 nm por 0,1 unidade de absorvância por 15 min.

Para a determinação da inibição da HSA, 5 U da HSA e 20  $\mu$ M do peptídeo sintético foi previamente incubado por 15 min a 37 °C e a determinação da atividade residual da HSA foi determinada como descrito no parágrafo acima. A percentagem de inibição foi calculada tomando o controle como 100% da atividade da HSA. O ensaio foi repetido três vezes. A reação do controle foi feita na ausência do peptídeo sintético, isto é, apenas HSA e amido. Como foi acrescentado 3% de DMSO para a ressuspensão do peptídeo sintético M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub>, o controle foi preparado na mesma concentração de DMSO.

### 3.4- Alinhamento das sequências de LTPs

Sequências de LTPs, as quais possuem e não possuem atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilases já descritas, foram obtidas dos bancos de dados “Pubmed no National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) e UniProt (consórcio UniProt, 2016) utilizando como palavras de busca “*lipid transfer protein*”, “*inhibitor*” e “*amylase*”. O alinhamento das sequências de aminoácidos das LTPs selecionadas com e sem

atividade inibitória sobre amilases, incluindo a rVu-LTP1.1 foi feito com Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) com parâmetros padrões (Sievers *et al.*, 2011). O alinhamento final foi otimizado manualmente. Após este primeiro alinhamento foi feita a análise dos dados com a sobreposição deste alinhamento com as regiões da rVu-LTP1.1 que inibem  $\alpha$ -amilase.

### 3.5- Desenho de um peptídeo com a substituição de um aminoácido

Baseado no estudo do alinhamento das LTPs que detinham atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase e as LTPs que não possuíam esta habilidade e, principalmente, com a sobreposição destas LTPs com as regiões da rVu-LTP1.1 que eram responsáveis pela inibição da enzima, ficou evidente que as LTPs que detinham esta atividade possuíam um aminoácido carregado positivamente na mesma região dos peptídeos baseados na rVu-LTP1.1. Com base nesta análise e para identificar o aminoácido determinante para a atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase, o peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> foi sintetizado com a substituição da Arg<sub>39</sub> por Gln. Este peptídeo foi denominado N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>. A atividade inibitória do peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> sobre a HSA foi determinada como descrito no item 3.3.

### 3.6- Modelagem I-2

O modelo tridimensional do I-2, um peptídeo similar às LTPs que tem a capacidade de inibir  $\alpha$ -amilase, foi previsto por modelagem por homologia usando o programa Modeller 9v15 (Šali e Blundell, 1993). Primeiramente, foi selecionado o modelo. Para isso, foi realizada uma busca no banco de dados BLAST (Altschul *et al.*, 1990) por sequências primárias que apresentaram similaridade com I-2 usando como termo de busca a sequência de aminoácidos da proteína a ser modelada.

A sequência com maior grau de similaridade e identidade com I-2 foi escolhida como proteína molde. A sequência molde e a I-2 foram alinhadas utilizando o programa Clustal Omega (Larkin *et al.*, 2007).

Com base na sobreposição de regiões estruturalmente conservadas entre a I-2 e proteína molde, o programa Modeller construiu um modelo tridimensional.

A qualidade estereoquímica do modelo, que analisa as ligações peptídicas, planaridade dos anéis das cadeias laterais, torção dos ângulos  $\phi$  e  $\psi$  da cadeia principal, foi validada

utilizando o programa PROCHECK (gráfico de Ramachandran) (Laskowski *et al.*, 1993). O perfil tridimensional foi avaliado pelo servidor PARMODEL (Uchôa *et al.*, 2004).

## **Seção II - Análise *in silico* do mecanismo de inibição da *Vu*-LTP1.1 sobre a $\alpha$ -amilase salivar humana**

### **3.7- *Vu*-LTP1.1, HSA e tendamistat: estruturas primária e terciária**

A estrutura primária de r*Vu*-LTP1.1 foi obtida por Carvalho *et al.* (2006). A estrutura tridimensional da r*Vu*-LTP1.1 foi prevista por modelagem por homologia usando o programa Modeller 9v15 (Šali e Blundell, 1993) e como modelo tridimensional a LTP de *Vigna radiata* var. *radiata* (ID do PDB: 1SIY). A qualidade estereoquímica global e local de todos os modelos previstos foram realizadas via Rampage (Lovell *et al.*, 2003), Verify3D (Eisenberg *et al.*, 1997), ProSA (Wiederstein e Sippl, 2007), VoroMQA (Olechnovič e Venclovas, 2017), ProQ3D (Uziela *et al.*, 2017), Qprob (Cao e Cheng, 2016), DeepQA (Cao *et al.*, 2016) e SVMQA (Manavalan e Lee, 2017). Os melhores modelos estruturais foram refinados via ModRefiner (Xu e Zhang, 2011). As estruturas tridimensionais da HSA (E.C. 3.2.1.1) e tendamistat (HOE-467A) foram obtidas no Banco de Dados de Proteína, PDB IDs: 1C8Q e 1BNV, respectivamente.

### **3.8- *Vu*-LTP1.1 e *docking* molecular com a $\alpha$ -amilase salivar humana**

Os ensaios de *docking* foram realizados usando ClusProV2 (Comeau *et al.*, 2004), HADDOCK (van Zundert *et al.*, 2016), SwarmDock (Torchala *et al.*, 2013) e HDock (Yan *et al.*, 2017). Os melhores complexos de interação foram selecionados após análises com os programas DockScore (Malhotra *et al.*, 2015), PPCheck (Sukhwal e Sowdhamini, 2015) e CCharPPI 35 (Moal *et al.*, 2015). A melhor solução para o complexo HSA-*Vu*LTP1.1 foi obtida via ClusProV2. O complexo superior foi refinado via Galaxy Refine Complex (Heo *et al.*, 2016). A predição de energia livre ( $\Delta G$ ), constante de dissociação (Kd) e a análise dos aminoácidos considerados *hotspots* localizados na interface de interação foram realizadas via PRODIGY (Vangone e Bonvin, 2015; Xue *et al.*, 2016), HotRegion (Cukuroglu *et al.*, 2012) e ANCHOR 40 (Meireles *et al.*, 2010), respectivamente. Os contatos interatômicos e os tipos de interações mantidos nas interfaces do complexo HSA/*Vu*-LTP1.1 foram analisados via



PDBsum (Laskowski *et al.*, 2018). As imagens dos complexos proteína-proteína foram obtidas através do UCSF Chimera 1.13.1 (Pettersen *et al.*, 2004).

### **Seção III - Estudo da atividade inibitória de peptídeos baseados na sequência da rVu-LTP1.1 sobre leveduras**

#### **3.9- Ensaio de inibição de crescimento das leveduras pela rVu-LTP1.1**

As células de leveduras foram cultivadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud por 24 h a 30 °C. Separadamente, uma colônia de cada espécie de levedura foi inoculada em 1 mL de caldo Sabouraud (5 g/L de peptona de carne, 5 g/L de peptona de caseína e 20g/L D (+) glicose) (Merck Millipore Brasil) e depois diluída 100 X em caldo Sabouraud. Os números de células foram determinados por contagem das células de levedura em câmara de Neubauer (LaborOptik, Lancing, UK) sob um microscópio óptico Axioplan.ImagerA2 (Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, Brasil). rVu-LTP1.1 foi inicialmente dissolvida em água ultra-pura, foi quantificada (BCA, ácido bicinconínico, Smith *et al.*, 1985) (Sigma-Aldrich) e o volume equivalente a 80 µM foi transferido para um tubo de microcentrífuga e liofilizado (K105; Liotop). Em seguida, este pó foi dissolvido em 3% de DMSO (Sigma-aldrich), seguido pela metade do volume do ensaio em caldo Sabouraud e esterilizado por filtração (Millex-GV 0,22 µm). O ensaio foi realizado em uma placa Nunc de 96 poços com fundo em forma de U (Thermo Scientific Brasil, São Paulo, Brasil) na qual os poços continham o volume correspondente a 2.000 células de leveduras, 80 µM de rVu-LTP1.1 e caldo Sabouraud para o volume final de 100 µL. Os poços do controle foram feitos com a exclusão da rVu-LTP1.1, mas com 3% de DMSO. A placa foi incubada em estufa a 30 °C por 48 h. Após 48 h de ensaio, o fundo dos poços controle e teste foram registrados utilizando uma câmera digital (Cyber-Shot W-320, Sony).

Após 48h do ensaio de inibição do crescimento as células controle foram ressuspendidas e lavadas uma vez em caldo Sabouraud, diluídas 100 vezes em caldo Sabouraud e posteriormente espalhadas homoganeamente em placas de Petri contendo ágar Sabouraud com uma alça de Drigalski. As placas de Petri foram incubadas a 30 °C por um período de 24 h para permitir o desenvolvimento de colônias. Após esse período, as colônias foram contadas e imagens das placas de Petri foram feitas. O número de colônias obtidas nas placas de Petri de controle foi considerado como 100% de viabilidade. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.10- Ensaio de inibição das células de *C. tropicalis* pelos peptídeos baseados na sequência da rVu-LTP1.1**

O ensaio de inibição com os peptídeos M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>-C<sub>27</sub>, αS<sub>49</sub>-K<sub>72</sub>, N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e αG<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> foi realizado com a levedura *C. tropicalis* com os mesmos parâmetros de tempo, concentração e temperatura do ensaio descrito no item 3.9.

### **3.11- Ensaio de inibição das células de *C. tropicalis* pelo peptídeo modificado N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>**

O ensaio de inibição com o peptídeo modificado N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> foi realizado com a levedura *C. tropicalis* com os mesmos parâmetros de tempo, concentração e temperatura do ensaio descrito no item 3.9.

### **3.12- Predição da estrutura secundária e atividade biológica do peptídeo mais ativo sobre *C. tropicalis***

A sequência de 19 resíduos de aminoácidos do peptídeo mais ativo sobre *C. tropicalis* foi analisada pela ferramenta de cálculo e previsão do banco de dados de peptídeos antimicrobianos (APD, do inglês *antimicrobial peptides database*) (<http://aps.unmc.edu/AP>). Esta ferramenta também fornece a opção de procurar sequências de AMP mais semelhantes à sequência peptídica de interesse. Também é possível obter as características de tais AMPs similares como nome do peptídeo, sequência de aminoácidos, atividades biológicas já descritas, fonte biológica e publicação original (Wang, 2015).

Para um alinhamento refinado da sequência de saída do APD, com maior grau de similaridade com o peptídeo mais ativo, um novo alinhamento foi feito na ferramenta de busca de Basic Local Alignment (BLAST, do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1997) usando a pesquisa especializada do alinhamento global de sequências de proteínas Needleman-Wunsch.

### **3.13- Análise estatística**

Os dados representados são a média e o desvio padrão das triplicatas e a análise estatística foi feita por ANOVA unidirecional e pela comparação de Tukey pelo software GraphicPad Prism versão 7.0.

## 4 - RESULTADOS

### Seção I - Estudo do mecanismo de inibição da rVu-LTP1.1 sobre a $\alpha$ -amilase salivar humana

#### 4.1- Ensaio de inibição da $\alpha$ -amilase salivar humana com o peptídeo sintético M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub> baseado na sequência da rVu-LTP1.1

Em trabalho anterior quatro das regiões da rVu-LTP1.1 foram testadas sobre HSA exceto a região N-terminal (Vieira-Silva *et al.* 2018b). Neste trabalho realizamos o ensaio de inibição da atividade da HSA pelo peptídeo sintético M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub>, não sendo observada a inibição dessa enzima (Figura 2). Com este resultado, confirmamos que apenas duas regiões estruturais da rVu-LTP1.1, compreendendo os peptídeos N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub>, possuíam a atividade de inibir a HSA.

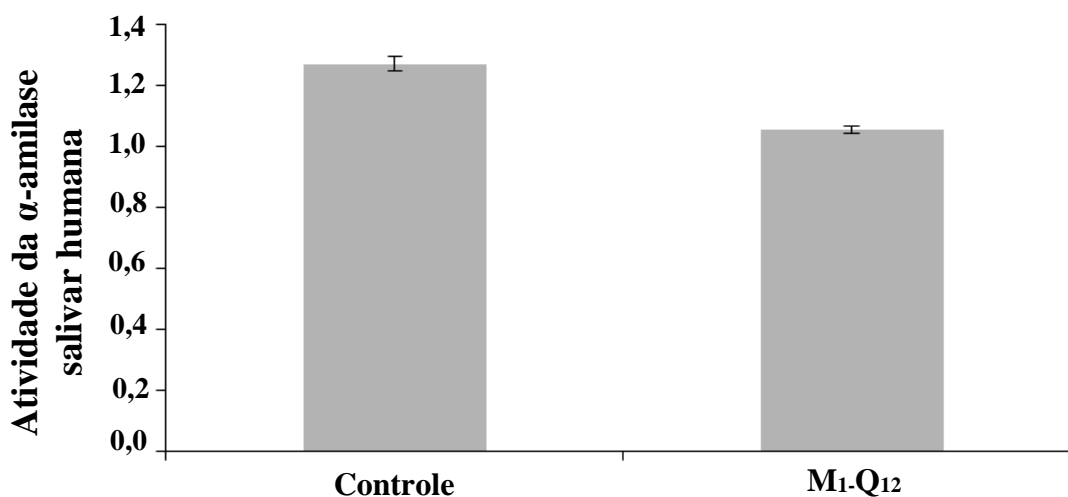


Figura 2 - Visualização gráfica da atividade da enzima HSA na presença de 20  $\mu$ M do peptídeo sintético M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub>. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.2- Busca em banco de dados e alinhamento com outros inibidores de $\alpha$ -amilase

Após o ensaio, nós tínhamos rastreado que das cinco regiões estruturais da rVu-LTP1.1, duas tinham esta capacidade inibitória. Com base nestes dados nós realizamos busca em banco de dados por peptídeos que apresentassem estrutura primária semelhante as LTPs e que já

tivessem descrita a capacidade ou não de inibir  $\alpha$ -amilases. Muitos desses peptídeos eram classificados como inibidores de  $\alpha$ -amilase de origem vegetal e não como LTPs (Kader, 1996). De todos os inibidores que se assemelhavam com a rVu-LTP1.1 encontramos apenas três que já haviam sido testados contra  $\alpha$ -amilase, dois sem atividade e um com atividade. Estas sequências foram alinhadas utilizando o BLAST e as sobreposamos com as duas regiões da rVu-LTP1.1 que compreendem os peptídeos sintéticos (N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub>), responsáveis pela atividade de inibir HSA. Esse alinhamento mostrou que PAPI<sub>Hv</sub> (do inglês *probable  $\alpha$ -amylase/protease inhibitor from Hordeum vulgare*) e PAPI<sub>Os</sub> (*probable  $\alpha$ -amylase/protease inhibitor from Oriza sativa*), LTPs que não inibiam a atividade da  $\alpha$ -amilase (Svensson *et al.*, 1986; Yu *et al.*, 1988), não exibiam aminoácidos carregados positivamente nas posições descritas para a rVu-LTP1.1. Entretanto, a I-2, um peptídeo similar à LTP de *E. coracana* (Campos e Richardson, 1984) apresentava aminoácidos com as mesmas características que rVu-LTP1.1 e possuía a capacidade de inibir  $\alpha$ -amilase (Figura 3A).

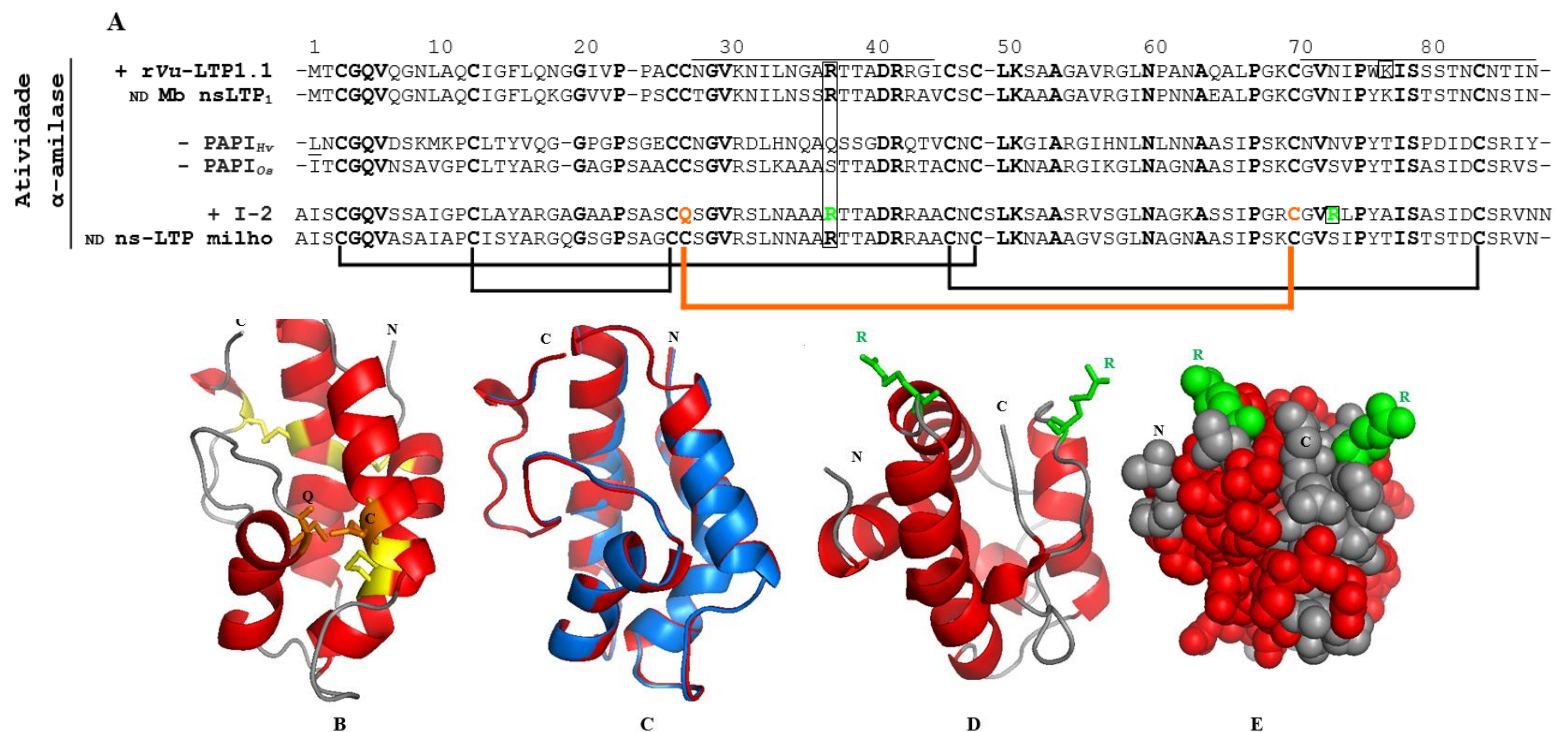


Figura 3 (A) Alinhamento da rVu-LTP1.1 com as sequências de aminoácidos das LTP com atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase (I-2) e sem atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase (PAP<sub>Hv</sub> e PAP<sub>Os</sub>). As linhas que ligam os resíduos de Cys da ns-LTP de *Zea mays* indicam as pontes dissulfeto (PDB ID: 1SIY). Resíduos idênticos são indicados em negrito. Números acima das sequências indicam o tamanho do peptídeo em aminoácidos. Note que I-2 difere das outras LTP1s, principalmente no número de resíduos Cys; I-2 tem um Gln (laranja) na posição 27 onde as outras sequências têm um resíduo de Cys. Portanto, uma ponte dissulfeto está faltando na I-2, aquela formada entre Cys<sub>4</sub> e Cys<sub>7</sub> (indicada em laranja). As fontes das sequências foram: LTP de *V. unguiculata* (feijão-de-corda) (Carvalho *et al.*, 2006), PAP<sub>Hv</sub> de *H. vulgare* (cevada) (Svensson *et al.*, 1986), PAP<sub>Os</sub> de *O. sativa* (arroz) (Yu *et al.*, 1988) *Z. mays* ns-LTP (milho) (Han *et al.*, 2001) e I-2 de *E. coracana* (Campos e Richardson, 1984). As linhas acima da sequência de Vu-LTP1.1 indicam as sequências e posição dos peptídeos sintéticos que inibem  $\alpha$ -amilase da saliva humana, e as caixas indicam as posições dos aminoácidos carregados positivamente associados à atividade inibidora da  $\alpha$ -amilase. ND, atividade de inibir  $\alpha$ -amilase não determinado. (B) Estrutura tridimensional da I-2, modelada com Modeler e baseada na estrutura da *Z. mays* ns-LTP (PDB ID: 1FK5). Estrutura secundária em vermelho representa as  $\alpha$ -hélices e em cinza representa elementos não estruturados. As três ligações em amarelo representam três pontes dissulfeto entre os resíduos de Cys. A Cys livre e o Gln são mostrados em laranja. (C) Sobreposição das estruturas tridimensionais de I-2 (vermelho) e *Z. mays* ns-LTP (azul). (D) A estrutura tridimensional de I-2, com os aminoácidos carregados positivamente expostos na superfície do peptídeo, nas voltas e no C-terminal destacados em verde. (E) Mesma estrutura que em D, com estrutura tridimensional representada em *spacefill*. C e N indicam a região C e N-terminal, respectivamente, em todas as figuras.

