

RODRIGO KAZUO MAKIYAMA

**Clonagem, expressão e purificação da proteína rgs-CaM,
uma calmodulina supressora de silenciamento por RNA**

Botucatu-SP

2009

RODRIGO KAZUO MAKIYAMA

**Clonagem, expressão e purificação da proteína rgs-CaM,
uma calmodulina supressora de silenciamento por RNA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista - Campus
de Botucatu (SP), para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Orientador: Dr. Antonio Sergio Kimus Braz

Co-orientador: Dr. Ivan de Godoy Maia

Botucatu-SP

2009

Dedico essa dissertação a vocês:

mãe, pai, Fernando e Marcelo

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Dr. Antonio Sergio Kimus Braz, pela orientação;
- Ao professor Dr. Ivan de Godoy Maia, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto;
- Ao grupo de pesquisa do professor Dr. Marcos Fontes: Agnes, Pituta e Flávia, pela colaboração;
- Ao grupo de pesquisa da professora Dra. Maria Isabel Cano: Arina, Camila, Marcelo e Rita, pelas ajudas cedidas;
- Ao grupo de pesquisa do professor Dr. Celso Luiz Marino, pelo sequenciamento das amostras;
- Aos companheiros e ex-companheiros de laboratório: Adriana, Akemi, Alessandra, Ana Teresa, Bob, Bonsai, Cíntia, Débora, Edmárcia, Fabio, Juliana, Layra, Negin, Pelet e Regiane, pela ajuda e companheirismo;
- A Carol, pelo companheirismo, ajuda e paciência;
- Aos amigos e companheiros de república: Dyeno, Gamba, Rafael e Sabor, pelos bons momentos vividos em Botucatu;
- À CAPES, pelo apoio financeiro
- À Universidade Estadual Paulista, pela sua estrutura e oportunidade;
- Ao LNLS (Campinas - SP), pela utilização do aparelho espectropolarímetro JASCO J-810;
- Enfim a todos que contribuíram para realização deste trabalho;

RESUMO

O silenciamento por RNA é um sistema conservado de resposta a moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) presente em todos eucariontes, que desempenha papéis fundamentais como a regulação da expressão gênica, resistência a vírus e controle da transposição de elementos móveis. Porém proteínas de diferentes origens, viral ou endógena, são capazes de suprimir o silenciamento por RNA, e o mecanismo de ação dessas proteínas não é totalmente compreendido. Um desses supressores endógenos é uma proteína do tipo calmodulina denominada rgs-CaM (regulator of gene silencing CaM) que foi identificada em plantas de tabaco. Calmodulinas são proteínas que desempenham papéis importantes na sinalização de cálcio em células eucarióticas e regulam a atividade de inúmeras proteínas com diversas funções celulares. Até hoje, entretanto, muito pouco se sabe sobre as características estruturais e propriedades regulatórias da rgs-CaM. Pensando nisso, o presente estudo teve como objetivo amplificar e clonar a região codificadora da proteína supressora rgs-CaM de *Nicotiana tabacum*, realizar a expressão da proteína rgs-CaM, avaliar a solubilidade da proteína recombinante em diferentes condições, purificar a proteína recombinante e determinar as suas propriedades estruturais. Para tal, a região codificadora da rgs-CaM de tabaco foi amplificada e clonada no vetor de expressão pMal-c2E e transferida para as células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) Rosetta, visando a expressão de grandes quantidades de proteína recombinante solúvel. A proteína de fusão MBP:rgs-CaM expressa foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando coluna de afinidade (amilose) e analisada por DLS. A proteína purificada formou agregados de alto peso molecular com elevada polidispersividade em diferentes condições (temperatura, pH e concentração de sal). No entanto, na presença de detergentes como o Tween 20, os agregados foram desfeitos e a polidispersividade reduzida para níveis aceitáveis para fins de cristalização. As análises de CD empregando a proteína rgs-CaM fusionada a MBP evidenciaram um alto conteúdo de alfa-hélices, e na presença de 1mM de EGTA, observou-se uma mudança de espectro, sugerindo perdas estruturais de alfa-hélices, provavelmente pela remoção de íons Ca^{2+} da estrutura da proteína.

Palavras-chave: supressão de silenciamento por RNA, rgs-CaM, expressão de proteína, dicroísmo circular (CD), espalhamento dinâmico de luz (DLS)

ABSTRACT

RNA silencing is a conserved mechanism activated by double-stranded RNA molecules (dsRNA) present in all eukaryotes, which plays essential roles in the regulation of the gene expression, in host resistance to viruses and control of transposition of transposons. However proteins from different sources, viral or endogenous, are able to suppress the silencing by RNA, and the mechanism of action of these proteins is not fully understood. One of these endogenous suppressor is a calmodulin-like protein (CaM) called rgs-CaM (regulator of gene silencing CaM) that was identified in tobacco plants. Calmodulins are proteins that play important roles in calcium signaling in eukaryotic cells and regulate the activity of numerous proteins with diverse cellular functions. Until today, however, very little is known about the structural features and regulatory properties of the rgs-CaM. Thinking about it, the present study aimed to amplify and clone the coding region of the suppressor protein rgs-CaM from *Nicotiana tabacum*, to make the expression of rgs-CaM protein, to evaluate the solubility of the recombinant protein under different conditions, to purify the recombinant protein and determine their structural properties. To this end, the coding region of rgs-CaM of tobacco was amplified and cloned in the expression vector pMal-c2E and transferred to the cells of *Escherichia coli* BL21 (DE3) Rosetta, aim expression of large quantities of soluble recombinant protein. The fusion protein was purified by affinity chromatography using affinity column (amylose) and analyzed by DLS. The purified protein formed aggregates of high molecular weight with elevated polydispersity at different conditions (temperature, pH and salt concentration). However, in the presence of detergents such as Tween 20, aggregates were undone and the polydispersity reduced to acceptable levels for crystallization purposes. CD analysis of the rgs-CaM protein fused to MBP showed a high content of α -helix, and in the presence of 1mM EGTA, a change of the spectrum was observed, suggesting loss of structural α -helix, probably by removing Ca^{2+} ions of protein structure.

Keywords: RNA silencing supressor, rgs-CaM, protein expression, dynamic light scattering (DLS), circular dichroism (CD)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[] concentração
 [θ]: elipsidade molar;
 μg - micrograma
 μl – microlitro
 aa - aminoácido
 ATP – Adenosina Tri-fosfato
 Blast – “Basic Local Alignment Search Tool”
C. elegans - *Caenorhabditis elegans*
 Ca - cálcio
 CaMs - calmodulinas
 CD (circular dichroism) - Dicroísmo Circular
 cDNA – DNA complementar
 CHS- chalcona sintetase
 cm – centímetro
 DLS (dynamic light scattering) - espalhamento dinâmico de luz
 DNA – ácido desoxirribonucléico
 dsRNA (double-stranded RNA) - RNA de fita dupla
E. coli – *Escherichia coli*
 EGTA - Ácido Etileno Glicol Tetracético
 Expassy – “Expert Protein Analysis System”
 g - gravidade
 GAD - glutamato decarboxylase
 HCl – ácido clorídrico
 HC-Pro – “Helper Component Proteinase”
 HEPES – 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinaetanosulfônico
 HPLC (High-performance liquid chromatography) – cromatografia líquida de alta performance
 IPTG – Isopropyl β-D-thio-galactopyranoside
 K - potássio
 kDa (kilodalton) – quilodalton
 L - caminho óptico da cubeta
 LB – Luria Bertani
 MBP - maltose-binding-protein
 mdeg – millidegrees
 MES - 2-(N-morfolino) ácido etanosulfônico
 mg – miligrama
 min - minuto
 miRNAs - microRNAs
 ml – mililitro
 mm – milímetro
 MRE - média da elipsidade residual
 MW-R - massa molecular
N. benthamiana - *Nicotiana benthamiana*
 NaCl - cloreto de sódio
 NCBI - “National Center for Biotechnology Information”
 ng – nanograma