### 4.3- Modelagem da I-2

A proteína I-2 foi modelada utilizando como molde a estrutura tridimensional da LTP de *Zea mays* determinada por cristalografia (PDB ID: 1FK5) (Han *et al.*, 2001). A estrutura da I-2 revelou a presença de quatro  $\alpha$ -hélices (em vermelho), uma hélice  $3_{10}$  e seqüências de voltas (em cinza) (Figura 3B e 4). A qualidade estereoquímica do modelo criado foi avaliada através de cálculos do programa Procheck. Gerado o mapa de Ramachandram, este revelou qualidade aceitável, visto que 95% dos aminoácidos estão em regiões favoráveis e 3,8% em regiões permitidas (Figura 5A e B).

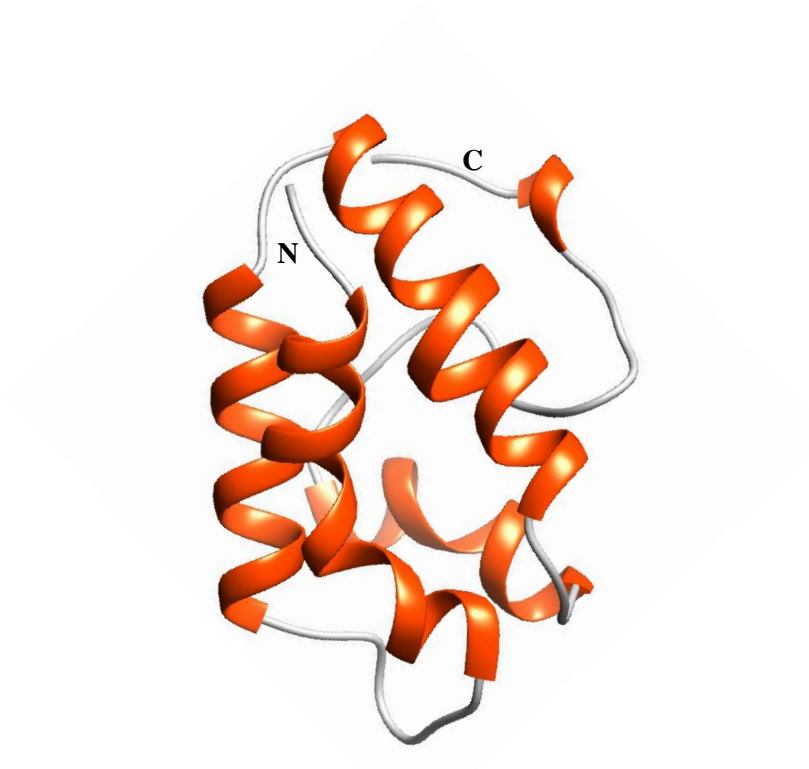
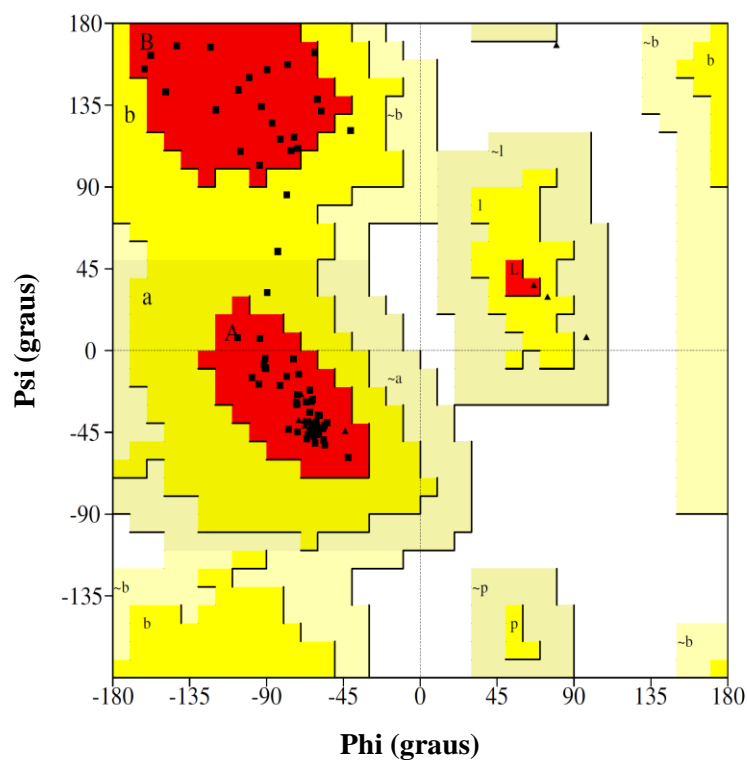


Figura 4 - Estrutura tridimensional da I-2, modelada com Modeller e baseada na estrutura da *Z. mays* ns-LTP (PDB ID: 1FK5). Estrutura secundária em vermelho representa as  $\alpha$ -hélices e em cinza representa elementos não estruturados. N representa a porção N-terminal e C representa a porção C-terminal da I-2.

**A**



**B**

### Mapa estatístico da análise estrutural da I-2

	<b>I-2</b>
Resíduos em regiões favoráveis [Vermelho – A,B,L]	95%
Resíduos em regiões permitidas [Amarelo – a,b,l,p]	3,8%
Resíduos em regiões menos favoráveis [Bege - ~a, ~b, ~l, ~p]	1,2%
Resíduos em regiões não permitidas [Branco- Ile]	0%

Figura 5 (A) Visualização gráfica do mapa de Ramachandran do modelo estrutural da I-2. Em vermelho estão representadas as regiões favoráveis; em amarelo, as regiões permitidas. (B) Mapa estatístico das porcentagens de aminoácidos da I-2 nas regiões do mapa de Ramachandran.

#### 4.4- Sobreposição da estrutura tridimensional da I-2 com a rVu-LTP1.1

O modelo estrutural da I-2 indicava que estes resíduos de aminoácidos carregados positivamente que haviam sido relacionados com a capacidade de inibir HSA estavam voltados para o exterior da proteína (Figura 3D e E). Para comprovarmos que estes resíduos estavam na mesma posição que em rVu-LTP1.1 nós fizemos a sobreposição de Vu-LTP1.1 e I-2. As Arg na posição 39 estavam na mesma posição nos dois peptídeos e ambas voltadas para o exterior dos peptídeos. Na região C-terminal, Vu-LTP1.1 tem um aminoácido carregado positivamente, a Lys<sub>80</sub>. Entre as Cys<sub>70</sub> e Cys<sub>84</sub> apenas I-2 tem uma Arg na posição 73. Apesar de não estarem na mesma posição (Figura 6), estes dois aminoácidos carregados positivamente estão voltados para o exterior dos peptídeos. Devido a estas características de serem aminoácidos carregados positivamente e de estarem voltados para o exterior dos peptídeos, o que tornaria possível a interação com a  $\alpha$ -amilase, supomos que estes aminoácidos seriam os responsáveis pela inibição.

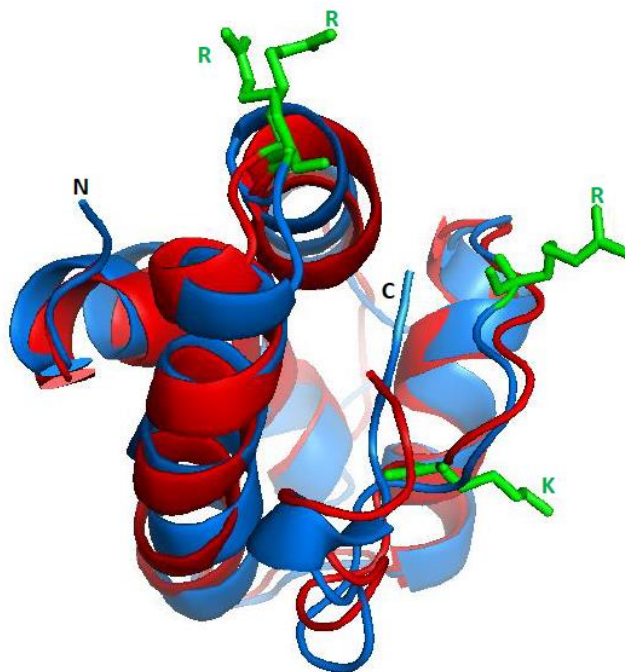


Figura 6 - Sobreposição da estrutura tridimensional da rVu-LTP1.1 (vermelho) e I-2 (azul) com destaque em verde para os resíduos dos aminoácidos carregados positivamente (Arg<sub>39</sub> em ambas as sequências e Lys<sub>80</sub> da rVu-LTP1.1 e Arg<sub>73</sub> da I-2) localizados nas voltas e todos expostos para o solvente.



#### 4.5- Ensaio de inibição da HSA com o peptídeo sintético modificado N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>

Após o alinhamento das sequências comparadas foi sugerido que os aminoácidos carregados positivamente e expostos para o exterior das LTPs pudessem ser os responsáveis pela atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilases. Para testar nossa hipótese, escolhemos a Arg<sub>39</sub> porque estava na mesma posição de I-2 e a substituímos por um aminoácido sem carga escolhido desta mesma região de uma LTP que não tinha a capacidade de inibir  $\alpha$ -amilases e por isso escolhemos a Gln<sub>39</sub> de PAPI<sub>Hv</sub>. Este peptídeo modificado foi chamado N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> (Figura 7A). O peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> na concentração de 20  $\mu$ M perdeu a capacidade de inibir a atividade da HSA (Figura 7B), confirmando a hipótese.

A

Nome do peptídeo	Sequência de aminoácidos	Número de aminoácidos	Carga (pH 7,0)	Massa molecular (Da)
N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub> <sup>mQ</sup>	NGVKNILNGA <u>Q</u> TTADRRGI	19	+2	1998.21

B

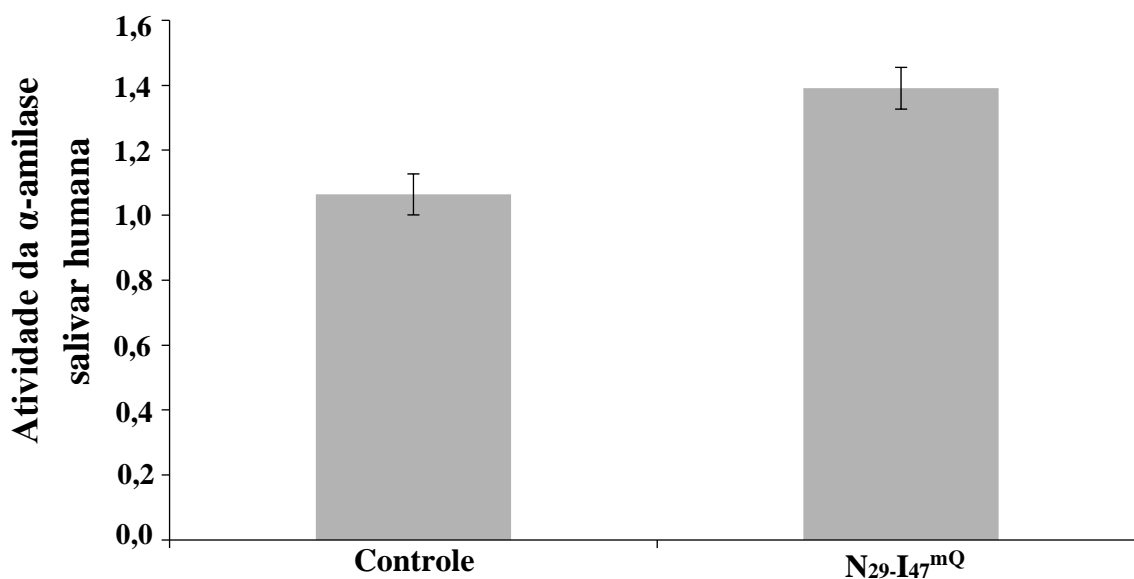


Figura 7 (A) Box mostrando o peptídeo sintético modificado N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> com a mesma sequência de aminoácidos do peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> realizando a substituição da Arg<sub>39</sub> por Glu (indicada em roxo). Os aminoácidos sublinhados representam as regiões de volta. A tabela também indica as características bioquímicas do peptídeo sintético, como a carga calculada em pH 7,0 e sua massa molecular. (B) Visualização gráfica da atividade da HSA na presença

de 20  $\mu$ M de peptídeo sintético modificado N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>. Controle representa atividade da HSA na ausência do peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>. A imagem representa um de três experimentos independentes.

#### 4.6- Alinhamento das sequências de LTPs

O ensaio com o peptídeo modificado N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> comprovou a nossa hipótese de que resíduos de aminoácidos carregados presentes nas voltas da rVu-LTP1.1 são importantes para a inibição da HSA. Com base nesse achado nós comparamos sequências de LTPs que possuíam capacidade de inibir  $\alpha$ -amilase com as que não possuíam e observamos a importância de aminoácidos carregados positivamente nas voltas dessas proteínas e indicamos LTPs que ainda não possuem essa atividade biológica descrita como possíveis inibidores de acordo com suas características bioquímicas (Figura 8).

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
+ rVu-LTP1.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
+ I-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Ace-AMP <sub>1</sub>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Pinus taeda	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Ricinus communis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Actinidia deliciosa	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Lilium longiflorum	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Malus domestica	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Prunus domestica	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Prunus armeniaca	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Prunus avium	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Daucus carota	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Arabidopsis thaliana	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Brassica napus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Brassica oleracea var italica	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Lycopersicon esculentum	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Nicotiana tabacum	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Gerbera hybrida	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Helianthus annuus <sup>1</sup>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Coffea canefora <sup>1</sup>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Coffea canefora <sup>2</sup>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Coffea canefora <sup>3</sup>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Capsicum annuum <sup>3</sup>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Phaseolus vulgaris	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Helianthus annuus <sup>2</sup>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Triticum aestivum	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Sorghum bicolor	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Zea mays	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Prunus dulcis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Prunus persica	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Pisum sativum	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Cicer arietinum	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Gossypium hirsutum	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Capsicum annuum <sup>2</sup>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
- PAPI <sub>Hv</sub>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
- PAPI <sub>Os</sub>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Solanum chacoense	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
nd Hordeum vulgare	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Figura 8 - Alinhamento das sequências de aminoácidos madura e completa das LTP<sub>1s</sub> sem atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase (prováveis inibidores de amilase/protease PAPI<sub>Hv</sub> e PAPI<sub>Os</sub>) e com atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase (rVu-LTP1.1 e I-2). Gaps (-) foram introduzidos para melhorar o alinhamento. Os números acima das sequências indicam a extensão do peptídeo em aminoácidos. As linhas abaixo da sequência rVu-LTP1.1 indicam as  $\alpha$ -hélices e os aminoácidos não sublinhados representam as voltas deste peptídeo. As

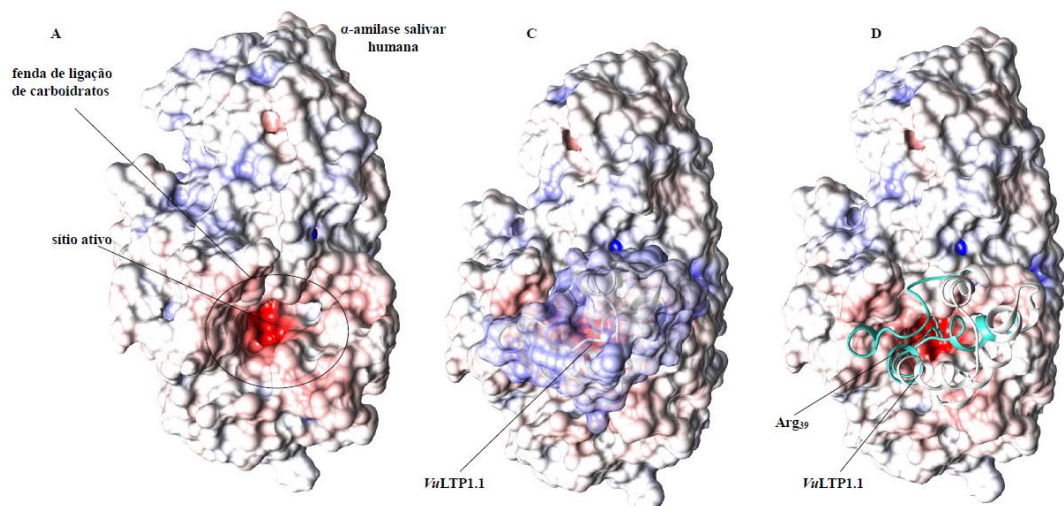
caixas indicam as posições dos resíduos de aminoácidos carregados positivamente associados a atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase da rVu-LTP1.1. Em verde estão indicados os resíduos de aminoácidos responsáveis pela atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase nas rVu-LTP1.1 que previmos ter a mesma função nas LTP<sub>1</sub>s. ND, não determinado.