nm – nanômetro
NR - número de aminoácidos
nts - nucleotídeos
°C - grau Celsius
pb - par de base
PCR (Polimerase Chain Reaction) – reação de polimerase em cadeia
Pd - polidispersividade
Pfu - *proofreading*
pH – potencial hidrogeniônico
pI - ponto isoelétrico
PM - peso molecular em Daltons
pmoles - picomoles
PMSF – Fluoreto fenilmetilsulfonil
pri-miRNA - transcritos primários de RNA
PTGS (posttranscriptional gene silencing) - silenciamento gênico pós-transcricional
PVX (potato virus x) – vírus x de batata
RdRP (RNA-dependent RNA polymerase) - RNA polimerase dependente de RNA
rgs-CaM – “regulator of gene silencing CaM”
Rh – raio hidrodinâmico
RISC (RNA-induced silencing complex) - complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA - ácido ribonucléico
RNAi (RNA interference) - interferência por RNA
RNase – ribonuclease
RNPs - ribonucleoproteínas
rpm - rotações por minuto
RT-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction) - transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SCOP - Structural Classification of Protein
SDN - SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE
SDS - duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecil sulfato de sódio
siRNAs (small interfering RNAs) - pequenos RNAs de interferência
SOPM – “Self-Optimized Prediction Method”
ssRNAs (single stranded RNA) - pequenos RNAs fita simples
TECEP - Tris carboxyethyl phosphine
u – unidade
UV – ultravioleta
Kb (kilobase) - quilobase

SUMÁRIO

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de abreviaturas e siglas.....	v
I. INTRODUÇÃO.....	08
I.1 Silenciamento por RNA.....	08
I.2 O mecanismo de silenciamento por RNA.....	09
I.3 Resposta evolutiva dos vírus ao Silenciamento por RNA.....	12
I.3.1 A proteína viral HC-Pro.....	13
I.4 Supressores endógenos de silenciamento por RNA.....	16
I.5 As Calmodulinas.....	18
I.6 A proteína rgs-CaM.....	22
II. OBJETIVOS.....	24
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
III.1 Amplificação da região codificadora da rgs-CaM por RT-PCR.....	25
III.2 Clonagem do cDNA em vetores de expressão bacteriano.....	26
III.3 Sequenciamento do plasmídeo recombinante.....	27
III.4 Indução da expressão da rgs-CaM em <i>Escherichia coli</i>	27
III.5 Testes de solubilidade da proteína recombinante.....	28
III.6 Indução em larga escala para purificação protéica.....	29
III.7 Purificação da proteína de fusão pelo método de cromatografia de afinidade usando resina de amilose.....	29
III.8 Quantificação da Proteína Recombinante MBP:rgs-CaM.....	30
III.9 Ensaio de espalhamento dinâmico de luz (DLS)	30
III.10 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD).....	31
III.11 Predição <i>in silico</i> da estrutura secundária.....	31
IV RESULTADOS.....	33
IV.1 Amplificação da região codificadora da proteína rgs-CaM.....	33
IV.2 Clonagem da rgs-CaM em vetor pMAL-c2E.....	33
IV.3 Sequenciamento do plasmídeo recombinante	34
IV.4 Indução da expressão da proteína rgs-CaM recombinante (MBP:rgs-CaM).....	35
IV.5 Análise do teste de solubilidade para purificação da proteína.....	36
IV.6 Purificação da MBP:rgs-CaM.....	36
IV.7 Análise das propriedades físicas por DLS	37
IV.8 Análise de Dicroísmo Circular da proteína MBP:rgs-CaM.....	39
IV.9 Predição <i>in silico</i> da estrutura secundária.....	41
V. DISCUSSÃO.....	43
VI. CONCLUSÕES.....	46
VII. PERSPECTIVAS.....	47
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

I. INTRODUÇÃO

I.1 Silenciamento por RNA

O termo “silenciamento por RNA” refere-se a um mecanismo de regulação da expressão gênica a nível transcricional e pós-transcricional, altamente conservado em eucariontes, que consiste na degradação sequência-específica de genes homólogos em resposta a moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA) (Sarmiento *et al.*, 2006; Ding & Voinnet, 2007; Nowotny & Yang, 2009; Padmanabhan *et al.*, 2009). O silenciamento por RNA foi primeiramente observado por dois grupos independentes (Napoli *et al.*, 1990; Van Der Krol *et al.*, 1990). Estes pesquisadores tinham por objetivo superexpressar a chalcona sintetase (CHS), enzima que participa da via de biossíntese de antocioninas proporcionando uma pigmentação púrpura mais intensa para flores de petúnia, porém observaram perda parcial ou total da pigmentação. O fenômeno foi denominado co-supressão, pois a introdução de um transgene levou ao silenciamento simultâneo do próprio transgene e do gene endógeno homólogo (Napoli *et al.*, 1990; Van Der Krol *et al.*, 1990). Posteriormente descoberto em diferentes organismos modelo, este fenômeno recebeu diferentes denominações dependendo do organismo onde foi encontrado: PTGS (post transcriptional gene silencing) em plantas; “quelling” em fungos, e RNAi (RNA interference) em animais e eucariontes inferiores. Entretanto, todos esses fenômenos passaram a ser chamados simplesmente de silenciamento por RNA (Kooter *et al.*, 1999; Li & Ding, 2001; Matzke *et al.*, 2001; Vaucheret *et al.*, 2001; Waterhouse *et al.*, 2001; Hannon, 2002; Plasterk, 2002; Volpe *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003). O silenciamento por RNA desempenha papéis fundamentais em diferentes processos biológicos essenciais como, por exemplo: resistência a vírus, controle da transposição de elementos móveis, regulação da expressão gênica, formação de heterocromatina e

silenciamento do centrômero (Hannon, 2002; Provost *et al.*, 2002; Dawe, 2003; Matzke & Matzke, 2003).

Nesse sistema, a presença de moléculas de dsRNA ativa uma série de eventos que culmina, entre outros efeitos, na degradação das moléculas de RNA homólogas ao dsRNA ativador. De forma geral, essas respostas fazem parte de mecanismos de resposta contra vírus, sendo algumas delas comuns a todos os eucariontes (Hannon, 2002). A ativação dos mecanismos de resposta antiviral nestas células como resultado da presença de moléculas de dsRNA deve-se ao fato de tais moléculas serem, em sua maioria, de origem viral. Entretanto, cada vez mais é relatado na literatura a presença de RNAs de fita dupla endógenos em eucariontes, conhecidos como microRNAs (miRNAs), que ativam o silenciamento e atuam na regulação de diversos genes endógenos (Kumar & Carmichael, 1998; Waterhouse *et al.*, 2001; Hannon, 2002; Lu *et al.*, 2005; Rajagopalan *et al.*, 2006; Kasschau *et al.*, 2007).

I.2 O mecanismo de silenciamento por RNA

A grande especificidade de reconhecimento das seqüências alvo é uma das características que mais se destaca no silenciamento por RNA. Tal especificidade é fornecida por pequenos RNAs anti-senso (ssRNAs), produzidos a partir das moléculas de dsRNA ativador, que podem formar um duplex com a molécula de RNA alvo (Dougherty & Parks, 1995; Sijen *et al.*, 1996; Hamilton & Baulcombe, 1999; Waterhouse *et al.*, 2001; Hannon, 2002). O silenciamento pode ser dividido em duas fases: iniciação e efetora (Coller & Parker, 2005).