## Seção II - Análise *in silico* do mecanismo de inibição da Vu-LTP1.1 sobre a $\alpha$ -amilase salivar humana

### 4.7 – Estudo de docking interação entre HSA e Vu-LTP1.1

O estudo *in silico* da interação entre a enzima HSA e a Vu-LTP1.1 foi iniciado com a realização do *docking*. A Vu-LTP1.1 interage com a superfície da HSA se inserindo na fenda de ligação ao carboidrato e impedindo a entrada do substrato da enzima (Figura 9A, B, C e D).

Na fenda de ligação ao carboidrato ocorre interações entre 32 resíduos de aminoácidos da Vu-LTP1.1 com 39 resíduos de aminoácidos da HSA que mantêm o complexo Vu-LTP1.1/HSA. A estabilidade do complexo ocorre devido a formação de três pontes salinas, 28 pontes de hidrogênio e 272 contatos não ligados (Tabela 2). Durante a interação com Vu-LTP1.1, a área da HSA exposta ao solvente é de 1.632 Å<sup>2</sup> e quando a Vu-LTP1.1 está interagindo com HSA a área exposta do inibidor ao solvente é de 1.722 Å<sup>2</sup>.



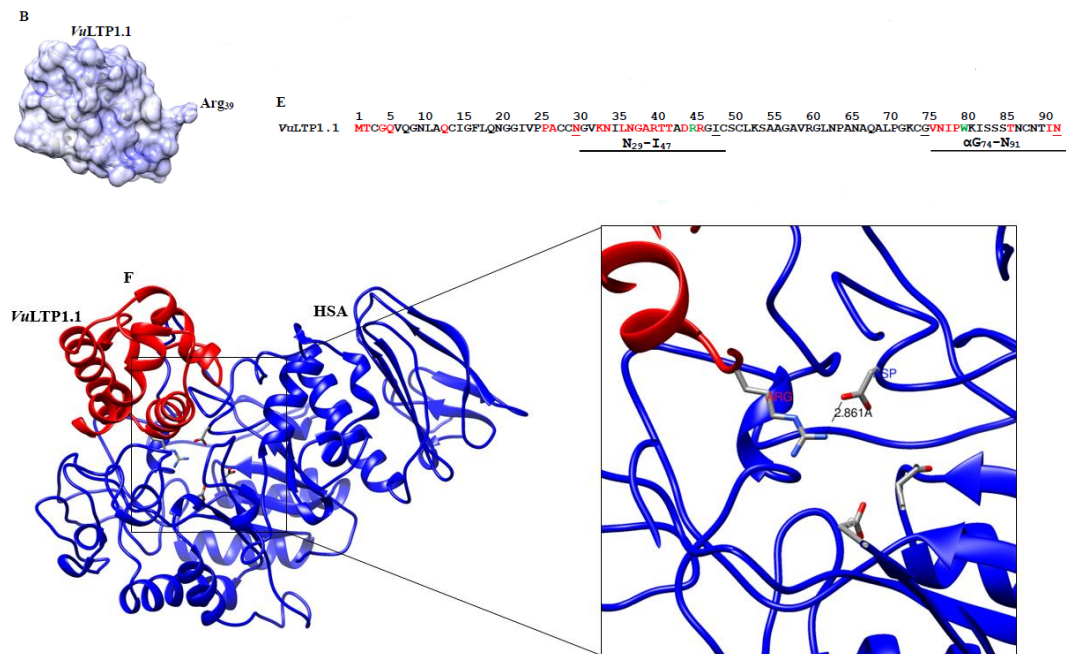


Figura 9 (A) Imagem da estrutura tridimensional da HSA (PDB: 1C8Q) representada no modelo de superfície onde em branco está representada a estrutura principal, as regiões positivas são representadas em azul e as regiões negativas são representadas em vermelho. Observe a carga de superfície negativa na fenda de ligação de carboidratos e a extrema carga negativa de superfície do sítio ativo. (B) Representação esquemática da modelo tridimensional da *Vu*-LTP1.1 representada no modelo *spacefill* com as mesmas cores de carga superficial mostradas em A. Observe a distribuição predominante de cargas positivas. A Arg<sub>39</sub> que foi previamente identificada como relevante para a inibição da HSA (Vieira-Silva *et al.*, 2018) está completamente exposta para o solvente. (C) HSA, representada no modelo *spacefill*, complexado com a *Vu*-LTP1.1, com estrutura secundária representada em branco e modelo *spacefill* em 70% de transparência, para estudos de *docking* proteína-proteína. Note-se que a interação da *Vu*-LTP1.1 com HSA ocorre na fenda de ligação de carboidratos que é então obstruída. (D) O mesmo que em C com a estrutura secundária de *Vu*-LTP1.1 representada em branco com a região compreendendo os peptídeos sintéticos N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e αG<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> baseados na sequência de aminoácidos da *Vu*-LTP1.1 que possuem propriedade inibitória sobre HSA como previamente determinado por análise bioquímica (Vieira-Silva *et al.*, 2018) em turquesa. Observe a região extremamente negativa do sítio ativo da HSA na qual a Arg<sub>39</sub> (mostrada como bastão) da *Vu*-LTP1.1 é introduzida. (E) Estrutura primária da *Vu*-LTP1.1 com os resíduos de aminoácidos que estabelecem os contatos com HSA pelo encaixe proteína-proteína destacados em vermelho com indicação dos resíduos de aminoácidos que compõem os peptídeos sintéticos N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e αG<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> que possuem propriedade inibitória da HSA de *Vu*-LTP1.1 como previamente determinado por

análise bioquímica (Vieira-Silva *et al.*, 2018). Observe a sobreposição dos resíduos de aminoácidos identificados pela análise bioquímica e *in silico*. Os dois aminoácidos destacados em verde foram classificados como *hot-spots* para interação proteína-proteína pelo programa SpotOn. (F) Interação Vu-LTP1.1/HSA com estruturas terciárias de ambas as proteínas representadas e uma visão em detalhes da interação Vu-LTP1.1/HSA no sítio ativo da HSA onde é destacada a interação da Arg<sub>39</sub> da Vu-LTP1.1 com uma dos aminoácidos da tríade catalítica ácida da HSA, a Asp<sub>300</sub>, por uma ligação de hidrogênio (distância = 2.861 Å).

**Tabela 2. Parâmetros da interação entre inibidores de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -amilases.**

interação entre inibidor/ $\alpha$ -amilase	resíduos de aminoácidos (aa) e área de superfície na interface inibidor/ $\alpha$ -amilase	número de			energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ )	constante de dissociação (Kd)	aminoácidos inibidores que interagem com tríade catalítica da $\alpha$ -amilase	aminoácidos da tríade catalítica da $\alpha$ -amilase que interagem com inibidor	aminoácidos hot-spot do inibidor/interface da $\alpha$ -amilase
	ponte de hidrogênio	ponte salina	contatos não ligados						
VuLTP1.1/HSA	32/39 aa 1722/1637 Å <sup>2</sup>	28	3	272	-18.5	2.6E <sup>-14</sup>	Arg <sub>39</sub>	Asp <sub>300</sub>	Arg <sub>44</sub> , Trp <sub>79</sub>
HOE-467A/PPA	23/30 aa 1351/1251 Å <sup>2</sup>	17	3	198	-16.5	7.5E <sup>-13</sup>	Arg <sub>19</sub>	Glu <sub>233</sub>	Tyr <sub>43</sub>
N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub> /HSA	17/33 aa 1312/1011 Å <sup>2</sup>	20	4	191	-14.9	1.1E <sup>-11</sup>	Arg <sub>39</sub>	Asp <sub>197</sub> , Glu <sub>233</sub> , Asp <sub>300</sub>	*1
$\alpha$ G <sub>74</sub> -N <sub>91</sub> /HSA	15/27 aa 1349/1027 Å <sup>2</sup>	5	1	234	-16.2	1.2E <sup>-12</sup>	Lys <sub>80</sub>	Asp <sub>197</sub>	*1
N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub> <sup>mQ</sup> /HSA	*2	*2	*2	*2	*2	*2	*2	*2	*2
I-2/HSA	32/38 aa 1674/1587 Å <sup>2</sup>	15	5	196	-17.6	1.3E <sup>-13</sup>	Arg <sub>79</sub>	Asp <sub>197</sub> , Glu <sub>233</sub> , Asp <sub>300</sub>	Arg <sub>34</sub> , Arg <sub>79</sub>

HSA -  $\alpha$ -amilase salivar humana; VuLTP1.1: proteína transportadora de lipídeos de semente de *Vigna unguiculata*; N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>: peptídeo sintético compreendendo os aminoácidos de N<sub>29</sub> a I<sub>47</sub> da VuLTP1.1;  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub>: peptídeo sintético compreendendo os aminoácidos G<sub>74</sub> a N<sub>91</sub> de VuLTP1.1; N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>: peptídeo sintético N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> na qual a Arg<sub>39</sub> foi substituída por Gln; I-2: inibidor  $\alpha$ -amilase/tripsina de *Eleusine coracana*; PPA:  $\alpha$ -amilase pancreática de porco; HOE-467A: tendamistat, inibidor  $\alpha$ -amilase de *Streptomyces tendae*; \*1 a análise não foi realizada devido ao tamanho mínimo requerido pelo programa não foi alcançado para o peptídeo; \*2 os parâmetros não puderam ser analisados porque não havia formação complexa na condição padrão testada pelo programa CABS-DOCK

Segundo os valores de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) e a constante de dissociação ( $K_d$ ) que são -18,5 e  $2,6E^{-14}$ , respectivamente, a interação entre o complexo *Vu*-LTP1.1/HSA é considerada estável e indica uma alta afinidade de ligação entre o ligante (*Vu*-LTP1.1) e o sítio ativo da HSA.

A Arg<sub>39</sub> da r*Vu*-LTP1.1 é introduzida no sítio ativo da HSA e forma uma ponte de hidrogênio de 2.861 Å com a Asp<sub>300</sub>, um resíduo de aminoácido carregado negativamente do sítio catalítico da tríade da HSA (Matsuura, 2002) (Figura 9D e F).

#### **4.8 - Estudo de docking interação entre HSA e peptídeos sintéticos N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub>**

O *docking* dos peptídeos sintéticos N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> com HSA, previamente apresentados como inibidores de HSA (Vieira-Silva *et al.*, 2018b), nos mostra que o peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> interage com a fenda de ligação a carboidratos da HSA, obstruindo o sítio catalítico como a *Vu*-LTP1.1 inteira, com 20 ligações de hidrogênio, quatro pontes salinas e 191 contatos não ligados (Figura 10A e B e Tabela 2). Este complexo apresentou uma  $\Delta G$  e uma  $K_d$  de -14.9 e  $1.1E^{-11}$ , respectivamente (Tabela 2).

A Arg<sub>39</sub> do N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> interage com os três aminoácidos da tríade catalítica da HSA (Asp<sub>197</sub>, Glu<sub>233</sub>, Asp<sub>300</sub>) (Figura 10B). Pontes de hidrogênio promovem a interação entre a Arg<sub>39</sub> e o sítio ativo da HSA (Figura 10C).

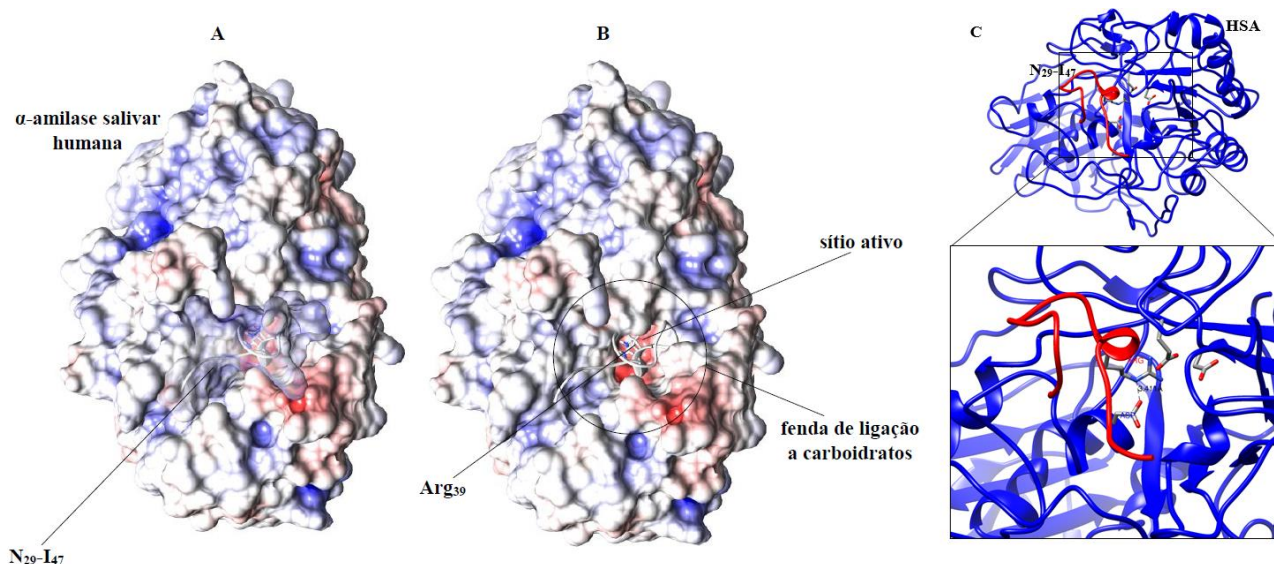


Figura 10 (A) Imagem da estrutura tridimensional da HSA (PDB: 1C8Q) representada no modelo *spacefill* onde em branco está representada a estrutura principal, com regiões positivas representadas nas regiões azul e negativa representadas em vermelho, complexada com o peptídeo sintético N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> com estrutura secundária representada em branco e modelo de superfície em transparência com padrão de mesma cor mostrado para HSA. Note-se que a interação do peptídeo sintético N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> com HSA na fenda de ligação a carboidratos que é obstruída. (B) O mesmo que em A, com o peptídeo sintético N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> representado em branco. Observe a região extremamente negativa do sítio ativo de HSA em que a Arg<sub>39</sub> (mostrada em bastão) do peptídeo sintético N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> é introduzida. (C) Interação N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>/HSA com estrutura secundária de ambas as proteínas representadas (vermelho para N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e azul para HSA) e uma visão em detalhes da interação N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>/HSA no sítio ativo da HSA onde é destacada a interação da Arg<sub>39</sub> do N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> com a Asp<sub>300</sub> da tríade catalítica da HSA por uma ponte salina (distância = 3,411 Å).

O peptídeo  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> também interage com a fenda de ligação a carboidratos da HSA, com 5 pontes de hidrogênio, uma ponte salina e 234 contatos não ligados (Figura 11A e Tabela 2). Este complexo apresentou um  $\Delta G$  e um K<sub>d</sub> de -16,2 e 1,2E<sup>-12</sup>, respectivamente, indicando uma interação mais forte (Tabela 2). Em nossa análise, a Lys<sub>80</sub> entra profundamente na cavidade, onde é capaz de interagir com dois resíduos de aminoácidos da tríade catalítica por pontes de hidrogênio, a Asp<sub>197</sub> e a Asp<sub>300</sub>.



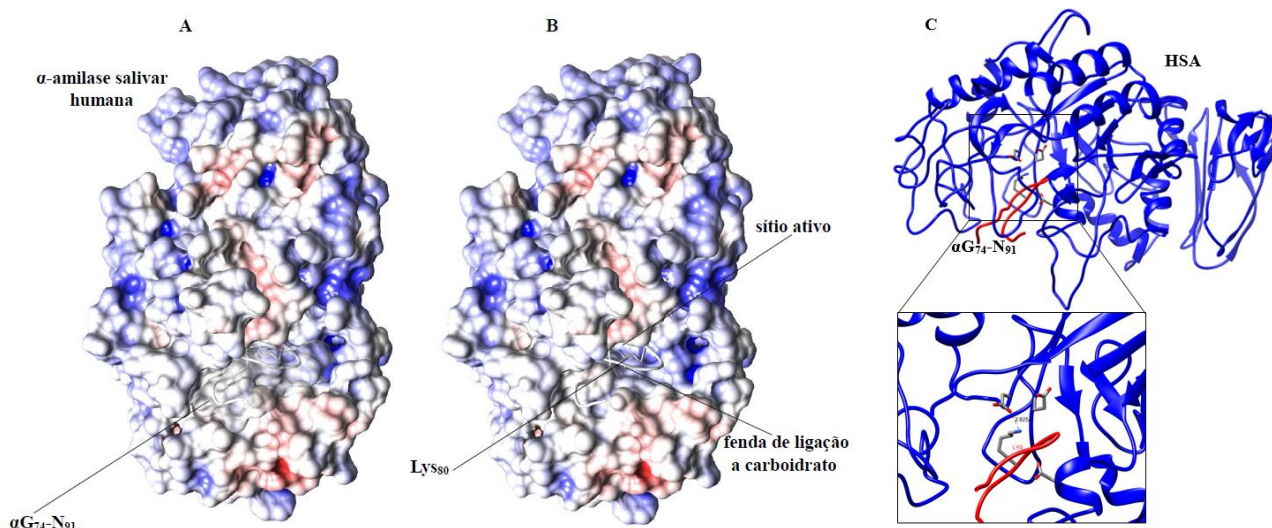


Figura 11 (A) Imagem do estrutura tridimensional da (HSA) (PDB: 1C8Q) representada no modelo *spacefill* onde em branco está representada a estrutura principal, com regiões positivas representadas nas regiões azul e negativa representadas em vermelho, complexada com o peptídeo sintético  $\alpha G_{74}\text{-}N_{91}$  com estrutura secundária representada em fita branca e modelo de superfície em transparência com o mesmo padrão de cores mostrado em A. Note que a interação do peptídeo sintético  $\alpha G_{74}\text{-}N_{91}$  com HSA na fenda de ligação a carboidrato que é obstruída. (B) O mesmo que em A, com o peptídeo sintético  $\alpha G_{74}\text{-}N_{91}$  representado em branco. Observe a região extremamente negativa do sítio ativo da HSA em que a  $Lys_{80}$  (mostrada em bastão) do peptídeo sintético  $\alpha G_{74}\text{-}N_{91}$  é introduzida. (C) Interação  $\alpha G_{74}\text{-}N_{91}$ /HSA com a estrutura tridimensional do peptídeo e da proteína representados e uma visão em detalhes da interação  $\alpha G_{74}\text{-}N_{91}$ /HSA no sítio ativo da HSA onde é destacada a interação de  $Lys_{80}$  de  $\alpha G_{74}\text{-}N_{91}$  com um dos aminoácidos da tríade catalítica da HSA, o  $Asp_{197}$ , por uma ponte de hidrogênio (distância = 2.825 Å).

#### 4.9 - Estudo de *docking* interação entre HSA e I-2

Na sequência nós realizamos a análise de *docking* entre I-2 e HSA. Os testes *in silico* mostraram que a I-2 interage com a fenda de ligação a carboidratos de HSA (Bernhard e Somerville, 1989), com três pontes salinas, 17 ligações de hidrogênio e 216 contatos não ligados (Figura 12A e Tabela 2). O complexo I-2/HSA apresentou um  $\Delta G$  e um  $K_d$  de -16.0 e  $1.7E^{-12}$ , respectivamente.

A análise do *docking* indicou que a  $Arg_{79}$  entra no sítio ativo onde interage com os dois resíduos de aminoácidos da tríade catalítica da HSA por pontes de hidrogênio, a  $Glu_{233}$  e a

Asp<sub>300</sub> (Figura 12A e Tabela 2). E a Arg<sub>34</sub> foi indicada como *hot-spot* na interação I-2/HSA (Tabela 2).

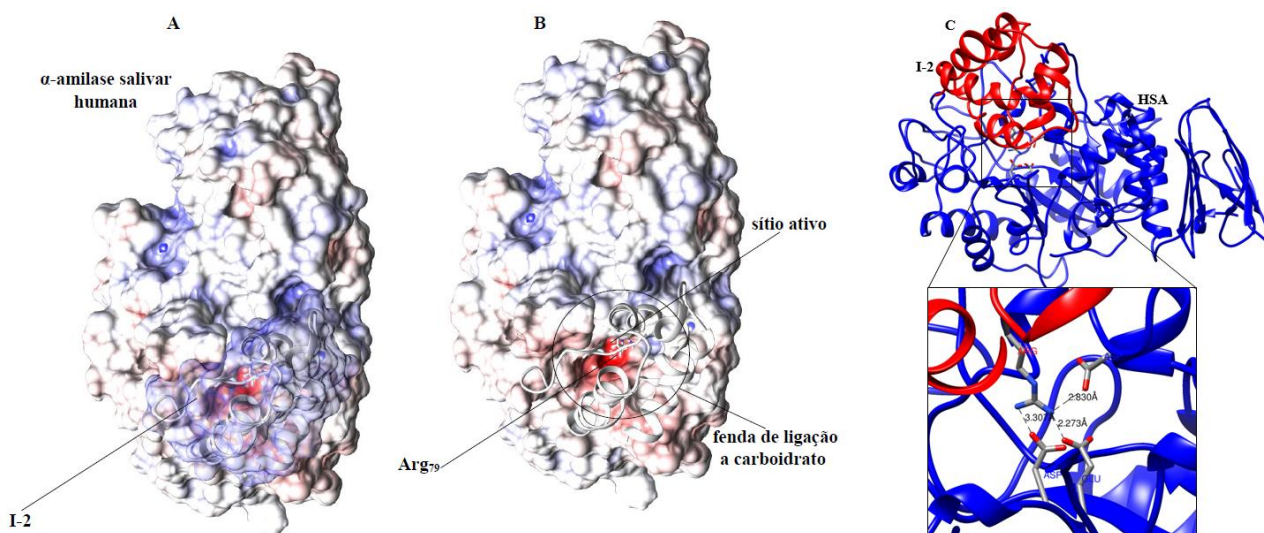


Figura 12 (A) Imagem da estrutura tridimensional da HSA (PDB: 1C8Q) representada no modelo *spacefill* onde em branco está representada a estrutura principal, com regiões positivas representadas em azul e negativa representadas em vermelho, complexada com I-2 com estrutura secundária representada em branco e modelo *spacefill* em transparência com padrão de mesma cor mostrado para HSA. Note que a interação de I-2 com HSA na fenda de ligação a carboidratos é obstruída. (B) O mesmo que em A, com a I-2 representada em branco. Observe a região extremamente negativa do sítio ativo da HSA na qual a Arg<sub>79</sub> (mostrado em bastão) de I-2 é introduzida. (C) Interação I-2/HSA com estrutura secundária de ambas as proteínas representadas e uma visão em detalhes da interação I-2/HSA no sítio ativo da HSA, onde é destacada a interação da Arg<sub>79</sub> da I-2 com dois aminoácidos da tríade catalítica da HSA, da Glu<sub>233</sub> e da Asp<sub>300</sub> por uma ligação de hidrogênio (distância = 3,228 e 1,907 Å, respectivamente).

### Seção III - Estudo da atividade inibitória de peptídeos baseados na sequência de aminoácidos da rVu-LTP1.1 sobre leveduras

#### 4.10- Ensaio de inibição do crescimento de leveduras com rVu-LTP1.1

Nós começamos nossa análise pela inibição do crescimento de seis espécies de fungos pertencentes ao filo Ascomycota. Foi feita inicialmente uma curva de inibição do crescimento

com a levedura *C. albicans* testando as concentrações de 13 e 20  $\mu\text{M}$ ) da rVu-LTP1.1. Na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , a rVu-LTP1.1. causa uma inibição de aproximadamente 25% do crescimento desta levedura em 36 h de ensaio (Figura 13). Para termos uma porcentagem de inibição maior também testamos a concentração de 80  $\mu\text{M}$  da rVu-LTP1.1. Este resultado indicou que a concentração de 80  $\mu\text{M}$  foi mais eficiente, capaz de inibir o crescimento da espécie de levedura testada (Figura 14).

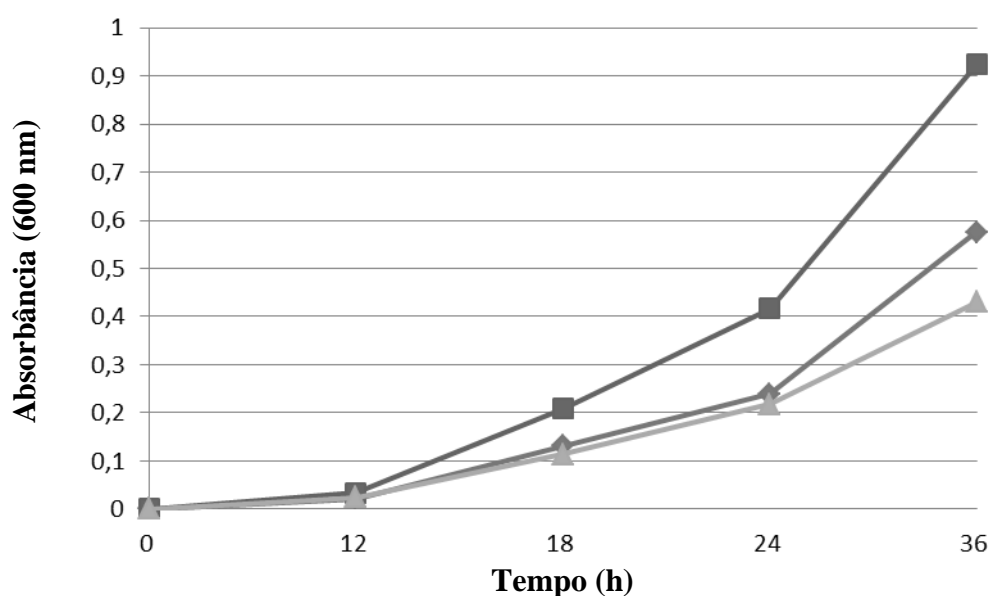


Figura 13 - Representação gráfica do ensaio de inibição do crescimento das células de *C. albicans* com diferentes concentrações de rVu-LTP1.1. Controle não-tratado (—■—), 13  $\mu\text{M}$  da rVu-LTP1.1 (—◆—), 20  $\mu\text{M}$  da rVu-LTP1.1 (—▲—).

A partir da escolha desta concentração, este ensaio foi repetido com as demais leveduras *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, *C. buinensis*, *C. parapsilosis* e *C. pelliculosa*. O crescimento de todas leveduras pode ser observado como uma massa de células no fundo dos poços e a diminuição na massa das amostras testadas é visível indicando o efeito inibitório da rVu-LTP1.1 sobre as leveduras *S. cerevisiae*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Figura 14A). Não foram observadas diferenças no padrão de crescimento das amostras testadas apenas diminuição na massa celular (Figura 14A). Portanto, podemos concluir que rVu-LTP1.1 possui atividade inibitória contra as leveduras testadas.

Para quantificar a inibição do crescimento das leveduras pela rVu-LTP1.1, após 48 h do ensaio de inibição do crescimento as células incubadas com rVu-LTP1.1 foram lavadas e semeadas em meio ágar Saboraud na ausência de rVu-LTP1.1. O resultado desse ensaio indicou que cinco espécies de leveduras tratadas apresentaram diferentes porcentagens de perda de viabilidade celular (Figura 14 B). *S. cerevisiae* apresentou perda de 27,85% da viabilidade celular, *C. tropicalis* 40,71%, *C. albicans* 13,92%, *C. parapsilosis* 18,75% e *C. pelliculosa* 34,82%. *C. buinensis* foi a única que manteve o percentual de viabilidade próximo ao das células não tratadas (Fig. 14B). Este resultado coincide com a massa celular observada no fundo dos poços teste. Portanto, rVu-LTP1.1 é capaz de matar as leveduras: *S.cerevisiae*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*. Para *C. buinensis* o efeito da rVu-LTP1.1 foi fungistático.

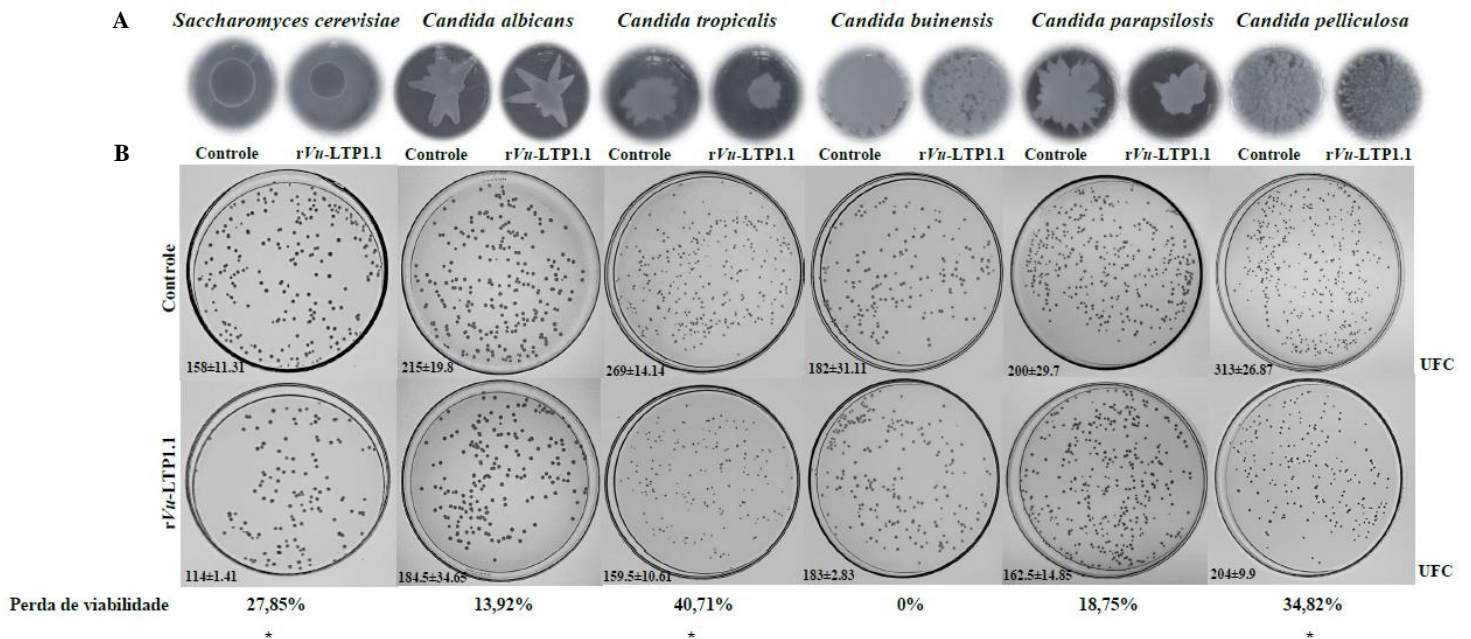


Figura 14 - Efeito antifúngico da rVu-LTP1.1 sobre leveduras. (A) Imagens do fundo dos poços da placa no final do ensaio de inibição do crescimento (48 h), mostrando o padrão de crescimento das células de leveduras na parte inferior poços, na ausência (controle) e presença de 80  $\mu$ M rVu-LTP1.1. (B) Fotos das placas de Petri demonstrando a viabilidade das células de leveduras após 48 h do ensaio de inibição do crescimento em placas com ágar Sabouraud incubadas com 80  $\mu$ M de rVu-LTP1.1 e apresentando a porcentagem da perda de viabilidade das células tratadas com a rVu-LTP1.1. As imagens mostradas foram geradas usando dados de um experimento independente de três ( $n = 3$ ).

#### 4.11 - Ensaio de inibição do crescimento de *C. tropicalis* pelos peptídeos sintéticos baseados na sequência de aminoácidos da rVuLTP1.1

Sabendo da capacidade da rVu-LTP1.1 inteira em inibir o crescimento de leveduras, nós testamos a atividade inibitória dos cinco peptídeos baseados na sequência da rVu-LTP1.1. Os cinco peptídeos foram testados separadamente na concentração de 80  $\mu$ M, a mesma utilizada para os ensaios com a rVu-LTP1.1 inteira. Baseado no resultado do ensaio anterior, em que espécie de levedura mais sensível a rVu-LTP1.1 foi *C. tropicalis*, optamos por continuar este estudo com esta espécie de levedura. De acordo com a massa celular da *C. tropicalis* obtida depois de 48 h de ensaio, os peptídeos C<sub>13</sub>-C<sub>27</sub> e N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> causaram uma maior redução na densidade de células após o tratamento (Figura 15A). Portanto, podemos dizer que essas duas regiões da rVu-LTP1.1 que compreendem os peptídeos possuem atividade inibitória do crescimento da *C. tropicalis*.

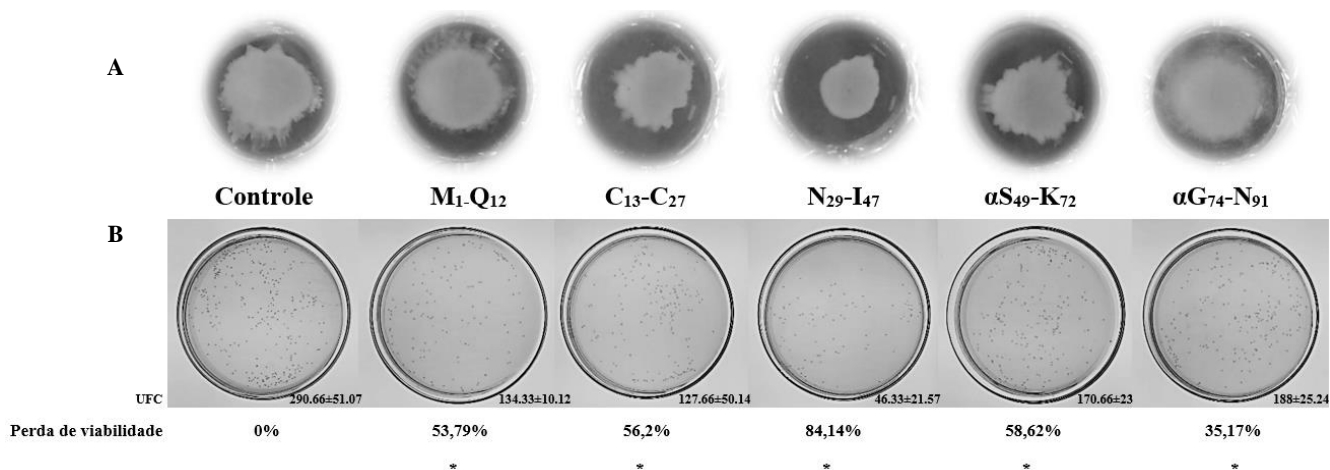


Figura 15 - Efeito antifúngico dos cinco peptídeos sintéticos sobre *C. tropicalis*. (A) Imagens do fundo dos poços das placas de 96 poços ao final do ensaio de inibição do crescimento (após 48 h), mostrando o padrão de crescimento da *C. tropicalis*, na ausência (controle) e presença de 80  $\mu$ M dos peptídeos sintéticos. (B) Fotos da placa de Petri mostrando a viabilidade das células de *C. tropicalis* após o ensaio de inibição do crescimento (48 h) incubadas com 80  $\mu$ M dos peptídeos sintéticos em placas de Petri com ágar Sabouraud, mostrando a porcentagem de perda de viabilidade das células tratadas com os peptídeos sintéticos. As imagens mostradas foram geradas usando dados de um experimento independente de três (n = 3).

Para quantificar a inibição do crescimento da *C. tropicalis* na presença dos cinco peptídeos baseados na sequência da rVu-LTP, após 48 h de ensaio, as células de *C. tropicalis* incubadas

com os peptídeos foram lavadas e semeadas em meio ágar Saboraud na ausência dos peptídeos. O resultado deste ensaio revelou que o peptídeo M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub> causou perda de viabilidade celular de 53,79% em *C. tropicalis*, C<sub>13</sub>-C<sub>27</sub> causou 56,2%, N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> causou 84,14%, αS<sub>49</sub>-K<sub>72</sub> causou 58,62%, e αG<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> causou 37,17%. O peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> causou a maior perda de viabilidade nas células de *C. tropicalis* (Fig. 15B), este resultado coincide com a massa celular observada no fundo do poço das células tratadas com este peptídeo (Fig. 15A).

#### **4.12- Ensaio de inibição do crescimento das células de *C. tropicalis* pelo peptídeo modificado**

Nós avaliamos a atividade do peptídeo modificado (N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>) baseado no peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> da rVu-LTP1.1, no qual foi substituída a Arg<sub>39</sub> por uma Glu, um resíduo de aminoácido neutro. O peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> teve sua atividade testada sobre *C. tropicalis* sob as mesmas condições que os outros peptídeos. Avaliando a massa de células ao final do ensaio podemos observar que não houve redução significativa da massa celular do controle quando comparada as células tratadas com o peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>. Portanto, o peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> perdeu completamente a capacidade de inibir *C. tropicalis* (Figura 16A).

Para avaliar se houve perda da viabilidade nas células tratadas com peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>, após o ensaio de inibição as células foram lavadas e semeadas em meio ágar Saboraud na ausência do peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>, entretanto o peptídeo modificado não foi capaz de causar a perda da viabilidade nas células de *C. tropicalis* (Fig. 16B).