Na fase de iniciação, a molécula de dsRNA é processada por uma RNase do tipo III denominada Dicer que produz, dependendo da isoforma, dsRNAs de ~21 ou ~24 nucleotídeos (nts), denominados pequenos RNAs de interferência (siRNAs) (Hammond *et al.*, 2000;

Zamore *et al.*, 2000; Bernstein *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2003). Esses últimos apresentam uma estrutura molecular muito bem definida: um grupo fosfato na extremidade 5' e dois nucleotídeos protuberantes na extremidade 3'. A enzima Dicer apresenta diferentes homólogos em diferentes espécies (Sledz & Williams, 2005; Shrey *et al.*, 2009). Os animais geralmente codificam uma única Dicer, a qual é capaz de gerar várias classes de pequenos RNAs, exceção feita a *C. elegans* e *Drosophila*, na qual duas Dicers são codificadas (Sledz & Williams, 2005; Shrey *et al.*, 2009). Esta enzima possui um domínio RNA helicase capaz de desenovelar os siRNAs formando pequenos RNAs de fita simples (ssRNAs) com ~21 nts (Sledz & Williams, 2005; Shrey *et al.*, 2009).

Na fase efetora, os ssRNAs são preferencialmente transferidos para uma endoribonuclease, denominada Slicer, que é responsável pela clivagem do RNA alvo e parte integrante de um complexo enzimático denominado *complexo de silenciamento induzido por RNA* (RISC) (Hammond *et al.*, 2000). Cabe ressaltar que nesta etapa apenas uma das fitas (anti-senso) será utilizada como guia e adicionada ao complexo RISC. A outra fita (senso), denominada passageiro, será clivada pelas proteínas Argonaute presentes no complexo (Matranga *et al.*, 2005). Uma proteína denominada R2D2, que é acoplada a Dicer, apresenta um papel crucial nesta etapa, sendo responsável por discriminar qual das duas fitas do siRNA será a fita guia (antisenso) para o silenciamento gênico (Tomari *et al.*, 2004). A fita incorporada será aquela cujo terminal 5' se complementa com menor energia específica ao terminal 3' da fita complementar. A fita guia orienta o complexo RISC para que o mesmo seja capaz de encontrar moléculas de RNA totalmente complementares a ela (alvo), determinando assim a sua degradação (Hutvagner & Zamore, 2002). A formação deste complexo é dependente de ATP (Nykanen *et al.*, 2001), e diferentes atividades estão associadas: helicase, exonuclease e endonuclease (Nykanen *et al.*, 2001; Sledz & Williams, 2005). Todas essas são

essenciais para perfeito funcionamento do mecanismo de silenciamento gênico (Nykanen *et al.*, 2001; Sledz & Williams, 2005).

Uma das características do silenciamento de RNA é seu caráter sistêmico. Em plantas e *C. elegans* a ativação do silenciamento por RNA em uma área localizada, leva a degradação sequência específica de transcritos em tecidos situados fora da zona inicial de ativação (Palauqui *et al.*, 1997; Voinnet *et al.*, 1998; Winston *et al.*, 2002). Em plantas acredita-se que uma molécula sinalizadora com a capacidade de se difundir de célula-a-célula via plasmodesmas, e a longa distância através do floema, seja capaz de intermediar a propagação do sinal de silenciamento por toda planta (Lucas *et al.*, 2001; Klahre *et al.*, 2002; Mlotshwa *et al.*, 2002; Himber *et al.*, 2003; Mallory *et al.*, 2003).

Outra classe já mencionada de pequenos RNAs regulatórios, os microRNAs (miRNAs), distingue-se dos siRNAs pela sua biogênese, muito embora também regulem negativamente mRNAs alvos e compartilhem a via de silenciamento gênico (Bartel, 2004). Os miRNAs são processados a partir de transcritos endógenos que não codificam proteínas e possuem como alvo mRNAs endógenos. A maturação dos miRNAs acontece em duas etapas e em dois compartimentos celulares diferentes. No núcleo ocorre a formação dos transcritos primários (pri-miRNA) que possuem uma estrutura secundária típica em forma de grampo. Uma RNase do tipo III nuclear denominada Drosha cliva esta estrutura secundária para formar um pré-miRNA, que é transportado do núcleo para o citoplasma por intermédio da Exportina-5 (Lee *et al.*, 2003). Em uma segunda etapa citoplasmática, o pré-miRNA é agora transferido para a Dicer para gerar RNAs de fita dupla de 22 nts, os miRNA maduros. Estes agora estão aptos para guiar o complexo RISC até as moléculas de mRNA homólogas (Hammond, 2006).

I.3 Resposta evolutiva dos vírus ao Silenciamento por RNA

Apesar das plantas e demais eucariontes apresentarem o silenciamento por RNA como mecanismo de defesa contra os vírus, estes ainda se mostram capazes de evitá-lo ou até suprimi-lo. Evidências de que os vírus seriam capazes de suprimir essa resistência surgiram pelo estudo das interações de sinergismo viral entre os membros do gênero *Potyvirus* e outros vírus não filogeneticamente relacionados. Constatou-se que a proteína HC-Pro (codificada pelo genoma dos *Potyvirus*) era responsável pelo sinergismo viral, e que este por sua vez, resultaria provavelmente da supressão do mecanismo de defesa do hospedeiro contra o ataque viral (Pruss *et al.*, 1997). Estudos posteriores mostraram que a HC-Pro (helper component proteinase) era efetivamente capaz de suprimir o silenciamento por RNA, fato este que forneceu mais uma comprovação da ligação entre o referido fenômeno e o mecanismo natural de defesa da planta contra vírus (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau & Carrington, 1998). Simultaneamente, estudos com a proteína 2b de *Cucumovirus* demonstraram que esta também era capaz de suprimir o silenciamento mediado por RNA (Brigneti *et al.*, 1998). Em 1999, Voinnet e colaboradores demonstraram de forma definitiva que a supressão do silenciamento por RNA é uma estratégia anti-defesa comumente utilizada pelos vírus vegetais com genoma composto por moléculas de DNA ou RNA, como *Geminivirus* (por meio da proteína AC2), *Sobemovirus* (através da proteína P1), *Tombusvirus* (pelo intermédio da proteína 19K) e outros (*Comovirus*, *Tobamovirus* e *Tobravirus*).

É interessante ressaltar que as proteínas virais supressoras de silenciamento apresentam diferentes fenótipos de quebra de silenciamento, atuando de modo diferente e em etapas diferentes do processo. A proteína HC-Pro, por exemplo, suprime o silenciamento em toda planta, mesmo em tecidos que já estejam silenciados, enquanto a proteína 2b parece atuar somente em tecidos mais jovens, bloqueando apenas a iniciação do silenciamento (Beclin *et*

al., 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Voinnet *et al.*, 1999). Já a proteína 19K afeta o silenciamento por RNA nas folhas novas, enquanto em *Comovirus*, *Tobamovirus* e *Tombusvirus* ocorre supressão tanto em folhas novas quanto velhas, porém em ambos casos, a supressão esta restrita a áreas da nervura central foliar (Voinnet *et al.*, 1999).

I.3.1 A proteína viral HC-Pro

A proteína HC-Pro (Helper Component-Proteinase) é produzida por vírus vegetais do gênero *Potyvirus*, da família *Potyviridae* que constitui o mais importante grupo de vírus fitopatogênicos (Riechmann *et al.*, 1992). O genoma destes vírus é composto por uma molécula de RNA fita simples de polaridade positiva. A família *Potyviridae*, além do gênero *Potyvirus*, apresenta mais cinco gêneros: *Rymovirus*, *Bymovirus*, *Macluravirus*, *Ipomovirus* e *Tritimorivus* (Berger *et al.*, 1997). Coletivamente, os membros dessa família causam perdas superiores às causadas por todos os outros vírus de plantas em conjunto.