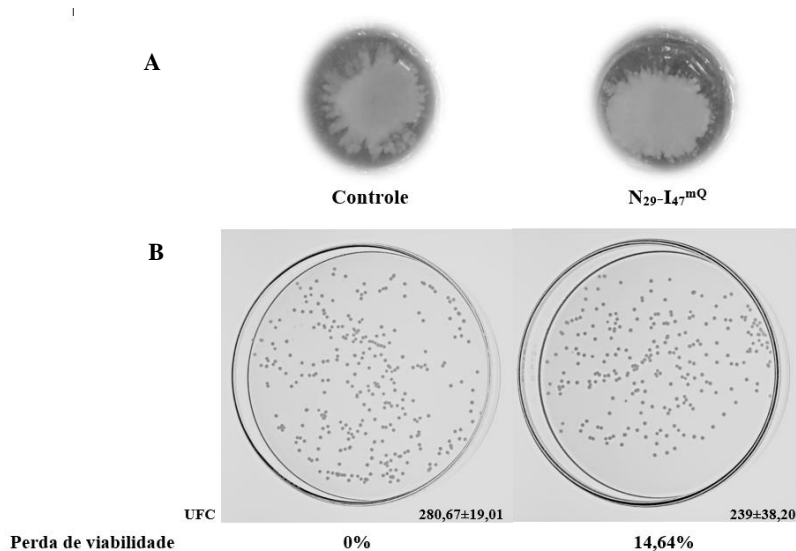


Figura 16 - Efeito antifúngico de N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> sobre *Candida tropicalis*. (A) Imagens do fundo dos poços da placa no final do ensaio de inibição do crescimento (48 h), mostrando o padrão de crescimento das células de *C. tropicalis*, na ausência (controle) e presença de 80 μM N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>. (B) Fotos da placa de Petri mostrando a viabilidade das células de *C. tropicalis* após o ensaio de inibição do crescimento (48 h) em placas de ágar incubadas com 80 μM de N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> e mostrando a percentagem de perda de viabilidade das células tratadas com o peptídeo. Imagens mostradas foram gerados usando dados de um experimento independente de três (n = 3).

#### 4.13 - Predição da estrutura secundária e atividade biológica do peptídeo mais ativo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>

A ferramenta de cálculo e previsão do banco de dados de peptídeos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP/>) (APD) previu para o peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> uma estrutura em α-hélice. Em uma busca no banco de dados de AMPs a ferramenta de APD também encontrou AMPs semelhantes a N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>. O mais semelhante foi o peptídeo sintético análogo a brevivinina-2, isolado do *Hylarana erythraea* (sapo), denominado B2RP-ERa. Um alinhamento entre N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e B2RP-ERa revelou 47% de identidade e 68% de similaridade (Fig. 17).

N <sub>29</sub> -I <sub>47</sub>	<b>NGV-KN<b><i>IL</i></b>NG-ART<b><i>T</i></b>ADRR<b><i>G</i></b>-I</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	
B2RP-ERa	- <b><i>G</i></b> <b><i>V</i></b> <b><i>I</i></b> <b><i>K</i></b> <b><i>S</i></b> <b><i>V</i></b> <b><i>L</i></b> <b><i>K</i></b> <b><i>G</i></b> <b><i>V</i></b> <b><i>A</i></b> <b><i>K</i></b> <b><i>T</i></b> <b><i>V</i></b> <b><i>A</i></b> -- <b><i>L</i></b> <b><i>G</i></b> <b><i>M</i></b> <b><i>L</i></b>	47	68	(%)

Figura 17 - Alinhamento das sequências de aminoácidos dos peptídeos N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e B2RP-ERa utilizando o Blast. Gaps manuais (-) foram introduzidos para melhorar o alinhamento. Em negrito são mostrados os resíduos de aminoácidos idênticos e em itálico são mostrados os resíduos de aminoácidos similares e suas respectivas porcentagens. I – identidade; S – similaridade.



## 5 – DISCUSSÃO

### Seção I - Estudo do mecanismo de inibição da rVu-LTP1.1 sobre a $\alpha$ -amilase salivar humana

Em trabalho prévio nosso grupo revelou a capacidade da rVu-LTP1.1 de inibir a atividade biológica de duas  $\alpha$ -amilases, a salivar humana e a intestinal do inseto *Callosobruchus maculatus* (Vieira-Silva *et al.*, 2018a). Na sequência desse trabalho, quatro peptídeos sintéticos baseados na sequência primária da rVu-LTP1.1 foram testados contra a HSA e dois deles, nomeados de N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub>, inibiram 93 e 94% respectivamente, a atividade desta enzima (Vieira-Silva *et al.*, 2018b).

Neste trabalho em questão, nós realizamos a síntese da região N-terminal (M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub>) a única região da rVu-LTP1.1 que ainda não havia sido testada. No peptídeo M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub> houve uma substituição do resíduo de cisteína por alanina, para evitar a formação de pontes dissulfeto ou cisteínas livres que não existem na rVu-LTP1.1 (Bradley *et al.*, 1997). Alanina foi escolhida para essa substituição por causa da semelhança entre a sua estrutura e a da cisteína diferindo apenas na ausência do grupo SH na cadeia lateral. As características bioquímicas deste peptídeo são apresentadas na tabela 1.

O peptídeo M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub> não inibiu a atividade da HSA. Acreditamos que seja devido ao seu arranjo estrutural restrito na proteína inteira, em que a primeira cisteína realiza uma ponte dissulfeto tornando essa região mais rígida (Figura 2). Outro fator importante é sua carga neutra, que impede atração entre o sítio ativo da HSA, composto por uma tríade carregada negativamente (Asp-Glu-Asp) (Matsuura, 2002).

Após o ensaio que identificou quais regiões da rVu-LTP1.1 eram responsáveis pela inibição da HSA, realizamos busca em banco de dados por peptídeos que inibissem  $\alpha$ -amilases. Muitos desses peptídeos eram classificados como inibidores de  $\alpha$ -amilase de origem vegetal e não como LTPs (Kader, 1996) e por isso a dificuldade em identificá-los. Como exemplo, temos o peptídeo isolado de *Eleusine coracana* (I-2) que possui uma sequência semelhante à de inibidores de  $\alpha$ -amilase com uma estrutura primária composta por 95 resíduos de aminoácidos e com 7 resíduos de cisteínas (Campos e Richardson, 1984). Outro peptídeo, isolado de *Hordeum vulgare* (cevada) (PAPI<sub>Hv</sub>), com características semelhantes a um inibidor de  $\alpha$ -amilase/protease com 91 resíduos de aminoácidos e 8 resíduos de cisteínas (Svensson *et al.*, 1986). E por fim foi encontrado outro peptídeo com 91 resíduos de aminoácidos e 8 resíduos de cisteínas que foi extraído de sementes de *Oryza sativa* (arroz) (PAPI<sub>Os</sub>) e possuía sequência

primária semelhante à de inibidores de  $\alpha$ -amilase, inclusive a I-2 (Yu *et al.*, 1988). Apesar das semelhanças dos inibidores de  $\alpha$ -amilase nas sequências primárias, apenas I-2 teve essa atividade biológica comprovada a partir de experimentos *in vitro* (Bernhard e Somerville, 1989). Anos mais tarde esses três peptídeos foram classificados como LTP<sub>1s</sub> (Bernhard e Somerville, 1989).

Utilizando o BLAST foi realizado o alinhamento destas quatro sequências de LTP<sub>1s</sub> capazes e não capazes de inibir a atividade da  $\alpha$ -amilase e incluindo a rVu-LTP1.1 destacando as duas regiões que compreendiam os peptídeos sintéticos N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub>, determinantes para a inibição da HSA (Vieira-Silva *et al.*, 2018b). Esse alinhamento mostrou que as PAPI<sub>Hv</sub> e PAPI<sub>Os</sub>, LTPs que não inibiam a atividade da  $\alpha$ -amilase, (Svensson *et al.*, 1986, Yu *et al.*, 1988) não apresentavam aminoácidos carregados positivamente nas mesmas posições da rVu-LTP1.1, entretanto, a I-2, que inibe  $\alpha$ -amilase, apresentava aminoácidos carregados positivamente com as mesmas características da rVu-LTP1.1 (Campos e Richardson, 1984) (Figura 3A).

Na região C-terminal da I-2, assim como na rVu-LTP1.1, existe um aminoácido com carga positiva, entretanto em posição distinta daquela encontrada na rVu-LTP1.1. Observamos que os peptídeos que não possuem atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase não possuem aminoácidos carregados positivamente entre Cys<sub>70</sub> e Cys<sub>84</sub>, somente rVu-LTP1.1, I-2 e MbnsLTP<sub>1</sub> os possuem (Figura 3A). Após esta análise, acreditamos que provavelmente MbnsLTP<sub>1</sub> apresente atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase.

Nós acreditávamos, que esses resíduos carregados positivamente estavam na mesma posição tanto na rVu-LTP1.1 como na I-2 e estavam expostos na superfície dessas moléculas permitindo a sua interação com  $\alpha$ -amilase. Para confirmar essa suposição, nós construímos o modelo tridimensional da I-2 através de modelagem por homologia.

A I-2 foi modelada utilizando como molde a estrutura tridimensional da LTP de *Zea mays* (milho) (PDB ID: 1FK5) (Han *et al.*, 2001) (Figura 4). A qualidade estereoquímica do modelo criado foi avaliada através do mapa de Ramachandram. Este revelou qualidade aceitável, visto que 95% dos aminoácidos em regiões favoráveis e 5% em regiões permitidas (Figura 5).

A LTP de milho tem 75% identidade com I-2, diferindo em 24 aminoácidos, nove dos quais são positivos (aqueles com características físico-químicas semelhantes) (Figura 3A). I-2 compartilha a estrutura tridimensional das LTP<sub>1s</sub> porém, possui apenas três pares de pontes dissulfeto por possuírem sete resíduos de Cys, esta proteína não realiza ponte dissulfeto entre Cys<sub>4</sub> e Cys<sub>7</sub> (indicada em laranja na Figura 3A). A capacidade de transportar lipídeos da I-2

ainda não é conhecida, sendo assim, I-2 é considerada um peptídeo similar à LTP, pois seu modelo estrutural indica uma grande similaridade com LTPs, como a presença das quatro  $\alpha$ -hélices com a mesma organização espacial das LTP1s. Assim como acreditávamos, os resíduos Arg<sub>41</sub> e Arg<sub>79</sub> da I-2 estavam em voltas e expostos ao solvente como mostrado na figura 3A.

Este resultado corrobora com a nossa hipótese da importância da presença de resíduos de aminoácidos carregados positivamente nas regiões de voltas e expostos para a superfície nas LTPs tornando esses peptídeos capazes de inibir a atividade enzimática de  $\alpha$ -amilases.

A Arg<sub>39</sub> na I-2 e rVu-LTP1.1 estão sobrepostas na mesma posição (Figura 6) porém, Lys<sub>80</sub> da rVu-LTP1.1 e Arg<sub>73</sub> na I-2 não estão na mesma posição. Podemos observar que todos os aminoácidos carregados positivamente nestes dois peptídeos estão em regiões de voltas e expostos para a superfície em contato com o solvente (Figura 6). A Arg<sub>39</sub> na rVu-LTP1.1 compreende a região do peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>, que em trabalho anterior mostrou forte atividade inibitória sobre HSA. Diante dessa informação e para confirmar a importância desse resíduo de aminoácido na inibição da  $\alpha$ -amilase, nós sintetizamos o peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> substituindo a Arg<sub>39</sub> por uma Gln, baseados na observação de a PAPI<sub>Hv</sub>, previamente caracterizada como incapaz de inibir  $\alpha$ -amilase possui uma Gln (carga neutra) na mesma posição da Arg<sub>39</sub> (carga positiva) na rVu-LTP1.1 (Figura 3A). O peptídeo modificado chamado de N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> perdeu a capacidade de inibir HSA (Figura 7A e B). Este resultado confirma a nossa hipótese de que resíduos de aminoácidos carregados positivamente em voltas são responsáveis pela inibição da  $\alpha$ -amilase e que a Arg<sub>39</sub> em N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>, e possivelmente em rVu-LTP1.1, é determinante para a atividade biológica.

Com base nos resultados encontrados, alinhamos sequências primárias de várias LTP<sub>1s</sub> que apresentassem resíduos carregados positivamente nas regiões de volta, característica frequente entre LTP<sub>1s</sub>. Portanto, previmos que as LTP<sub>1s</sub> da figura 8 provavelmente possuem essa atividade biológica. Apesar dessas características em comum, poucas LTP<sub>1s</sub> foram descritas como inibidoras da atividade de  $\alpha$ -amilase. As sequências primárias completas de Cc-LTP1 (LTP1 de *Coffea canephora*, Zottich *et al.*, 2011) e Ca-LTP1 (LTP1 de *Capsicum annuum*, Diz *et al.*, 2011), que tem a capacidade de inibir  $\alpha$ -amilase, ainda não foram determinadas. Não conseguimos fazer uma análise mais ampla devido à falta de dados, entretanto a nossa hipótese de que resíduos de aminoácidos carregados positivamente nas voltas são responsáveis pela atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase corrobora com os resultados obtidos neste trabalho.

Nossos resultados provêm de uma forte evidência que rVu-LTP1.1 é um novo membro da classe proteica de inibidores de  $\alpha$ -amilase. Este estudo nos aponta a possibilidade da

atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase pode estar contida em uma região ou regiões da proteína não sendo necessária a presença de estrutura tridimensional integrada.

Diferentemente da atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase onde regiões da LTP detêm a atividade biológica, para a atividade de transporte de lipídeos é necessária uma LTP com estrutura tridimensional completa e funcional (Grosbois *et al.*, 1993; Zachowski *et al.*, 1998). Acreditamos que outras atividades biológicas já descritas para LTPs também possam estar associadas a algumas regiões da molécula.

## **Seção II – Análise *in silico* do mecanismo de inibição da *Vu*-LTP1.1 sobre a $\alpha$ -amilase salivar humana**

No intuito de estudar o possível sítio de interação entre o inibidor *Vu*-LTP1.1 e a HSA, nós realizamos os estudos de *docking*. O ligante *Vu*-LTP1.1 interage com a superfície da HSA se inserindo na fenda de ligação a carboidrato e impedindo a entrada do substrato na enzima (Figura 9A, B, C e D).

As  $\alpha$ -amilases são enzimas ácidas contendo em sua superfície predominância de resíduos de aminoácidos carregados negativamente, e apresentam três resíduos ácidos conservados no sítio catalítico (Glu, Asp, Asp). Estes resíduos participam, não somente na quebra do substrato, mas também nas interações com o inibidor. Na maioria dos complexos descritos na literatura, resíduos carregados positivamente são importantes para o processo de interação (Wiegand *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 1999; Mirkov *et al.*, 1995). As LTPs são ricas em resíduos carregados positivamente como Arg e Lys o que torna essa classe de proteínas, potenciais inibidores de  $\alpha$ -amilase.

A estabilidade do complexo *Vu*-LTP1.1/HSA na fenda de ligação a carboidrato ocorre devido a formação de três pontes salinas, 28 pontes de hidrogênio e 272 contatos não ligados (Tabela 2).

Na figura 9E é representada a sequência primária de *Vu*-LTP1.1 sendo destacados em vermelho os resíduos de aminoácidos que interagem com HSA. A maior parte desses resíduos estão em duas regiões que compreendem os peptídeos sintéticos N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> (regiões sublinhadas na Figura 9E) que foram identificados em trabalho anterior como responsáveis pela inibição da HSA através de estudos bioquímicos (Vieira-Silva *et al.*, 2018b). Segundo os valores de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) e a constante de dissociação (Kd) a interação entre o complexo *Vu*-LTP1.1/HSA é considerada estável e indica uma alta afinidade de ligação entre o ligante (*Vu*-LTP1.1) e o sítio ativo da HSA.

Analisamos os parâmetros de interação dos complexos *Vu*-LTP1.1/HSA e comparamos com HOE-467A (tendamistat, inibidor de  $\alpha$ -amilase de *Streptomyces tendae*)/PPA ( $\alpha$ -amilase pancreática suína, do inglês *porcine pancreas  $\alpha$ -amylase*). O tendamistat é conhecido como um dos mais potentes inibidores proteicos de  $\alpha$ -amilase (Wiegand *et al.*, 1995) e teve sua estrutura descrita em 1985 (Kline *et al.*, 1986). A interação de HOE-467A/PPA apresenta parâmetros semelhantes aos do *Vu*-LTP1.1/HSA (Tabela 2), porém o complexo r*Vu*-LTP1.1/HSA apresentou uma interação mais forte do que o complexo HOE-467A/PPA (Tabela 2).

Em estudo prévio, após ensaios bioquímicos, foi identificado um resíduo carregado positivamente importante para a inibição, a Arg<sub>39</sub> da *Vu*-LTP1.1 (Vieira-Silva *et al.*, 2018b) que é introduzida no sítio ativo da HSA e forma uma ponte de hidrogênio com a Asp<sub>300</sub>, um resíduo de aminoácido carregado negativamente do sítio catalítico da tríade da HSA (Matsuura, 2002) (Figura 9D e F). Aparentemente, o modelo estrutural geral da *Vu*-LTP1.1 não é alterado após a interação com HSA. Estes dados corroboram com o nosso ensaio bioquímico inicial de inibição da HSA por *Vu*-LTP1.1 (Vieira-Silva *et al.*, 2018a). O mecanismo de inibição da HSA pela *Vu*-LTP1.1 ocorre principalmente devido a duas características observadas. Primeiro é a obstrução da fenda de ligação de carboidratos pela *Vu*-LTP1.1 através dos segmentos N<sub>29</sub>GVKNILNGARTTADRR<sub>45</sub> e V<sub>75</sub>NIPWKISSSTNCNTIN<sub>91</sub> que obstrui a entrada do sítio catalítico (Figura 9C e D). E segundo a distribuição de carga da superfície positiva na *Vu*-LTP1.1 (Figura 9B) e a distribuição de carga negativa na fenda de carboidratos da HSA (Figura 9A), supomos que essa distribuição de carga complementar pode ajudar a guiar a interação entre as duas proteínas.

Da mesma forma, nessas duas regiões, dois resíduos de aminoácidos, um em cada região, Arg<sub>44</sub> na primeira e Trp<sub>79</sub> na segunda, foram indicados como *hot-spots* pelo programa SpotOn (Moreira *et al.*, 2017) para interação de proteínas, o que também ajuda não apenas na orientação do complexo, mas também para mantê-lo unido (Figura 9E, resíduos de aminoácidos verdes). Suas interações com a HSA estão indicadas na Figura 9. Além disso, o bloqueio da HSA também ocorre pela Arg<sub>39</sub> da *Vu*-LTP1.1, que se liga a uma das tríades catalíticas no sítio ativo da HSA, o Asp<sub>300</sub>, por uma ligação de hidrogênio (Figura 9D e F).

A Arg<sub>39</sub> da *Vu*-LTP1.1 está localizada em uma volta completamente exposta ao solvente (Figura 9B). A ligação Arg<sub>39</sub>-Asp<sub>300</sub> torna o sítio ativo da HSA não funcional, devido a necessidade das tríades catalíticas ácidas livres para a clivagem da ligação glicosídica (Matsuura, 2002).

Em seguida, analisamos a interação dos peptídeos sintéticos N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> com HSA, para correlacionar e entender melhor o mecanismo inibitório da *Vu*-LTP1.1 (Vieira-Silva *et al.*, 2018b).