A proteína HC-Pro é traduzida juntamente com todas as outras nove proteínas virais na forma de uma única poliproteína. Desse modo, ao ser traduzida, está associada em sua extremidade N-terminal à proteína P1, e do seu lado C-terminal, à proteína P3. A HC-Pro libera-se da proteína P3 através de uma atividade proteinase associada ao seu domínio C-terminal (Carrington *et al.*, 1989), enquanto que a separação P1-HC-Pro depende da atividade proteinase da P1 (Carrington *et al.*, 1989).

Uma proteína HC-Pro típica tem cerca de 460 aminoácidos, apresenta peso molecular de aproximadamente 52 kDa e pI teórico de 8,28. Apesar de se tratar de uma proteína relativamente pequena, ela acumula um número surpreendentemente grande de funções, sendo assim, a proteína que possui o maior número de funções descritas dentre aquelas produzidas pelos potyvírus (Maia *et al.*, 1996). A HC-Pro desempenha diversos papéis

durante o ciclo de infecção viral: atua como proteinase (em *cis*); participa da transmissão por afídeos; atua como auxiliar da replicação viral e dos movimentos célula-a-célula e a longa distância. Adicionalmente é dotada de capacidade supressora determinando a inibição do sistema de defesa baseado no silenciamento por RNA (Carrington *et al.*, 1989; Cronin *et al.*, 1995; Kasschau & Carrington, 1995; Vance *et al.*, 1995; Maia *et al.*, 1996; Pruss *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1997; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000).

Estudos de mutagênese e alinhamento de seqüências sugerem que a HC-Pro pode ser dividida em três regiões distintas: N-terminal, Central e C-terminal (Figura 1) (Plisson *et al.*, 2003). A região N-terminal, localizada entre os resíduos 1 a 100, está envolvida na transmissão do vírus pelo seu inseto vetor (afídeos), a qual acontece pela sua interação com a proteína de capsídeo viral e o canal alimentar dos afídeos. Como já comentado anteriormente, a região C-terminal atua como uma proteinase liberando a HC-Pro de sua associação com a proteína P3; mas esta região também parece estar envolvida com o movimento viral. Evidências experimentais demonstram que a região Central, por sua vez, está envolvida na replicação, no movimento viral e na supressão de silenciamento por RNA (Plisson *et al.*, 2003). A forma biologicamente ativa da proteína HC-Pro é provavelmente um homodímero, mas a região responsável por essa interação é motivo de controvérsia, sendo que os domínios N-terminal e C-terminal parecem estar envolvidos (Guo *et al.*, 1999; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000; Plisson *et al.*, 2003).

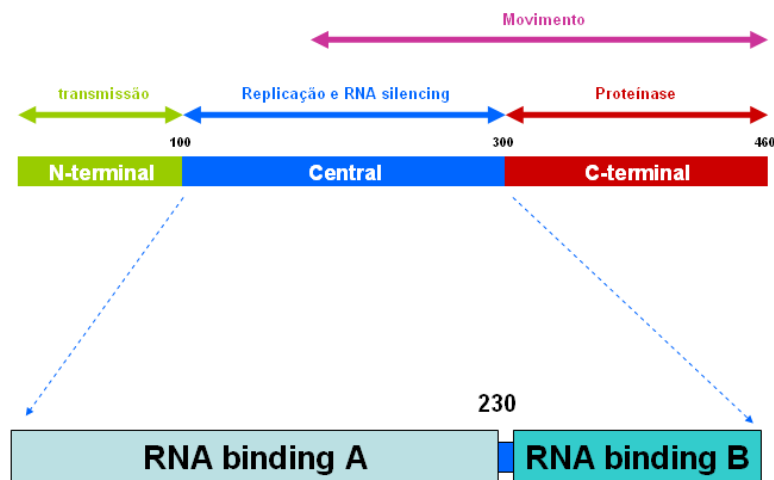


Figura 1. Representação esquemática dos domínios, e suas respectivas funções, da proteína HC-Pro.

A região central da HC-Pro, localizada entre os aminoácidos 100 a 300, já teve alguns resíduos chave identificados, como o triplet de aminoácidos IGN envolvido na replicação viral, e o CC/SC envolvido no movimento viral e no sinergismo (Cronin *et al.*, 1995; Kasschau *et al.*, 1997). Essa região também apresenta atividade de ligação não específica com ácidos nucleicos (Maia & Bernardi, 1996), preferencialmente RNA fita simples. Podemos também subdividir a região central em dois domínios de ligação a RNA denominados A (aminoácidos 89-230) e B (aminoácidos 234-321) (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000) (Figura 1). O domínio B apresenta homologia com ribonucleoproteínas (RNPs), proteínas normalmente envolvidas no processamento e transporte de RNA, expressão gênica e desenvolvimento celular (Maia & Bernardi, 1996; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000).

Essa capacidade de ligação a moléculas de RNA tem importância bastante evidente quando pensamos em replicação viral e transporte do RNA viral. Mutações em aminoácidos essenciais para atividade de ligação a RNA da proteína HC-Pro afetam diretamente a sua capacidade supressora de silenciamento por RNA (Campos-Pereira, 2002). Entretanto, a relação entre ligação a RNA e supressão de silenciamento por RNA não é tão evidente como no caso da proteína supressora de silenciamento p19 de *Tombusvirus*, cuja capacidade de

supressão de silenciamento se deve à capacidade dessa proteína em se ligar aos siRNAs de ~21 a ~24 nts (Silhavy *et al.*, 2002; Vargason *et al.*, 2003). Apesar da HC-Pro suprimir fortemente o silenciamento por RNA, ela não impede que o sinal de silenciamento se espalhe via floema (longa distância). A presença da HC-Pro leva à diminuição da concentração de siRNAs de ~21 nts, mas não afeta negativamente a concentração de siRNAs de ~24 nts, podendo inclusive, em algumas linhagens transgênicas, aumentar a concentração destes (Mallory *et al.*, 2002; Mallory *et al.*, 2003). Em experimentos de enxertia foi verificado que duas linhagens de plantas transgênicas incapazes de transmitir sistemicamente o silenciamento, passaram a ter tal capacidade após terem o silenciamento suprimido pela HC-Pro (Mallory *et al.*, 2003).

I.4 Supressores endógenos de silenciamento por RNA

Além dos inúmeros supressores de silenciamento gênico de origem viral, supressores de silenciamento endógenos foram relatados em eucariontes. A supressão de silenciamento de origem endógena controla negativamente a presença de siRNAs e miRNAs, atuando de diversos modos. A geração e o controle dos siRNAs e miRNAs são processos essenciais para o desenvolvimento normal de plantas e animais (Carrington & Ambros, 2003; Mallory & Vaucheret, 2006; Ramachandran & Chen, 2008).

O primeiro destes supressores foi identificado em *Nicotiana tabacum* e foi chamado rgs-CaM (*regulator of gene silencing CaM*) (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Quando expressa em níveis elevados em *Nicotiana benthamiana*, a rgs-CaM suprime o silenciamento gênico induzido pelo vírus X de batata (PVX) (Anandalakshmi *et al.*, 2000). O seu mecanismo de ação, porém, é ainda totalmente desconhecido. Uma proteína inibidora da atividade da RNaseL de *Arabidopsis* (denominada RLI2) também apresenta atividade supressora de

silenciamento quando expressa em níveis elevados em plantas transgênicas de *N. benthamiana* (Sarmiento *et al.*, 2006).