O complexo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>/HSA apresentou um  $\Delta G$  e um K<sub>d</sub> de -14.9 e 1.1E<sup>-11</sup>, respectivamente (Tabela 2), que são parâmetros menores que os observados para a interação Vu-LTP1.1-HSA, mas são parâmetros ainda melhores que o HOE-467A/PPA, indicando uma interação mais forte. A Arg<sub>39</sub> do N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>, como em Vu-LTP1.1, é introduzida no sítio ativo da HSA e dentro da cavidade interage com os três aminoácidos da tríade catalítica da HSA (Asp<sub>197</sub>, Glu<sub>233</sub>, Asp<sub>300</sub>) (Figura 10B). Como o peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> não está mais restrito espacialmente por causa da estrutura rígida e estabilizada por ligações dissulfeto e outras interações que mantêm a estrutura da Vu-LTP1.1, a qual ele faz parte, a Arg<sub>39</sub> em N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> está mais livre estruturalmente e por este motivo entra mais profundamente na cavidade onde é capaz de interagir com a tríade catalítica de HSA por pontes de hidrogênio (Figura 10C).

No complexo  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub>/HSA podemos observar que o peptídeo  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> interage com a fenda de ligação a carboidratos da HSA (Figura 11A e Tabela 2). Lys<sub>80</sub> entra profundamente na cavidade, onde é capaz de interagir com dois resíduos de aminoácidos da tríade catalítica por pontes de hidrogênio, a Asp<sub>197</sub> e a Asp<sub>300</sub>.

Na Vu-LTP1.1 inteira não ocorre a interação, entre Lys<sub>80</sub> da Vu-LTP1.1 com Asp<sub>197</sub> e Asp<sub>300</sub> da HSA, porque existem mais possibilidades de interações para o peptídeo  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> livre da estrutura da Vu-LTP1.1 inteira, como explicado para a Arg<sub>39</sub> no N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>. O nosso ensaio bioquímico de inibição da HSA pelo  $\alpha$ G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> (Vieira-Silva *et al.*, 2018b), corrobora com esses dados e com a nossa análise inicial e suposição de que a Lys<sub>80</sub> deveria ser responsável pela inibição. Os resíduos de aminoácidos do *hot-spot* nos peptídeos N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e G<sub>74</sub>-N<sub>91</sub> não foram calculados devido ao requisito do software de tamanho mínimo de resíduos de aminoácidos que os peptídeos não alcançaram.

Como observado no ensaio da seção 4.5 o peptídeo sintético N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>, no qual a Arg<sub>39</sub> foi substituída por Gln, perdeu a atividade inibitória sobre a HSA (Vieira-Silva *et al.*, 2018b), indicando que este aminoácido carregado positivamente é determinante para a inibição. Adicionalmente os estudos de *docking* entre N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> e HSA comprovaram que este peptídeo não interagiu com a HSA em nenhuma das execuções do programa (Resultado não mostrado). Esse resultado explica a ausência de inibição observada pela análise bioquímica e reforça a importância desse resíduo de aminoácido carregado nesta posição para a inibição da HSA pela Vu-LTP1.1 (Vieira-Silva *et al.*, 2018b).

Na sequência nós realizamos a análise de *docking* entre I-2 e HSA, com conhecimento prévio acerca do mecanismo de inibição da  $\alpha$ -amilase, sabíamos que a interação com o sítio ativo da enzima ocorre com resíduos carregados positivamente da Vu-LTP1.1. O *docking* mostrou que a I-2 interage com a fenda de ligação a carboidratos da HSA (Bernhard e

Somerville, 1989), que a Arg<sub>79</sub> entra no sítio ativo onde interage com os dois resíduos de aminoácidos da tríade catalítica da HSA por pontes de hidrogênio, a Glu<sub>233</sub> e a Asp<sub>300</sub> (Figura 12A e Tabela 2).

Assim como, observado com os resultados deste estudo em questão, o mecanismo de inibição de muitos inibidores de  $\alpha$ -amilase proteicos conhecidos refere-se à interação de um resíduo de aminoácido carregado do inibidor que se liga e bloqueia pelo menos um dos aminoácidos carregados negativamente da tríade catalítica da enzima. No complexo tendamistat/PPA, por exemplo, a Arg<sub>19</sub> do tendamistat se liga à Glu<sub>233</sub> da PPA por uma ponte salina (Wiegand *et al.*, 1995). Outro exemplo bem caracterizado é do inibidor da  $\alpha$ -amilase de *Amaranthus hypochondriacus* complexado com a  $\alpha$ -amilase de *Tenebrio molitor* (TMA, do inglês *Tenebrio molitor  $\alpha$ -amylase*) em que o Arg<sub>7</sub> da ligação do inibidor a Asp<sub>287</sub> da TMA por uma ponte salina (Pereira *et al.*, 1999).

Sabendo que o mecanismo que rege a inibição da  $\alpha$ -amilase é a interação dos resíduos carregados positivamente do inibidor (LTP<sub>1S</sub>). Como mostrado pelos testes bioquímicos, I-2 interage com a fenda de ligação a carboidratos de HSA (Bernhard e Somerville, 1989), como a Vu-LTP1.1, com três pontes salinas, 17 ligações de hidrogênio e 216 contatos não ligados (Figura 12A e Tabela 2). O complexo I-2/HSA apresentou um  $\Delta G$  e o K<sub>d</sub> de -16.0 e 1.7E<sup>-12</sup>, respectivamente, o que indica uma interação forte, embora seja mais fraca do que os complexos Vu-LTP1.1/HSA e HOE-467A/PPA (Tabela 2).

Nossa análise de *docking* indicou que a Arg<sub>79</sub> adentra a cavidade do sítio ativo onde interage com os dois resíduos de aminoácidos (Glu<sub>233</sub> e a Asp<sub>300</sub>) da tríade catalítica da HSA por pontes de hidrogênio, (Figura 12A e Tabela 2). E a Arg<sub>34</sub> foi indicada como *hot-spot* para interação I-2/HSA (Tabela 2). Em trabalho anterior (Vieira-Silva *et al.*, 2018b), nós sugerimos que dois resíduos de aminoácidos, Arg<sub>39</sub> e Lys<sub>80</sub> em Vu-LTP1.1 e Arg<sub>34</sub> e Arg<sub>79</sub> em I-2, deveriam ser responsáveis pela inibição e, de fato, um deles em cada peptídeo foi apontado pela análise de *docking* como responsável pela inibição de  $\alpha$ -amilase, Arg<sub>39</sub> em Vu-LTP1.1 (Figura 9) e Arg<sub>79</sub> em I-2 (Figura 12).

### **Seção III - Estudo da atividade inibitória de peptídeos baseados na sequência da rVu-LTP1.1 sobre leveduras**

Assim como foi confirmada a presença de duas regiões da rVu-LTP1.1 responsáveis pela inibição da HSA na seção I deste trabalho, acreditamos que outras atividades biológicas descritas para LTPs, como a atividade antimicrobiana, também possam estar associadas a algumas regiões da molécula. Para fazer esta suposição, nos baseamos em uma LTP<sub>1</sub>, chamada

Ace-AMP1, isolada de *Allium cepa* (cebola) com uma característica estrutural peculiar, sua cavidade hidrofóbica é obstruída por resíduos de aminoácidos aromáticos volumosos no entanto, apresenta fortíssima atividade antifúngica e com amplo espectro de ação. A obstrução de sua cavidade hidrofóbica impede que este peptídeo faça a ligação e o transporte de lipídeos (Cammue *et al.*, 1995; Tassin *et al.*, 1998). Esta análise indica a dissociação entre estrutura tridimensional intacta e atividade antimicrobiana em LTPs.

Após quase 30 anos da descoberta da atividade antifúngica das LTPs de plantas ainda não existe estudo estrutura função dessa atividade biológica.

Diante de todas as informações anteriormente expostas, nossa intenção nesta seção do trabalho é o melhor entendimento sobre a atividade antifúngica das LTP<sub>1</sub>s e relacioná-la a estrutura da rVu-LTP1.1 para que depois este entendimento possa ser espelhado para outras LTP<sub>1</sub>s.

Nós começamos o nosso estudo, pelo ensaio de inibição do crescimento da *C. albicans*. Nesse primeiro momento foram escolhidas as concentrações de 100 e 150 µg/mL que correspondem a 13 e 20 µM, respectivamente (a unidade de medida da concentração da rVu-LTP1.1 foi mudada de µg/mL para µM). Essa concentração de 20 µM foi responsável pela inibição de aproximadamente 25% do crescimento desta levedura em 36 h de ensaio (Figura 13). Visto que esta concentração não inibiu completamente o crescimento da *C. albicans*, resolvemos quadruplicar essa concentração seguindo uma projeção baseada na inibição de 25% causada por 20 µM, desta forma estimamos que 80 µM seria uma concentração suficiente para inibir completamente o crescimento de *C. albicans*.

A partir dos resultados com *C. albicans* resolvemos fazer uma varredura com cinco espécies de *Candida* e *S. cerevisiae*, para avaliar o efeito da rVu-LTP1.1 sobre o crescimento destas leveduras.

A avaliação inicial da inibição do crescimento foi feita visualmente por meio da diminuição da massa celular das leveduras após o tratamento com 80 µM de rVu-LTP1.1 em 48 horas. As leveduras testadas apresentaram sensibilidade diferentes quando crescidas na presença de rVu-LTP1.1, sendo *C. tropicalis* a levedura mais sensível (Figura 14A).

Diz *et al.* (2011) também relataram um efeito diferenciado da Ca-LTP1, uma LTP<sub>1</sub> isolada de *Capsicum annum* (pimenta) em leveduras. *C. tropicalis* na presença de 400 µg/mL Ca-LTP1 mostrou alterações morfológicas e teve inibição de 70% de seu crescimento, diferentemente da *S. cerevisiae* que não apresentou inibição do crescimento. Um efeito similar foi observado com leveduras tratadas com peptídeos análogos à halitina, um peptídeo isolado do veneno de *Halictus sexcinctus* (abelha). Diversas espécies de leveduras como *S. cerevisiae* e cinco



espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans* e *C. tropicalis* foram testadas e a intensidade do efeito variou entre as diferentes espécies de leveduras. Como em nosso trabalho a levedura mais suscetível ao efeito dos peptídeos análogos à halitina foi *C. tropicalis* (Kodedova e Sychrová, 2017). Após 48 h de ensaio de inibição, as leveduras foram lavadas e plaqueadas em meio ágar Sabouraud sem a proteína inibidora para quantificar a inibição do crescimento das leveduras tratadas com a rVu-LTP1.1 O experimento mostrou que rVu-LTP1.1 causou perda da viabilidade em todas as espécies de leveduras variando na taxa de células mortas revelando um efeito fungicida. Exceto para *C. buinenses* que o efeito foi fungistático (Figura 14B).

A promoção da perda da viabilidade em células de leveduras também foi observada em outras LTP1s, como Cc-LTP1, isoladas de *Coffea canephora* (café), que causou redução da viabilidade das células de *S. cerevisiae* em 15%, e 35% para *C. albicans* e *C. tropicalis* (Zottich *et al.* 2011).

Acreditamos que este efeito diferenciado da rVu-LTP1.1 sobre as diferentes espécies de leveduras testadas é devido a diversas estruturas ou arranjos composicionais das membranas das leveduras. Por exemplo, a levedura *S. cerevisiae* tem em sua membrana, como o esfingolípido mais abundante, o monossildiinositofosforilceramida (M(IP)<sub>2</sub>C) (Rest *et al.*, 1995), enquanto na membrana de *C. albicans*, o M(IP)<sub>2</sub>C está ausente e a glicosilceramida (GlcCer) é o esfingolípido mais abundante (Del Poeta *et al.*, 2014; Thevissen *et al.*, 2004). Para defensinas de planta, família de AMPs de plantas, o efeito diferenciado dos peptídeos desta família contra leveduras é devido à sua interação com os esfingolípídios presentes nas membranas das leveduras (Wilmes *et al.*, 2011). Temos como exemplo essa especificidade na interação, a Dm-AMP1 (da *Dahlia merckii*, dahlia) interage com M(IP)<sub>2</sub>C (Thevissen *et al.*, 2003) e Rs-AFP2 (*Raphanus sativus*, rabanete) interage com GlcCer (Thevissen, 2003), e esta diferente interação com os componentes da membrana das leveduras explica como o Dm-AMP1 é capaz de inibir *S. cerevisiae* e Rs-AFP2 é capaz de inibir *C. albicans* com grande diferença na intensidade da inibição.

O mecanismo de ação das LTP1s contra microrganismos ainda não foi totalmente elucidado. No entanto, foi relatado por Regente *et al.* (2005) a capacidade de uma LTP<sub>1</sub>, Ha-AP10, isolado de *Helianthus annuus* (girassol), em permeabilizar a membrana plasmática do fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. A permeabilização da membrana também estava envolvida na inibição do crescimento fúngico para outras LTP<sub>1</sub>s (Diz *et al.*, 2011; Zottich *et al.*, 2011). Ademais, no trabalho com peptídeos análogos a halitina, o mecanismo de ação também foi estudado e o possível alvo molecular foi identificado na membrana. Células de *C. glabrata* cultivadas na presença de terbinafina, um bloqueador da síntese de ergosterol, mostraram-se

mais resistentes a ação antifúngica dos peptídeos análogos da halitina (Kodedová e Sychrova, 2017), que confirmou a importância da interação de AMPs com membranas de levedura.

Mais de 30 anos após a descoberta da atividade antifúngica das LTP1s de planta (Terras *et al.*, 1992), ainda não há estudo relacionando sua estrutura a atividade antifúngica. Entretanto entendemos a importância desses estudos para a elucidação do mecanismo de inibição das LTPs. Para os AMPs em geral existem publicações que correlacionam sua estrutura com suas atividades biológicas (Ahmad *et al.*, 2012; Maccari *et al.*, 2013; Koehbach, 2017). Os estudos estrutura atividade biológica para AMPs são realizados primeiramente com a síntese de peptídeos baseados em regiões da sequência de aminoácidos e em seguida esses peptídeos são testados separadamente a fim de descobrir se existe uma região responsável pela atividade biológica (Liu *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007). Estas pequenas regiões derivadas de AMPs demonstraram ser muito eficazes na inibição do crescimento e na promoção da morte de células microbianas. A redução no tamanho dos AMPs também oferece vantagens tais como reduzir as concentrações inibitórias e, assim, aumentar a sua eficácia, apresentando baixa toxicidade para células de mamíferos e reduzindo o custo de produção. Todas essas vantagens, tornam possível o desenvolvimento de drogas terapêuticas a partir de AMPs (Afacan *et al.*, 2012; Porto *et al.*, 2018).

Para averiguarmos se existe alguma região responsável pela atividade antifúngica apresentada pela rVu-LTP1.1, nós testamos os cinco peptídeos previamente desenhados e que cobriam todas as regiões estruturais de rVu-LTP1.1 (Vieira-Silva *et al.*, 2018b) (Tabela 1). Como a *C. tropicalis* foi a levedura mais sensível à ação da rVu-LTP1.1, esta foi escolhida para prosseguir com os estudos. Os cinco peptídeos foram testados separadamente na concentração de 80  $\mu$ M. Esta concentração foi escolhida por ser a mesma usada para a rVu-LTP1.1. Observando visualmente a diminuição da quantidade da massa celular das células tratadas com os peptídeos sintéticos após 48 h de ensaio, podemos constatar que pelo menos duas regiões estruturais da rVu-LTP1.1 são responsáveis pela inibição do crescimento de *C. tropicalis* que compreende os peptídeos C<sub>13</sub>-C<sub>27</sub> e N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> (Figura 15A).

Na literatura vários trabalhos mostram pequenas regiões dos AMPs que detêm sua atividade biológica. Assim como no caso da  $\beta$ -defensina-3 de humano em que sua região C-terminal detêm a atividade antibacteriana do AMP e apresenta baixa ação citotóxica sobre células de mamíferos quando comparada a proteína inteira (Bai *et al.* 2009). Outro exemplo é a volta  $\beta$ 2- $\beta$ 3 da defensina Rs-AFP2 é responsável pela inibição do fungo *Fusarium culmorum* (Schaaper *et al.*, 2001).

Para quantificar o efeito de inibição do crescimento em *C. tropicalis* tratada com os peptídeos, as células de *C. tropicalis* foram plaqueadas após o ensaio. As unidades formadoras de colônias revelaram que o peptídeo que causou a maior taxa de perda de viabilidade foi o N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> (Figura 15B), que coincide com o peptídeo que mais inibiu o crescimento da *C. tropicalis*, de acordo com a redução da massa celular do ensaio de inibição do crescimento (Figura 15A).

Acredita-se que, como descrito para outros AMPs, o mecanismo de interação entre LTP<sub>1S</sub> e membranas de microrganismos é decorrente de uma atração entre as cargas positivas expostas na superfície do AMP e cargas negativas dos fosfolipídios das membranas externas dos microrganismos (Brodgen, 2005). Esta observação é corroborada pelo efeito de neutralização na atividade antimicrobiana de vários AMPs quando o ensaio antimicrobiano é feito na presença de cátions, especialmente os divalentes (Tam *et al.*, 2002). Em relação a essa característica, o peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> tem uma carga global de +3 e cerca de 31% de resíduos hidrofóbicos (tabela 1) tornando esse peptídeo anfifílico, uma característica desejável para os AMPs (Wiradharma *et al.*, 2011).

Entre os quatro resíduos com carga positiva, três são argininas. A arginina tem um alto pKa, por volta de 12,45, o que permite que esse resíduo seja protonado durante a interação com a cauda lipídica das membranas dos microrganismos, e também para realizar pontes de hidrogênio com estruturas da membrana dos microrganismos (Li *et al.*, 2017). Adicionalmente, no peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>, podemos observar a presença de uma arginina na posição 39 (tabela 1) que na rVu-LTP1.1 está em uma região de volta e exposta a superfície da proteína (Figura 9B). A carga e a posição deste resíduo de aminoácido o torna um forte candidato para interação com membranas de microrganismos.

Por causa da importância anteriormente demonstrada da Arg<sub>39</sub>, um aminoácido carregado positivamente, para a inibição da HSA associada ao conhecimento da importância da carga positiva para a atividade antimicrobiana de AMPs, e também pela coincidência deste mesmo peptídeo ser o mais ativo sobre a levedura, sintetizamos o peptídeo modificado (N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>) baseado no peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>, no qual substituímos a Arg<sub>39</sub> por Gln, um resíduo de aminoácido neutro. O peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup> teve sua atividade antifúngica testada sobre *C. tropicalis* sob as mesmas condições dos outros peptídeos e perdeu completamente a capacidade de inibir essa levedura e adicionalmente não mostrou perda significativa na viabilidade celular (Figura 16). Este resultado confirma a importância dos resíduos carregados positivamente e de sua distribuição na inibição e morte de células fúngicas. Por que mesmo o N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> tendo outros resíduos catiônicos em sua sequência, o principal resíduo para a inibição foi a arginina na posição 39. Da mesma forma, este resíduo de aminoácidos (Arg<sub>39</sub>) demonstrou ser crucial para

a inibição da atividade da HSA (Vieira-Silva *et al.*, 2018b). Como N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> tem outros aminoácidos carregados positivamente, uma Lys<sub>32</sub> e duas Arg nas posições 44 e 45, que não foram alteradas no N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub><sup>mQ</sup>, há o indicativo que aminoácido carregado positivamente na posição 39 é crucial para a atividade antimicrobiana (Figura 16). De fato, alguns trabalhos relatam outro fator importante para a atividade antimicrobiana de AMPs que é a posição dos resíduos de aminoácidos e não apenas o aumento da carga positiva líquida. Podemos observar isso no estudo mutacional da defensina Rs-AFP2 durante a adição de resíduos carregados positivamente que levaram à diminuição da atividade antifúngica (de Samblanx *et al.*, 1997). No entanto, uma carga positiva líquida mais alta não garante maior potencial antifúngico, mas sim a posição e distribuição dessas cargas ao longo do peptídeo (Zhang e Zhu, 2010). Esses resultados indicam uma interação específica entre a carga do peptídeo com uma estrutura com carga oposta no microrganismo. Portanto, neste trabalho descrevemos um aminoácido determinante para a atividade antifúngica de N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>, e possivelmente da rVu-LTP1.1, a Arg<sub>39</sub>.

Diante do resultado interessante apresentado pelo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>, usamos uma ferramenta de cálculo e previsão do banco de dados de peptídeos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP/>). Esta ferramenta apresenta as características físico-químicas da sequência de aminoácidos imputada, além da predição de sua estrutura tridimensional e o possível arranjo espacial de seus aminoácidos. Nossa análise indicou que N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> foi previsto ter uma estrutura em  $\alpha$ -hélice. Estes dados estão de acordo com os dados estruturais da rVu-LTP1.1 que é formada por quatro  $\alpha$ -hélices, incluindo parte do peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> compreendendo os aminoácidos de N<sub>29</sub>GVKNILN<sub>36</sub> e T<sub>41</sub>ADRRGI<sub>47</sub> (Vieira-Silva *et al.*, 2018b). Vários estudos mostram que os peptídeos que tem conformação em  $\alpha$ -hélice anfipáticos favorecem a interação com membranas de microrganismos que resultam em peptídeo com atividade antimicrobiana (Dathe *et al.*, 2001; Wiradharma *et al.*, 2011), o que corrobora com nossos resultados (Figura 17). Além disso, usamos a mesma ferramenta de APD para procurar por AMPs semelhantes a N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub>. Como resultado, foi encontrado um peptídeo sintético análogo a brevivinina-2, isolado do *Hylarana erythraea* (sapo), denominado B2RP-ERa (Figura 17). Em seguida, foi realizado um alinhamento refinado entre N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> e B2RP-ERa e encontramos uma identidade de 47% e similaridade de 68% entre os dois peptídeos. B2RP-ERa tem 57% de resíduos hidrofóbicos e carga catiônica de +4, essas características conferem atividade antibacteriana e antifúngica a este peptídeo. B2RP-ERa inibe o crescimento de microorganismos como *C. albicans* em baixas concentrações de MIC (50  $\mu$ M) e apresenta atividade hemolítica relativamente baixa (Al-Ghaferi *et al.*, 2010). Permanece para ser respondido se o peptídeo N<sub>29</sub>-I<sub>47</sub> tem atividade

antibacteriana, já que compartilha características bem entendidas em outros AMPs que tem esta atividade.

Com base nas características anteriormente expostas, sabe-se que alguns aspectos físico-químicos são importantes para a atividade antimicrobiana dos AMPs e também de seus derivados, como a carga do peptídeo, o resultado apresentado pelo peptídeo cíclico C<sub>13</sub>-C<sub>27</sub>, que mimetiza uma volta de rVu-LTP1.1, é inesperado porque este peptídeo tem uma carga neutra, acompanhado do peptídeo M<sub>1</sub>-Q<sub>12</sub> (Tabela 1). No entanto, não apenas as cargas positivas que fazem o peptídeo ter um efeito na atividade antimicrobiana. Outras características também são importantes, como a hidrofobicidade (Schmidtchen *et al.* 2014). O peptídeo neutro que apresentam atividade antimicrobiana está entre os mais hidrofóbicos, C<sub>13</sub>-C<sub>27</sub> tem 53,33% de hidrofobicidade (Tabela 1). Alguns relatos mostraram que combinação de cationicidade e hidrofobicidade faz o peptídeo mais potente (Schmidtchen *et al.*, 2014). O peptídeo ARD1 (*Archeoprepona demophoon*, borboleta) que sofreu mudanças por mutação direcionada, a princípio, na carga, e logo após, na hidrofobicidade e, finalmente, uma combinação entre cargas positivas e hidrofobicidade indicaram que este peptídeo com as características combinadas teve sua atividade antifúngica aumentada (Landon *et al.*, 2004). Porto *et al.* (2018) realizou a síntese de um peptídeo derivado de AMP de *Psidium guajava* (goiaba) e fez algumas modificações, inserindo muitos resíduos com carga positiva e resíduos hidrofóbicos, tornando a atividade antibacteriana deste peptídeo mais forte quando comparado ao peptídeo original. Estudos futuros de substituição de aminoácidos no C<sub>13</sub>-C<sub>27</sub> mudando suas porcentagens hidrofóbicas esclarecerão melhor o papel dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos para a inibição da levedura.

## 6 – CONCLUSÕES

- O presente estudo mostrou que duas regiões da rVu-LTP1.1 foram responsáveis pela inibição da HSA, portanto esta capacidade não é devido a estrutura tridimensional completa das LTP<sub>1</sub>s;
- Além disso, fornecemos evidências sólidas de que os resíduos de aminoácidos básicos localizados nas voltas da rVu-LTP1.1 são responsáveis pela atividade inibitória da HSA;
- Portanto, a capacidade de inibir a atividade da  $\alpha$ -amilase nas LTP<sub>1</sub>s não é uma atividade biológica aleatória e provavelmente evoluiu para realizar uma importante função que ainda é desconhecida;
- Um bom candidato deve ser a defesa contra insetos, e também expande outras possíveis aplicações biotecnológicas nas LTPs. Nossos resultados, portanto, fornecem fortes evidências de que a rVu-LTP1.1 é um novo membro da classe de inibidores proteicos de  $\alpha$ -amilase;
- Ainda neste trabalho, mostramos dois peptídeos, baseados na sequência rVu-LTP1.1, responsável pela inibição do crescimento e morte da levedura *Candida tropicalis*;
- Estes resultados confirmam nossa hipótese inicial de que a capacidade de ligação e transporte de lipídios LTP<sub>1</sub>s são independentes da sua atividade antimicrobiana e de uma estrutura tridimensional íntegra (Han *et al.*, 2001);
- Além disso, neste estudo, mostramos a importância de resíduos carregados positivamente e resíduos hidrofóbicos combinados para a atividade antifúngica de peptídeos baseados na rVu-LTP1.1;
- A compreensão do mecanismo de inibição de fungos pela LTP<sub>1</sub>s é importante não só para a possível conexão desta atividade com o papel de defesa de plantas contra microorganismos, mas também para aplicação biotecnológica desta classe de peptídeos nas áreas agrônômica e saúde;

- Os resultados obtidos neste trabalho podem ser espelhados para outras LTP<sub>1</sub>s auxiliando no entendimento do papel biológico destes peptídeos.

## 7 – BIBLIOGRAFIA

Afacan NJ, Yeung AT, Pena OM, Hancock RE. Therapeutic Potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections, *Current Pharmaceutical Design*, 18 (6) 807-819 (2012);

Ahmad A, Ahmad E, Rabbani G, Haque S, Arshad M, Khan RH. Identification and design of antimicrobial peptides for therapeutic applications, *Current Protein and Peptide Science*, 13 (3) 211-223 (2012);

Al-Ghaferi N, Kolodziejek J, Nowotny N, Coquet L, Jouenne T, Leprince J, Vaudry H, King JD, Conlon JM. Antimicrobial peptides from the skin secretions of the south-east asian frog *Hylarana erythraea* (Ranidae). *Peptides*, 31 (4)548–554 (2010);

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410 (1990);

Aronel V, Kader JC. Lipid transfer in plants. *Experientia*, 46 (6) 579-585 (1990);

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25 (17) 3389-3402 (1997);

Aronel VV, Vergnolle C, Cantrel C, Kader J. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 157(1):1-12 (2000);

Assadi-Porter FM, Maillet EL, Radek JT, Quijada J, Markley JL, Max M. Key Amino Acid Residues Involved in Multi-Point Binding Interactions between Brazzein, a Sweet Protein, and the T1R2–T1R3 Human Sweet Receptor. *Journal Molecular Biology*, 398, 584–599 (2010);

Bernfeld P. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods in Enzymology*, 1, 149–158 (1955);

Bernhard WR, Somerville CR. Coidentity of putative amylase inhibitors from barley and finger millet with phospholipid transfer proteins inferred from amino acid sequence homology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 269 (2) 695-697 (1989);



Bernhard WR, Thoma S, Botella J, Somerville CR. Isolation of a cDNA Clone for Spinach Lipid Transfer Protein and Evidence that the Protein Is Synthesized by the Secretory Pathway. *Plant Physiology*, 95, 164-170 (1991);

Blein JP, Coutos-Tahévenot P, Marion D, Ponchet M. From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends in Plant Science*, 7 (7) 293-296 (2002);

Bogdanov IV, Shenkarev ZO, Finkina EI, Melnikova DN, Rumynskiy EI, Arseniev AS, Ovchinnikova TV, A novel lipid transfer protein from the pea *Pisum sativum*: isolation, recombinant expression, solution structure, antifungal activity, lipid binding, and allergenic properties. *BMC Plant Biology*, 16 (1) 107 (2016);

Bradley TM, Hidalgo E, Leautaud V, Ding H, Demple B. Cysteine-to alanine Replacement in the Escherichia coli SoxR Protein and the Role of the [2Fe-2S] Centers in Transcriptional Activation. *Nucleic Acids Research*, 25, 1469–1473 (1997);

Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3 (3) 238–250 (2005);

Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Science Translational Medicine*, 4 (165) (2012);

Cai K, Wang J, Wang M, Zhang H, Wang S, Zhao Y. Molecular cloning, recombinant expression, and antifungal functional characterization of the lipid transfer protein from *Panax ginseng*. *Biotechnology Letters*, 38 (7) 1229-35 (2016);

Cammue BPA, Thevissen K, Hendriks M, Eggermont K, Goderis IJ, Proost P, Van Damme J, Osborn RW, Guerbet F, Kader J-C. A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiology*, 109 (2) 445-455 (1995);

Cao R, Cheng J. Protein single-model quality assessment by feature-based probability density functions. *Scientific Reports*, 6, 23990 (2016);

Cao R, Bhattacharya D, Hou J, Cheng, J. DeepQA: improving the estimation of single protein model quality with deep belief networks. *BMC Bioinformatics*, 17, 495 (2016);

Carvalho AO, Machado OLT, Da Cunha M, Santos IS, Gomes VM. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39 (2) 137-146 (2001);

Carvalho AO, Teodoro DS, Eduardo C, Da Cunha M, Okorokova-Façanha AL, Okorokov LA, Fernandes KV, Gomes VM. Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds. *Physiologia Plantarum*, 22 (3) 328-336 (2004);

Carvalho AO, Souza-Filho GA, Ferreira BS, Branco AT, Araújo IS, Fernandes KVS, Retamal CA, Gomes VM, Cloning and characterization of a cowpea seed lipid transfer protein cDNA: expression analysis during seed development and under fungal and cold stresses in seedlings' tissues. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44 (11-12) 732-742 (2006);

Carvalho AO, Gomes VM. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology - a concise review. *Peptides*, 28 (5) 1144-1153 (2007);

Ciociola T, Giovati L, Conti S, Magliani W, Santinoli C, Polonelli L. Natural and synthetic peptides with antifungal activity. *Future Medicinal Chemistry*, 8 (12) 1413-1433 (2016);

Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*, 20 (1) 45-50 (2004);

Cukuroglu E, Gursoy A, Keskin O. HotRegion: a database of predicted hot spot clusters. *Nucleic Acids Research*, 40, D829-D833 (2012);

Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, Beyermann M, Bienert M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge, *FEBS Letters*. 501 (2-3) 146-150 (2001);

Del Poeta M, Nimrichter L, Rodrigues ML, Luberto C. Synthesis and Biological Properties of Fungal Glucosylceramide, *Public Library of Science Pathogens*, 10 (1) (2014);

Denning DW, Perlin DS, Muldoon EG, Colombo AL, Chakrabarti A, Richardson MD, Sorrell TC. Delivering on antimicrobial resistance agenda not possible without improving fungal diagnostic capabilities. *Emerging Infectious Disease Journal*, 23 (2) 177–183 (2017);

De Samblanx GW, Goderis IJ, Thevissen K, Raemaekers R, Fant F, Borremans F, Acland DP, Osborn RW, Patel S, Broekaert WF. Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. *Journal Biology Chemistry*, 272 (2) 1171-1179 (1997);

Dieryck W, Gautier M-F, Lullien V, Joudrier P. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a lipid transfer protein from wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant Molecular Biology*, 19 (4) 707-709 (1992);

Diz MS, Carvalho AO, Ribeiro SF, Da Cunha M, Beltramini L, Rodrigues R, Nascimento VV, Machado OL, Gomes VM. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel  $\alpha$ -amylase inhibitory properties. *Physiologia Plantarum*, 142 (3) 233-246 (2011);

Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, da Mota VP, Colombo AL. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program, *Public Library Of Science One*, 11 (1) (2016);

Doulliez J-P, Michon T, Elmorjani K, Marion D. Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *Journal of Cereal Science*, 32 (1) 1–20 (2000);

Dubreil L, Gaborit T, Bouchet B, Gallant DJ, Broekaert WF, Quillien L, Marion D. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline- $\alpha$  and puroindoline- $\beta$ ) and non specific lipid transfer protein (ns-LTP1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Science*, 138 (2) 121-135 (1998);

Edstam MM, Viitanen L, Salminen TA, Edqvist J. Evolutionary history of the nonspecific lipid transfer proteins. *Molecular Plant*, 4 (6) 947–964 (2011);

Edstam MM, Viitanen L, Salminen TA, Edqvist J. Evolutionary history of the nonspecific lipid transfer proteins. *Molecular Plant*, 4(6) 947–964 (2014);

Eisenberg D, Lüthy R, Bowie JU. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods of Enzymology*, 277, 396–404 (1997);

Fleming AJ, Mandel T, Hofmann S, Sterk P, Vries SC, Kuhlemeier C. Expression pattern of a tobacco lipid transfer protein gene within the shoot apex. *The Plant Journal*, 2 (6) 855-862 (1992).

Finkina EL, Melnikova DN, Bogdanov IV, Ovchinnikova TV. Lipid transfer proteins as components of the plant innate immune system: structure, functions, and applications, *Acta Naturae*, 8 (2) 47-61(2016);

Grosbois M, Guerbette F, Jolliot A, Quintin F, Kader J-C. Control of Maize Lipid Transfer Protein Activity by Oxido-Reducing Conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids Lipid Metabolism*, 1170, 197–203 (1993);

Han GW, Lee JY, Song HK, Chang C, Min K, Moon J, Shin DH, Kopka M, Sawaya MR, Yuan HS. Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. *Journal of Molecular Biology*, 308 (2) 263-278 (2001);

Heo L, Lee H, Seok C. GalaxyRefineComplex: refinement of protein-protein complex model structures driven by interface repacking. *Scientific Reports*, 6 (1) 32153 (2016);

Jacq A, Pernot C, Martinez Y, Domergue F, Payré B, Jamet E, Burlat V, Pacquit VB. The *Arabidopsis* Lipid Transfer Protein 2 (AtLTP2) Is Involved in Cuticle-Cell Wall Interface Integrity and in Etiolated Hypocotyl Permeability. *Front Plant Science*, 8 (263) (2017);

Jones BL, Marinac LA, Purification, Identification, and partial characterization of a barley protein that inhibits green malt endoproteases, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 55 (2) 58–64 (1997);

Jung HW, Kim W, Hwang BK. Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant, Cell & Environment*, 26 (6) 915-928 (2003);

Kader J. Proteins and the intracellular exchange of lipids: I. stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 380 (1) 31-44 (1975);

Kader JC, Julienne M, Vergnolle C. Purification and characterization of a spinach-leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*, 139 (2) 411-416 (1984);

Kader, J-C. Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47 (1) 627-654 (1996);

Kader, J-C. Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. *Trends in Plant Science*, 2 (2) 66-70 (1997);

Kalla R, Shimamoto K, Potter R, Nielsen PS, Linnestad C, Olsen OA. The promoter of the barley aleurone-specific gene encoding a putative 7 kDa lipid transfer protein confers aleurone cell-specific expression in transgenic rice. *Plant Journal*, 6 (6) 849-860 (1994);

Khersonsky O, Roodveldt C, Tawfik D. Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10 (5) 498–508 (2006);

Kirubakaran SI, Begum SM, Ulaganathan K, Sakthivel N. Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat. *Plant Physiology Biochemistry*, 46 (10) 918–927 (2008);

Kodedová M, Sychrová H. Synthetic antimicrobial peptides of the halictines family disturb the membrane integrity of *Candida* cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1859 1851–1858 (2017);

Koehbach J. Structure-activity relationships of insect defensins. *Frontiers in Chemistry*, 5, 45 (2017);

Kristensen, AK; Brunstedt, J; Nielsen, KK; Roepstorff, P; Mikkelsen, JD. Characterization of a new antifungal non-specific lipid transfer protein (nsLTP) from sugar beet leaves. *Plant Science*, 155 (1) 31-40 (2000);

Landon C, Thouzeau C, Labbé H, Bulet P, Vovelle F. Solution structure of spheniscin, a  $\beta$ -defensin from the penguin stomach. *The Journal Biological Chemistry*, 279 (29) 30433–30439 (2004);

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21)2947-2948 (2007);

Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton, JM. PROCHECK: A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26, 283–291 (1993);

Laskowski RA, Jabłońska J, Pravda L, Vařeková RS, Thornton JM. PDBsum: structural summaries of PDB entries. *Protein Science*, 27 (1) 129–134 (2018);

Lee JY, Min K, Cha H, Shin DH, Hwang KY, Suh SW. Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. *Journal of Molecular Biology*, 276 (2) 437-448 (1998);

Lee SB, Go YS, Bae H-J, Park JH, Cho SH, Cho HJ, Lee DS, Park OK, Hwang I, Suh MC. Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology*, 150 (1) 42-54 (2009);

Li J, Koh JJ, Liu S, Lakshminarayanan R, Verma CS, Beuerman RW. Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design. *Frontiers Neuroscience*, 11, 73 (2017);

Lin K-F, Liu Y-N, Hsu S-TD, Samuel D, Cheng C-S, Bonvin AM, Lyu P-C. Characterization and structural analyses of nonspecific lipid transfer protein 1 from mung bean. *Biochemistry*, 44 (15) 5703-5712 (2005);

Lin K-F, Lee T-R, Tsai P-H, Hsu M-P, Chen C-S, Lyu P-C. Structure-based protein engineering for  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of plant defensin, *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 68 (2) 530–540 (2007);