Outro supressor endógeno descrito recentemente, a exoribonuclease XRN4 de *Arabidopsis thaliana*, suprime o silenciamento promovendo degradação das moléculas de mRNA desprovidas de estrutura CAP (decapeados), que constituem possíveis moldes para uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRPs) envolvida na via de silenciamento (Gazzani *et al.*, 2004). Essas moléculas aberrantes representam ativadores importantes do silenciamento, servindo como molde para a produção de novos dsRNAs pela ação da RdRP. Os autores observaram que mutações no gene *xrn4* promovem o silenciamento dependente da atividade RdRP (Gazzani *et al.*, 2004), e conduzem a uma super acumulação de produtos de clivagem de miRNAs (Souret *et al.*, 2004). Posteriormente, Gy e colaboradores (2007) identificaram mais três proteínas supressoras em *Arabidopsis thaliana*, as exoribonucleases XRN2, XRN3 e FRY1, complementando assim o conhecimento existente da via de supressão de silenciamento envolvendo XRN4. Enquanto XRN4 é citoplasmática, XRN2 e XRN3 são proteínas nucleares (Kastenmayer & Green, 2000). As exoribonucleases XRN2 e XRN3 contribuem para a supressão do silenciamento por RNA através da degradação dos pré-miRNAs presentes no núcleo, enquanto que as XRN4 atuam exclusivamente no citoplasma promovendo a degradação de moléculas aberrantes de RNA (Gazzani *et al.*, 2004; Souret *et al.*, 2004; Gy *et al.*, 2007). Já a Fry1 atua como um modulador fino das atividades de XRN2, XRN3 e XRN4, proteínas responsáveis pela supressão do silenciamento (Gy *et al.*, 2007).

Curiosamente, observou-se que uma exonuclease conservada em *Caenorhabditis elegans* e *Schizosaccharomyces pombe*, denominada Eri-1, degrada especificamente siRNAs sendo capaz de reduzir a eficiência do silenciamento por RNA *in vivo* (Kennedy *et al.*, 2004; Iida *et al.*, 2006). Adicionalmente, uma família de exoribonucleases conhecidas como *SMALL*

RNA DEGRADING NUCLEASE (SDN), degradam miRNAs maduros em *Arabidopsis*, atuando especificamente em miRNAs de fita simples (Ramachandran & Chen, 2008).

I.5 As Calmodulinas

Segundo a classificação do SCOP (*Structural Classification of Protein*), as calmodulinas (CaMs) são proteínas que possuem um domínio *calmodulin-like* que é capaz de realizar ligações com Ca^{2+} por meio de uma estrutura hélice-giro-hélice conhecida como *EF-hand* (Figura 2) (Kretsinger, 1987). As CaMs são reconhecidas como os mais importantes sensores celulares de Ca^{2+} , sendo orquestradores de diversos eventos regulatórios, os quais são efetivados pela sua capacidade de interação com um grupo grande e diverso de proteínas celulares (Figura 3) (De Koninck & Schulman, 1998; Bouche *et al.*, 2005; Huang & Liu, 2007). As CaMs são altamente conservadas e amplamente distribuídas em eucariontes. O alinhamento das seqüências de aminoácidos de diferentes CaMs revela um alto grau de conservação entre animais e plantas (>70% de identidade) (Yang & Poovaiah, 2003). Em contrapartida, os domínios de interação das proteínas alvos das CaMs apresentam uma extrema variabilidade, o que reflete a grande flexibilidade de ligação dessas proteínas (Sneeden & Fromm, 2001; Hoeflich & Ikura, 2002).

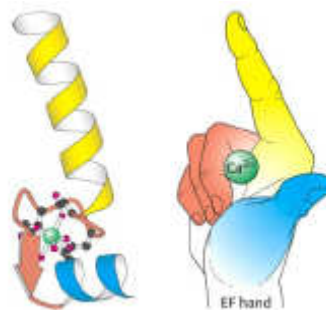


Figura 2. Estrutura esquemática de um *EF hand*.

(fonte:http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/ENZYMES/enzyme_regulation.html)

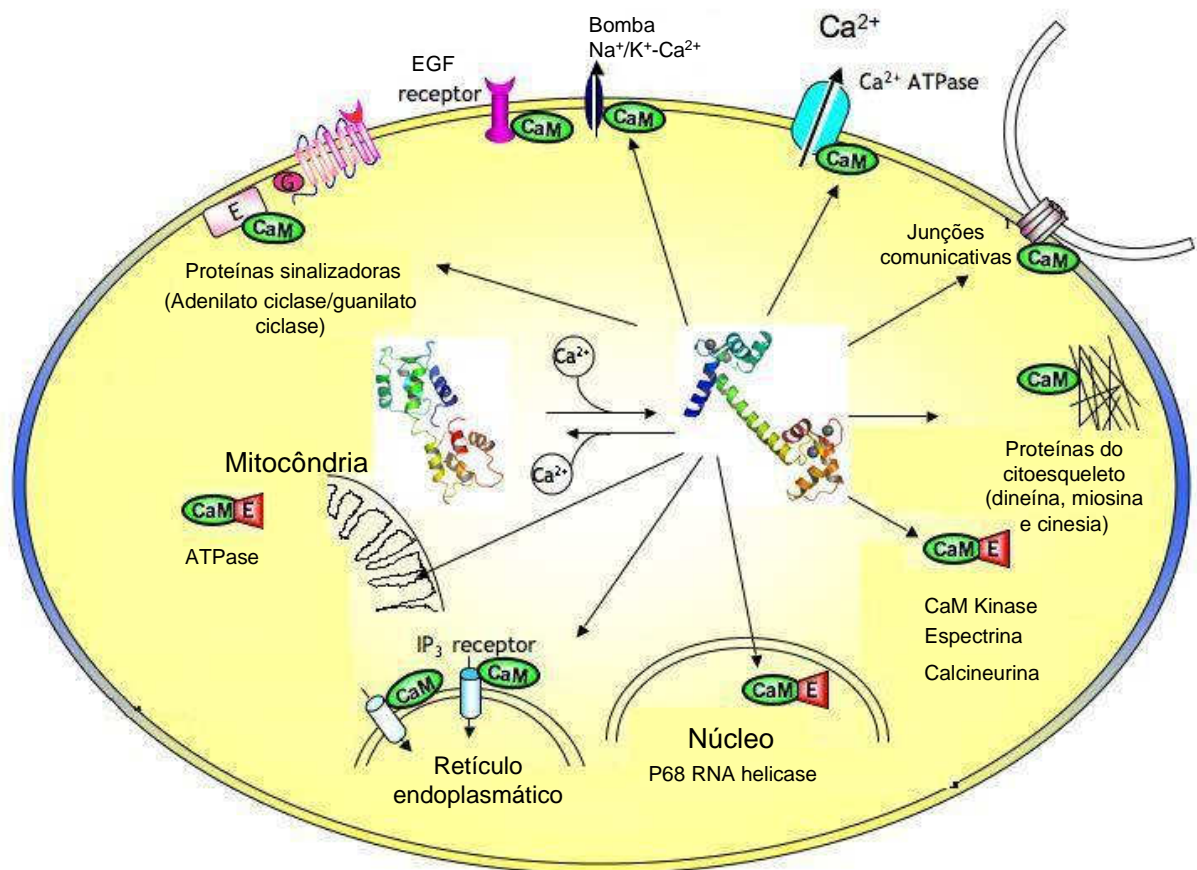


Figura 3. Distribuição das proteínas de ligação a Calmodulina em diferentes compartimentos celulares, incluindo núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndria. CaMs podem interagir com proteínas de membrana (canais iônicos, bombas de íons e junções comunicativas), proteínas do citoesqueleto e com uma variedade de enzimas presentes no citoplasma (modificado do endereço eletrônico: <http://chemistry.gsu.edu/faculty/Yang/Signaling.htm>)

As CaMs apresentam oito segmentos helicoidais (A-H) com dois domínios globulares, um em cada extremidade, chamados "lóbulo". Cada domínio contém dois *EF-hands*, local onde ocorre a ligação do Ca^{2+} . Porém, algumas destas proteínas podem apresentar um número variável de *EF-hands* - de três (em trigo; CaM-III) (Yang *et al.*, 1996) até seis (*Arabidopsis*; TCH3) (Sistrunk *et al.*, 1994). Cada *EF-hand* é formado por uma alça de 12 aminoácidos que começa com um ácido aspártico e termina com um ácido glutâmico, formando ligações iônicas com o Ca^{2+} (Babu *et al.*, 1985; Ikura *et al.*, 1992; Meador *et al.*, 1992). Devido a uma orientação relativamente perpendicular das hélices ocorre a formação de um bolso hidrofóbico

em cada lóbulo formando um local de interação para algumas moléculas alvos (Babu *et al.*, 1985; Ikura *et al.*, 1992; Meador *et al.*, 1992).