Liu YJ, Cheng CS, Lai SM, Hsu MP, Chen CS, Lyu PC. Solution Structure of the Plant Defensin VrD1 From Mung Bean and Its Possible Role in Insecticidal Activity Against Bruchids. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 63, 777–786 (2006);

Liu S, Hou Y, Chen X, Gao Y, Li H, Sun S. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. *International Journal Antimicrobial Agents*, 43 (5) 395-402 (2014);

Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, de Bakker PIW, Word JM, Prisant MG, Richardson JS, Richardson, DC. Structure validation by C $\alpha$  Geometry:  $\phi$ , $\psi$  and C $\beta$  deviation. *Proteins Structure Function Bioinformatics*, 50, 437–450 (2003);

Lum KY, Tay ST, Le CF, Lee VS, Sabri NH, Velayuthan RD, Hassan H, Sekaran SD. Activity of Novel Synthetic Peptides against *Candida albicans*. *Scientific Reports*, 5 (9657) (2015);

Maccari G, Di Luca M, Nifosí R, Cardarelli F, Signore G, Boccardi C, Bifone A. Antimicrobial peptides design by evolutionary multi objective optimization, *Public Library of Science Computational Biology*, 9 (9) e1003212 (2013);

Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ, Cameron RK. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 419 (6905) 399-403 (2002);

Malhotra S, Mathew OK, Sowdhamini R. DOCKSCORE: a webserver for ranking protein-protein docked poses. *BMC Bioinformatics*, 16 (1) 127 (2015);

Manavalan B, Lee J. SVMQA: support–vector-machine-based protein single-model quality assessment. *Bioinformatics*, 33 (16), 2496–2503 (2017);

Matsuura, Y. A Possible Mechanism of Catalysis Involving Three Essential Residues in the Enzymes of  $\alpha$ -Amylase Family. *Biologia Bratislava*, 57, 21–27 (2002);

Meireles LMC, Dömling, AS, Camacho CJ. ANCHOR: a web server and database for analysis of protein-protein interaction binding pockets for drug discovery *Nucleic Acids Research*, 38, W407–W411 (2010);

Melquiond ASJ, van Dijk M, de Vries SJ, Bonvin AMJJ. The HADDOCK2.2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *Journal of Molecular Biology*, 428 (4), 720–725 (2016);

Moal IH, Jiménez-García B, Fernández-Recio J. CCharPPI web server: computational characterization of protein-protein interactions from structure. *Bioinformatics*, 31 (1) 123–125 (2015);

Molina A, García-Olmedo F. Developmental and pathogen-induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. *The Plant Journal*, 4 (6) 983-991(1993);

Moreira IS, Koukos PI, Melo R, Almeida JG, Preto AJ, Schaarschmidt J, Trellet M, Gümüş ZH, Costa J, Bonvin AMJJ. SpotOn: high accuracy identification of protein protein interface hot-spots. *Scientific Reports*, 7, 8007 (2017);

Morton RL, Schroeder HE, Bateman KS, Chrispeels MJ, Armstrong E, Higgins TJV. Bean  $\alpha$ -Amylase Inhibitor 1 in Transgenic Peas (*Pisum sativum*) Provides Complete Protection from Pea Weevil (*Bruchus pisorum*) under Field Conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 97, 3820–3825 (2000);

Nobeli I, Favia AD, Thornton JM. Protein promiscuity and its implications for biotechnology, *Nature Biotechnology*, 27 (2) 157–167 (2009);

Odintsova T, Egorov T. Plant antimicrobial peptides. In: (Ed.). *Plant Signaling Peptides*: Springer, 107-133 (2012);

Olechnovič K, Venclovas Č. VoroMQA: assessment of protein structure quality using interatomic contact areas. *Proteins Structure Function Bioinformatics*, 85, 1131–1145 (2017);

Okada Y, Iimure T, Takoi K, Kaneko T, Kihara M, Hayashi K, Ito K, Sato K, Takeda K. The Influence of Barley Malt Protein Modification on Beer Foam Stability and Their Relationship to the Barley Dimeric  $\alpha$ -Amylase Inhibitor-I (BDAI-I) as a Possible Foam-Promoting Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1458–1464 (2008);

Pereira PJ, Lozanov V, Patthy A, Huber R, Bode W, Pongor S, Strobl S. Specific Inhibition of Insect  $\alpha$ -Amylases: Yellow Meal Worm  $\alpha$ -Amylase in Complex with the Amaranth  $\alpha$ -Amylase Inhibitor at 2.0 Å Resolution. *Structure*, 7, 1079–1088 (1999);

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin, T. E.



UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal Computational Chemistry*, 25 (13) 1605–1612 (2004);

Porto WF, Irazazabal L, Alves ESF, Ribeiro SM, Matos CO, Pires ÁS, Fensterseifer ICM, Miranda VJ, Haney EF, HumbloVT, Torres MDT, Hancock REW, Liao LM, Ladram A, Lu TK., De La Fuente-Nunez C, Franco OL, *In silico* optimization of a guava antimicrobial peptide enables combinatorial exploration for peptide design, *Nature Communications*, 9 (1) (2018);

Pyee J, Yu H, Kolattukudy P. Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of Broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 311(2) 460-468 (1994);

Regente MC, De La Canal L. Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiologia Plantarum*, 110 (2) 158-163 (2000);

Regente MC, Giudici AM, Villalain J, de Canal L. The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells, *Letters in Applied Microbiology*, 40 (3) 183–189 (2005);

Romestand B, Molina F, Richard V, Roch P, Granier C. Key Role of the Loop Connecting the Two Beta Strands of Mussel Defensin in Its Antimicrobial Activity. *European Journal of Biochemistry*, 270, 2805–2813 (2003);

Rothstein DM, Spacciapoli P, Tran LT, Xu T, Roberts FD, Dalla Serra M, Buxton DK, Oppenheim FG, Friden P. Anticandida activity is retained in P-113, a 12- amino-acid fragment of histatin 5. *Antimicrobial Agents Chemother*, 45 (5) 1367-1373 (2001);

Roy-Barman S, Sautter C, Chatoob BB. Expression of the lipid transfer protein Ace-AMP1 in transgenic wheat enhances antifungal activity and defense responses. *Transgenic Research*, 15 (435) (2006);

Safi H, Saibi W, Alaoui MM, Hmyene A, Masmoudi K, Hanin M, Brini F. A wheat lipid transfer protein (TdLTP4) promotes tolerance to abiotic and biotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology Biochemistry*, 89, 64-75 (2015);

Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(8) 2404-2412 (2003);

Salcedo, G; Sanchez-Monge, R; Barber, D; Diaz-Perales, A. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771 (6) 781-791 (2007);

Salminen TA, Blomqvist K, Edqvist J. Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. *Planta*, 244 (5) 971-997 (2016);

Šali A, Blundell TL. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234, 779–815 (1993);

Salminen T, Eklund D, Joly V, Blomqvist K, Matton D, Edqvist J, Deciphering the evolution and development of the cuticle by studying lipid transfer proteins in mosses and liverworts, *Plants* 7 (1) 6 (2018);

Samuel D, Liu Y-J, Cheng C-S, Lyu P-C. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *Journal of Biological Chemistry*, 277 (38) 35267-35273 (2002);

Sarowar S, Kim YJ, Kim KD, Hwang BK, Ok SH, Shin JS. Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco. *Plant Cell Reports*, 28, 419–427(2009);

Sawano Y, Hatano K. -I, Miyakawa T, Komagata H, Miyauchi Y, Yamazaki H., Tanokura M. Proteinase inhibitor from ginkgo seeds is a member of the plant nonspecific lipid transfer protein gene family. *Plant Physiology*, 146 (4) 1909–1919 (2008);

Schaaper, WMM, Posthuma GA, Plasman, HH, Sijtsma L, Fant F, Borremans FAM, Thevissen K, Broekaert WF, Meloen RH, van Amerongen A. Synthetic Peptides Derived from the  $\beta$ 2- $\beta$ 3 Loop of *Raphanus sativus* Antifungal Protein 2 that Mimic the Active Site. *The Journal of Peptide Research*, 57, 409–418 (2001);

Schmidtchen A, Pasupuleti M, Malmsten M. Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. *Advances in Colloid and Interface Science*, 205, 265–274 (2014);

Schweiger W, Steiner B, Ametz C, Siegwart G, Wiesenberger G, Berthiller F, Lemmens M, Jia H, Adam G, Muehlbauer GJ, Kreil DP, Buerstmayr H. Transcriptomic characterization of two major *Fusarium* resistance quantitative trait loci (QTLs), *Fhb1* and *Qfhs.ifa-5A*, identifies novel candidate genes. *Molecular Plant Pathology*, 14 (8) 772–785 (2013);

Segura A, Moreno M, García-Olmedo F. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. *FEBS Letters*, 332 (3) 243-246 (1993);

Shin DH, Lee JY, Hwang KY, Kyu Kim K, Suh SW. High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure*, 3 (2) 189-199 (1995);

Sievers F, Wilm, A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. Fast, Scalable Generation of High-Quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 539 (2011);

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (2) 288-305 (2011);

Skriver K, Leah R, Müller-Uri F, Olsen F-L, Mundy J. Structure and expression of the barley lipid transfer protein gene *Ltp1*. *Plant Molecular Biology*, 18 (3) 585-589 (1992).

Sodano P, Caille A, Sy D, De Person G, Marion D, Ptak M. NMR and fluorescence studies of the complexation of DMPG by wheat non-specific lipid transfer protein. Global fold of the complex. *FEBS Letters*, 416 (2) 130-134 (1997);

SohaL AK, Love AJ, Cecchini E, Covey, SN; Jenkins, GI; Milner, JJ. Cauliflower mosaic virus infection stimulates lipid transfer protein gene expression in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 50 (341) 1727-1733 (1999);

Sukhwai A, Sowdhamini R. PPCheck: a webserver for the quantitative analysis of protein-protein interfaces and prediction of residue hotspots. *Bioinformatics and Biology Insights*, 9, 141-151 (2015);

Sun J-Y, Gaudet D A, Lu Z-X, Frick M, Puchalski B, Laroche A. Characterization and Antifungal Properties of Wheat Nonspecific Lipid Transfer Proteins, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21 (3) 346–360 (2008);

Svensson, B; Asano, K; Jonassen, I; Poulsen, FM; Mundy, J; Svendsen, I. A 10 kD barley seed protein homologous with an  $\alpha$ -amylase inhibitor from Indian finger millet. *Carlsberg Research Communications*, 51 (7) 493-500 (1986);

Tam JP, Lu Y-A, Yang J-L. Correlations of cationic charges with salt sensitivity and microbial specificity of cystine-stabilized  $\beta$ -strand antimicrobial peptides, *Journal Biology Chemistry*, 277 (52) 50450–50456 (2002);

Tapia G, Morales-Quintana L, Parra C, Berbel A, Alcorta M. Study of nsLTPs in *Lotus japonicus* genome reveal a specific epidermal cell member (*LjLTP10*) regulated by drought stress in aerial organs with a putative role in cutin formation. *Plant Molecular Biology*, 82 (4-5) 485-501 (2013);

Tassin S, Broekaert WF, Marion D, Acland DP, Ptak M, Vovelle F, Sodano P. Solution structure of *Ace*-AMP1, a potent antimicrobial protein extracted from onion seeds. Structural analogies with plant nonspecific lipid transfer proteins. *Biochemistry* 37 (11) 3623–3637 (1998);

Terras FR, Goderis IJ, Van Leuven F, Vanderleyden J, Cammue B P, Broekaert WF. *In vitro* antifungal activity of a radish (*Raphanus sativus* L.) seed protein homologous to nonspecific lipid transfer proteins. *Plant Physiology*, 100 (2) 1055-1058 (1992);

Thevissen K, Ferket KK, François IE, Cammue BP. Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components, *Peptides*, 24 (11) 1705–1712 (2003);

Thevissen K, Warnecke DC, François IE, Leipelt M, Heinz E, Otto C, Zähringer U, Thomma BP, Ferket KK, Cammue BP. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (6) 3900–3905 (2003);

Thoma S, Kaneko Y, Somerville C. A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein. *The Plant Journal*, 3 (3) 427-436 (1993);

Torchala M, Moal IH, Chaleil RAG, Fernandez-Recio J, Bates PA. SwarmDock: a server for flexible protein–protein docking. *Bioinformatics*, 29 (6) 807–809 (2013);

Tormo, MA, Gil-Exojo I, de Tejada AR, Campillo JE. Hypoglycaemic and Anorexigenic Activities of an  $\alpha$ -Amylase Inhibitor from White Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar Rats. *British Journal Nutrition*, 92, 785–790 (2004);

Tormo MA, Gil-Exojo I, de Tejada AR, Campillo JE. White Bean Amylase Inhibitor Administered Orally Reduces Glycaemia in Type 2 Diabetic Rats. *British Journal Nutrition*, 96, 539–544 (2006);

Tsuboi S, Osafune T, Tsugeki R, Nishimura M, Yamada M. Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells: subcellular localization and a possible role in lipid metabolism. *Journal of Biochemistry*, 111 (4) 500-508 (1992);

Uchôa HB, Jorge GE, Freitas Da Silveira NJ, Camera,JC, Canduri F, De Azevedo WF. Parmodel: a Web Server for Automated Comparative Modeling of Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325, 1481–1486 (2004);

Udani J, Hardy M, Madsen DC. Blocking Carbohydrate Absorption and Weight Loss: A Clinical Trial Using Phase 2 Brand Proprietary Fractionated White Bean Extract. *Alternative Medicine Review*, 9, 63–69 (2004);

Uziela K, Hurtado DM, Shu N, Wallner B, Elofsson A. ProQ3D: improved model quality assessments using deep learning. *Bioinformatics*, 33 (10) 1578-1580 (2017),

van der Rest ME, Kamminga AH, Nakano A, Anraku Y, Poolman B, Konings WN. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis, *Microbiology Reviews*, 59 (2) 304-322 (1995);

Vangone A, Bonvin AMJJ. Contacts-based prediction of binding affinity in protein–protein complexes. *Elife*, 4, e07454 (2015);

Van Nierop SNE, Evans DE, Axcell BC, Cantrell IC, Rautenbach M. Impact of Different Wort Boiling Temperatures on the Beer Foam Stabilizing Properties of Lipid Transfer Protein 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3120–3129 (2004);

van Zundert GCP, Rodrigues JPGLM, Trellet M, Schmitz C, Kastiris PL, Karaca E, Melquiond ASJ, van Dijk M, de Vries SJ, Bonvin AMJJ. The HADDOCK2.2 WEB Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *Journal Molecular Biology*, 428 (4) 720-725 (2015);

Velazhahan R, Radhajeyalakshmi R, Thangavelu R, Muthukrishnan S. An antifungal protein purified from pearl millet seeds shows sequence homology to lipid transfer proteins. *Biologia Plantarum*, 44 (3) 417-421 (2001);

Vieira-Silva FC, do Nascimento VV, Fernandes KV, Machado OLT, Pereira LS, Gomes VM, Carvalho AO. Recombinant production and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of the lipid transfer protein from *Vigna unguiculata* (L. Walp.) seeds. *Process Biochemistry*, 65, 205–212 (2018);

Vieira-Silva FC, Nascimento VV, Machado OLT, Pereira LS, Gomes VM, Carvalho AO, Insight of the  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of plant lipid transfer proteins. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58 (11) 2294-2304 (2018);

Wang C, Xie W, Chi F, Hu W, Mao G, Sun D, Li C, Sun Y. BcLTP, a novel lipid transfer protein in *Brassica chinensis*, may secrete and combine extracellular CaM. *Plant Cell Reports*, 27 (1) 159-169 (2008);

Wang G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides, *Methods in Molecular Biology*, 126843-66 (2015);

Wang N-J, Lee C-C, Cheng C-S, Lo W-C, Yang Y-F, Chen M-N, Lyu P-C. Construction and analysis of a plant non-specific lipid transfer protein database (nsLTPDB). *BMC Genomics* 13 (S9) (2012);

Wang SY, Wu JH, Ng T, Ye XY, Rao PF. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides*, 25 (8) 1235-1242 (2004);

Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35, W407–W410 (2007);

Wiegand G, Epp O, Huber R. The Crystal Structure of Porcine Pancreatic  $\alpha$ -Amylase in Complex with the Microbial Inhibitor Tendamistat. *Journal of Molecular Biology*, 247, 99–110 (1995);

Wilmes M, Cammue BP, Sahl HG, Thevissen K. Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. *Natural Product Reports*, 28 (8) 1350 (2011);

Wiradharma N, Khoe U, Hauser CA, Seow SV, Zhang S, Yang YY. Synthetic cationic amphiphilic  $\alpha$ -helical peptides as antimicrobial agents. *Biomaterials*, 32 (8) 2204–2212 (2011);

Xiong P, Zhang C, Zheng W, Zhang Y. BindProfX: assessin mutation induced binding affinity change by protein interface profiles with pseudo-counts. *Journal of Molecular Biology*, 429, 426–434 (2017);

Xu D, Zhang Y. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophysical Journal*, 101 (10), 2525–2534 (2011);

Xue LC, Rodrigues JP, Kastiris PL, Bonvin AM, Vangone A. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes. *Bioinformatics*, 32 (23) 3676–3678 (2016);

Yan Y, Zhang D, Zhou P, Li B, Huang S-Y. HDOCK: a web server for protein–protein and protein–DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Research*, 45, W365–W373 (2017);

Yeats TH, Rose JK. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science*, 17 (2) 191–198 (2008);

Yu YG, Chung CH, Fowler A, Suh SW. Amino Acid Sequence of a Probable Amylase/Protease Inhibitor from Rice Seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 265, 466–475 (1988);

Zachowski A, Guerbette F, Grosbois M, Jolliot-Croquin A, Kader J-C. Characterisation of Acyl Binding by a Plant Lipid- Transfer Protein. *European Journal of Biochemistry*, 257, 443–448

(1998). Kline AD, Braun W, Wüthrich K. Studies by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance and distance geometry of the solution conformation of the  $\alpha$ -amylase inhibitor tendamistat. *Journal of Molecular Biology*, 189, 377–382 (1986);

Zawistowska U, Langstaff J, Bushuk W. Improving effect of a natural  $\alpha$ -amylase inhibitor on the baking quality of wheat flour containing malted barley flour. *Journal of Cereal Science*, 8 (2) 207-209 (1988);

Zhang Z, Zhu S, Functional role of charged residues in drosomycin, a *Drosophila* antifungal peptide, *Developmental & Comparative Immunology*, 34 (9) 953–958 (2010);

Zhu X, Li Z, Xu H, Zhou M, Du L, Zhang Z. Overexpression of wheat lipid transfer protein gene TaLTP5 increases resistances to *Cochliobolus sativus* and *Fusarium graminearum* in transgenic wheat. *Functional & integrative genomics*, 12 (3) 481-488 (2012);

Zottich U, Da Cunha M, Carvalho AO, Dias GB, Silva N, Santos IS, Do Nascimento VV, Miguel EC, Machado OL, Gomes VM. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with  $\alpha$ -amylase inhibitor properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810 (4) 375-383 (2011);

Zuza-Alves DL, Silva-Rocha WP, Chaves GM. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 13 (8) 1927 (2017).