Em animais existem poucos genes *CaM*, os quais codificam uma ou poucas isoformas. Em contrapartida, as plantas possuem múltiplos genes *CaM* que codificam para várias isoformas (Reddy, 2001; Sneed & Fromm, 2001) o que sugere que as redes de sinalização mediadas por Ca^{2+} /*CaM* são muito diferentes em plantas se comparadas com os animais. Os genes das *CaMs* são diferencialmente expressos em resposta a inúmeros estímulos externos, tais como toque, choque térmico, frio, luz, agentes patogênicos e hormônios como a auxina (Reddy, 2001; Sneed & Fromm, 2001; Townley & Knight, 2002; Ali *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003). As *CaMs* também apresentam padrões de expressão variáveis em diferentes fases de desenvolvimento, bem como em diferentes tecidos e tipos celulares (Yang *et al.*, 1998; Sneed & Fromm, 2001; Duval *et al.*, 2002).

As calmodulinas não apresentam em si atividade enzimática. Elas são ativadas por íons Ca^{2+} que promovem modificações alostéricas (Figura 4), o que as torna aptas a se ligar com sua(s) proteína(s) alvo (De Koninck & Schulman, 1998; Bouche *et al.*, 2005; Huang & Liu, 2007). Em alguns casos, a calmodulina serve como uma subunidade reguladora permanente de um complexo enzimático, mas, na maioria das vezes, a ligação do Ca^{2+} permite que a proteína se ligue a várias outras proteínas alvo na célula, alterando assim suas atividades (De Koninck & Schulman, 1998; Bouche *et al.*, 2005; Huang & Liu, 2007). Geralmente, as *CaMs* são encontradas no citosol, no entanto, podem ser encontradas no núcleo (Van Der Luit *et al.*, 1999), no peroxissomo (Yang & Poovaiah, 2002) e na matriz extracelular (Ma *et al.*, 1999). A necessidade de ocupar múltiplos locais subcelulares é compreensível, pois as proteínas alvo das *CaMs* estão distribuídas em diferentes compartimentos celulares. Assim, um grande número de proteínas celulares, das mais variadas funções e localizações, já foram identificadas como alvo das *CaMs* (Figura 3).

Alguns exemplos incluem proteínas kinases, canais de Ca^{2+} , canais de K^+ , proteínas F-box, proteínas com domínios de ligação a RNA, glutamato decarboxylase (GAD), e outras proteínas de função ainda não conhecida (Bouche *et al.*, 2005; Popescu *et al.*, 2007). Algumas dessas interações já foram caracterizadas a nível estrutural, e o que se observa é que as calmodulinas agem de formas muito diversas como: (a) liberação de autoinibição, (b) remodelação ativa de sítio ativo, (c) promoção de dimerização, (d) estabilização de complexos multiméricos, (e) inativação por ligação a sítio de ligante (Bouche *et al.*, 2005).

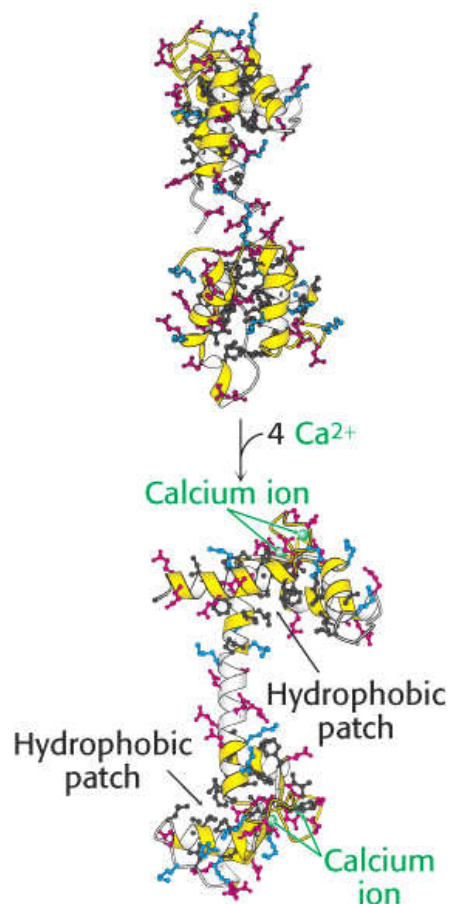


Figura 4. Regulação alostérica das calmodulinas na presença de íons Ca^{2+}
(fonte:http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/ENZYMES/enzyme_regulation.html)

I.6 A proteína rgs-CaM

A rgs-CaM (*regulator of gene silencing CaM*), é uma proteína do tipo Calmodulina (CaM) que foi identificada em plantas de *Nicotiana tabacum* atuando como supressora de silenciamento por RNA (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Esta proteína, capaz de interagir com a HC-Pro, foi evidenciada pelo sistema duplo-híbrido de levedura (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Plantas transgênicas de *N. benthamiana* superexpressando a rgs-CaM apresentam alterações fenotípicas semelhantes às observadas em *N. benthamiana* transgênicas expressando HC-Pro (Anandalakshmi *et al.*, 2000). A interação da rgs-CaM com a proteína viral HC-Pro, e o fato de que sua expressão pode ser induzida pela HC-Pro, sugerem que a supressão do silenciamento pela HC-Pro possa ser mediada pela rgs-CaM. Embora o mecanismo de atuação envolvido seja ainda desconhecido acredita-se que ocorra a ativação de uma via endógena que regularia negativamente o sistema de silenciamento (Anandalakshmi *et al.*, 2000). A rgs-CaM tem 190 aminoácidos, um peso molecular de ~21 kDa, um pI teórico de 4,74, e possui quatro domínios *EF-hands* (aminoácidos: 54-82, 90-118, 127-155 e 163-189). A região N-terminal de 50 aminoácidos é rica em resíduos básicos, e apresenta características típicas de uma região alvo de outras calmodulinas (Anandalakshmi *et al.*, 2000), o que indica a existência de uma possível auto-regulação (Figura 5).

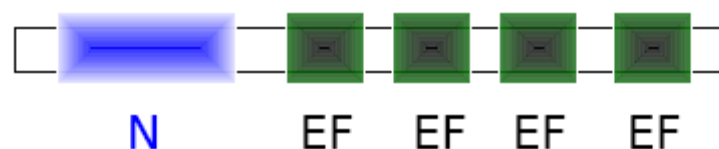


Figura 5. Representação esquemática dos domínios da proteína rgs-CaM. *EF-hands* (EF) e porção N-terminal (N).

A proteína rgs-CaM desperta uma ampla gama de interesse, pois foi a primeira proteína endógena identificada como supressora de silenciamento, além de ter provavelmente um papel chave na supressão do silenciamento envolvendo a proteína viral HC-Pro (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Além disso, essa proteína pertence a classe das calmodulinas que participam de diversas vias metabólicas (De Koninck & Schulman, 1998; Bouche *et al.*, 2005; Huang & Liu, 2007). Apesar disso, até hoje pouco se fez para determinar suas atividades bioquímicas, e os ensaios visando desvendar o seu mecanismo de ação são insipientes. Desse modo, a expressão da proteína rgs-CaM em sistema heterólogo e sua purificação servem de base para que testes de atividade *in vitro* sejam realizados visando determinar suas propriedades biológicas e estruturais.

II. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Obter a proteína rgs-CaM pura para determinar as suas propriedades estruturais.

Objetivos específicos:

- Amplificar e clonar a região codificadora da proteína supressora rgs-CaM de *Nicotiana tabacum*.
- Realizar a expressão da proteína rgs-CaM em *Escherichia coli*.
- Purificar a proteína recombinante.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1 Amplificação da região codificadora da rgs-CaM por RT-PCR

O RNA total de plântulas de *Nicotiana tabacum* SR1 foi extraído seguindo protocolo descrito (Sambrook & Russell, 2001) utilizando cerca de 100 mg de tecido macerado em nitrogênio líquido, sendo o mesmo armazenado em freezer -80°C até o momento de uso. O RNA total extraído foi usado como molde para sintetizar a primeira fita de cDNA empregando a transcriptase reversa *SuperScript III* (Invitrogen) conforme as recomendações do fabricante.

O cDNA da rgs-CaM foi amplificado usando os oligonucleotídeos: Eco Foward 5'-GGCGAATTCATGTGCATGGAATCAGTTTC – 3' e Xba reverse 5'-CTAGTCTAGATTA ACTTGTCATCATAGCTTTGAAC – 3', desenhados com base em sequência de nucleotídeos depositada no GenBank (número de acesso AF329729). O produto de amplificação de ~600 pares de base (pb) compreende toda região codificadora da rgs-CaM, incluindo o códon iniciador, o códon de parada e os sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI* para clonagem. Para a amplificação do cDNA foi utilizada a *Pfu* DNA polimerase (Fermentas), que possui capacidade de *proofreading*, segundo as recomendações do fabricante. A reação de amplificação consistiu de 30 ciclos: 94°C/ 1min, 55°C/2 min e 72°C/2 min. Cabe ressaltar que na reação de PCR foram usados oligonucleotídeos específicos citados acima. Já para síntese da primeira fita foi utilizado Oligo(dT)₁₆. Para chegar a um resultado desejado foram feitas várias reações de RT-PCR testando RNA total extraídos de folha, raiz ou de plântula inteira.

III.2 Clonagem do cDNA em vetores de expressão bacteriano

O produto de amplificação de aproximadamente 600 bp representando a região codificadora da rgs-CaM foi purificado em gel e clonado no vetor pMAL-c2E para expressão em bactéria (Figura 6.a). Para tal foram usados os sítios *EcoRI* e *XbaI* (Figura 6.b). Nesse caso, a proteína resultante da expressão estará fusionada, em sua porção N-terminal, à maltose-binding-protein (MBP), o que facilita a sua posterior purificação por cromatografia de afinidade. Os plasmídeos recombinantes foram inicialmente transformados em *Escherichia coli* linhagem DH5 α . Após a seleção, as bactérias transformadas tiveram seu DNA plasmidial purificado pelo método de lise alcalina (Sambrook & Russell, 2001). A presença do inserto foi confirmada por digestão do plasmídeo recombinante empregando enzimas de restrição, sendo verificado um total de 8 clones.

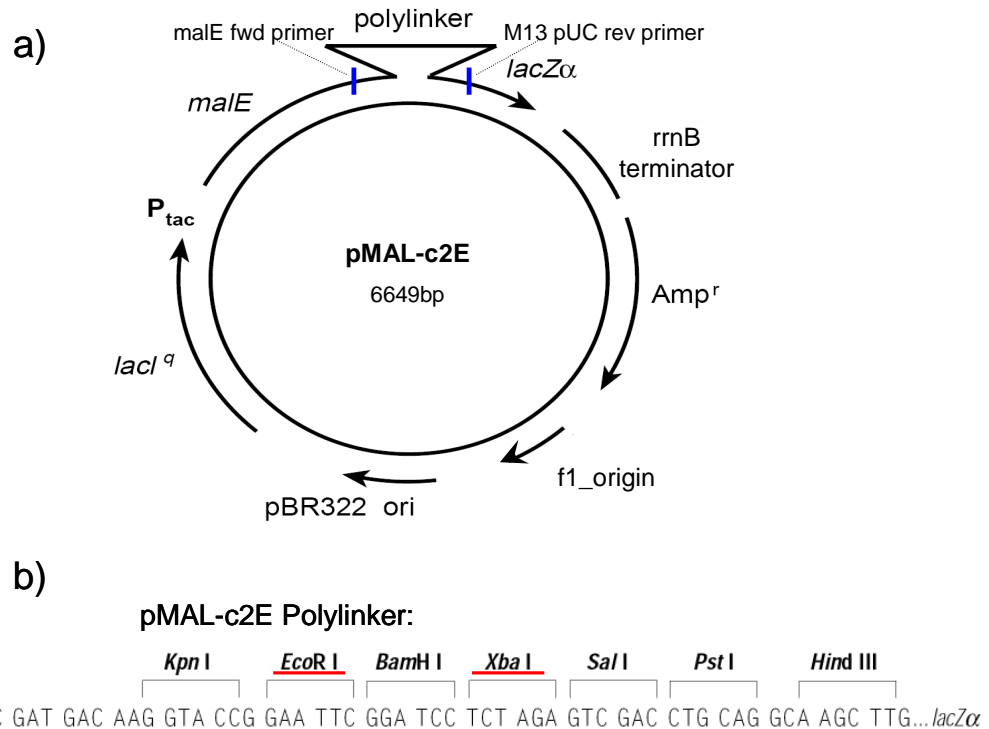


Figura 6. a) Ilustração do vetor pMAL-c2E utilizado para clonagem da região codificadora da rgs-CaM. b) região da sequência poliligante, os sítios utilizados foram *EcoRI* e *XbaI*, sublinhados em vermelho (modificado do manual pMAL™ Protein Fusion and Purification System – New England).

III.3 Sequenciamento do plasmídeo recombinante

Para o sequenciamento foram utilizados 1µl do plasmídeo recombinante (400ng/µl), 1 µl de oligonucleotídeo (MalE forward ou M13 reverse – 10 pmoles), 2µl de tampão de reação “Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” da “Applied Biosystems”, 2 µl de tampão de reação “Save Money” e 4 µl de água MilliQ. O programa de PCR utilizado para o sequenciamento foi: 1 - 96°C por 1 minuto; 2 - 96°C por 10 segundos; 3 - 50°C por 5 segundos; 4 - 60°C por 4 minutos; 5 – repetir passos 2 a 4 por 35 vezes; 6 - 10°C α . Após o término de amplificação os produtos foram precipitados com isopropanol e submetidos ao sequenciamento automático utilizando o aparelho 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As seqüências de nucleotídeos obtidas foram convertidas para seus respectivos aminoácidos, e alinhadas com as seqüências de aminoácidos depositadas no banco de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando a ferramenta blastx.

III.4 Indução da expressão da rgs-CaM em *Escherichia coli*

Os plasmídeo pMAL-c2E carregando a região codificadora da proteína de interesse foi introduzido em bactérias das linhagens BL-21 DE3 Rosetta e BL-21 DE3 pRIL codon plus. Com as colônias transformadas foram feitos pré-inoculos em 2 ml de meio LB (Luria-Bertani) contendo 100 µg/ml de ampicilina e 50 µg/ml de cloranfenicol. As bactérias foram então incubadas a temperatura de 37°C por 12 horas sob agitação de 200 rpm. Logo após, uma alíquota de 200 µl dessa pré-cultura foi adicionada a 10 ml de meio LB contendo os antibióticos citados, e crescida até alcançar a absorbância (600 nm) de ~0.7 (em torno de 3 horas). Ao atingir a absorbância desejada, a uma parte do inoculo foi adicionado 1 mM de IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) para indução da expressão, e a outra parte, como

controle, foi adicionada D-glucose (concentração final de 0,5%) para reprimir a expressão gênica. Ambas foram incubadas a 28°C por 4 horas. As células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 100 µl de tampão de lise (62,5 mM Tris, 2% SDS, 10% glicerol e 5% β-mercaptoetanol). A lise das células nas amostras controle e induzida foi completada por aquecimento a uma temperatura de 95°C por 5 minutos, processo este também necessário para desnaturação das proteínas presentes no meio. O resultado da indução foi observado em gel SDS-PAGE 12%. Os clones positivos foram estocados em glicerol e armazenados no freezer -80°C.

III.5 Testes de solubilidade da proteína recombinante

Para os ensaios de solubilidade da proteína recombinante, 10 ml de cultura de bactéria induzida foram centrifugados a 3.500 x g por 10 minutos. Em seguida, essas foram ressuspensas em diferentes tampões: HEPES 20 mM pH 7.0, Tris-HCl 50 mM pH 8.5 ou MES 50 mM pH 5.5, alterando a concentração de NaCl para cada tampão (100 mM ou 300 mM). Em todos os tampões foram adicionados Lisozima (1 mg/ml) e inibidores de protease (TECEP 1 mM, PMSF 1 mM, Aprotinina 1 µg/ml, Pepstatina 1 µg/ml, Leupeptina 1 µg/ml), RNase A (1 µg/ml), DNase I (10 u/ml). Após serem ressuspensas, as amostras permaneceram no gelo por 1 hora, sendo posteriormente centrifugadas a 16.000 x g por 30 minutos a 4°C. No fim do processo foram coletados o sobrenadante (solúvel) e o precipitado (insolúvel), sendo os mesmos analisados em gel SDS-PAGE 12%.

III.6 Indução em larga escala para purificação protéica

Para a expressão em larga escala, os clones previamente selecionados por produzirem as proteínas de interesse foram inoculados em 10 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e 50 µg/ml de cloranfenicol, e em seguida incubados por 12 horas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm. Em seguida, 10 ml desse pré-inóculo foram transferidos para 1 L de meio LB contendo os agentes de seleção, e incubados até alcançar uma absorbância (600 nm) de ~0.7 (crescimento de ~3 horas). A indução da expressão foi realizada conforme descrito anteriormente. Após 4 horas de indução, as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 50 ml de tampão selecionado de acordo com teste de solubilidade descrito acima: 50 mM Tris-HCl pH 8,5, NaCl 100 mM contendo Lysozima (1 mg/ml) e inibidores de protease (TECEP 1mM, PMSF 1mM, Aprotinina 1µg/ml, Pepstatina 1µg/ml, Leupeptina 1µg/ml), além de RNase A(1 µg/ml) e DNase I (10 u/ml). A amostra foi incubada por 1 hora no gelo, e em seguida centrifugada a 16.000 x g por 30min a 4°C. A fração correspondendo ao sobrenadante foi coletada para a purificação.

III.7 Purificação da proteína de fusão pelo método de cromatografia de afinidade usando resina de amilose

Após a lise das células e centrifugação do extrato total, as proteínas solúveis contendo a cauda MBP foram purificadas conforme descrito por Delany e colaboradores (2002). A purificação foi realizada em condições não desnaturantes em coluna cromatográfica de afinidade contendo amilose (New England) seguindo as instruções descritas pelo fabricante. Para purificação foram utilizados aproximadamente 50 ml de sobrenadante da fração solúvel do extrato total de células. Para a purificação foi usada uma coluna XK 26 (GE) com 20 ml de resina e um equipamento HPLC modelo AKTA Purifier 900 (GE Helthcare). A coluna foi

montada manualmente retirando o álcool presente na resina e equilibrando-a com tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 100 mM NaCl, 0,25% Tween 20). Logo após o preparo da coluna, a solução contendo a proteína de interesse foi injetada com fluxo 1 ml/min. Em seguida a coluna foi lavada com tampão A com um volume correspondente a 5 vezes o volume de resina. Finalizada essa etapa, as proteínas foram eluídas com tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 100 mM NaCl, 0,25% Tween 20 e 10 mM maltose) e fracionadas em volumes de 1 ml. Logo após a purificação, as proteínas foram então concentradas utilizando concentradores Amicon Ultra-4/ultracell-30k (Millipore) de acordo com instruções do fabricante.

III.8 Quantificação da Proteína Recombinante MBP:rgs-CaM

A concentração da proteína recombinante MBP:rgs-CaM foi determinada em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop) usando como parâmetros: a massa molecular de 64 kDa e coeficiente de extinção de 73.800, sendo este calculado a partir da composição de aminoácidos da proteína recombinante, utilizando o programa ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protpar-ref.html>).

III.9 Ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Para a realização de tais ensaios, a proteína recombinante foi utilizada na concentração de 3 mg/ml em presença de diferentes tampões: HEPES pH 7,0 NaCl 100 mM; Tris pH 8,5, NaCl 100 mM; Tris pH 7,0, NaCl 100 mM; MÊS pH 5,5, NaCl 100 mM; entre outros. As condições de temperatura usadas foram: 10°C, 18°C, 25°C e 28°C. Os experimentos de DLS foram feitos usando o aparelho da DynaPro 810 (Protein Solutions) equipado com um estabilizador de temperatura.

III.10 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

As medições em Dicroísmo Circular (CD) foram realizadas empregando concentrações de 150 µg/ml de proteína recombinante em tampão 50 mM de Tris-HCl (pH 8,5), 100 mM NaCl, na presença ou ausência de 1 mM EGTA (um agente quelante, compatível com CD) para observar as diferenças estruturais induzidas pela remoção de íons Ca²⁺. Os espectros de CD foram monitorados com um espectropolarímetro Jasco (J-810) com resolução de 0,5 nm, e cubetas com caminho óptico de 1 mm de comprimento. Um total de 10 acumulações para cada espectro UV entre 190 e 260nm foi recolhido, em temperatura ambiente, determinando assim a estrutura secundária da proteína. O software CDNN, v.2.1 (Bohm, 1997) foi utilizado para a análise de espectroscopia e avaliação da estrutura secundária da proteína. Os dados de espectros de CD foram relatados como média da elipsidade residual [θ] (MRE), em grau cm² dmol⁻¹, que foram calculados a partir de valores da elipsidade em millidegrees (θ), utilizando a seguinte fórmula:

$$[\theta] = \frac{\text{mdeg} \cdot \text{PM}}{\text{L} \cdot \text{NR} \cdot [\] \cdot 10}$$

([θ]: elipsidade molar; **PM**: peso molecular em Daltons; **L**: caminho óptico da cubeta; **NR**: número de aminoácidos; [] concentração da proteína em mg/ml).

III.11 Predição *in silico* da estrutura secundária

As seqüências deduzidas de aminoácidos da proteína rgs-CaM e da proteína MBP, respectivamente, foram utilizadas para a predição da estrutura secundária. Estas foram deduzidas das seqüências de nucleotídeos depositadas no GenBank (acesso AF329729 para a rgs-CaM) e no manual do vetor pMAL-c2E – New England (<https://www.lablife.org/ct?a=viewvecseq&vectorid=502>), respectivamente. Para tal, foi

utilizada a ferramenta de tradução do Expasy (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>). A predição da estrutura secundária foi realizada pelo método SOPM disponível no endereço eletrônico http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopm.html.

IV. RESULTADOS

IV.1 Amplificação da região codificadora da proteína rgs-CaM

Para se chegar a um resultado desejado foram feitas diversas reações de RT-PCR testando RNA extraídos da folha, raiz ou plântula inteira. O melhor resultado foi obtido utilizando RNA total de folha. Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese utilizando gel de agarose 1% (Figura 7), onde foi possível confirmar que o fragmento amplificado tinha o tamanho esperado (600 bp).

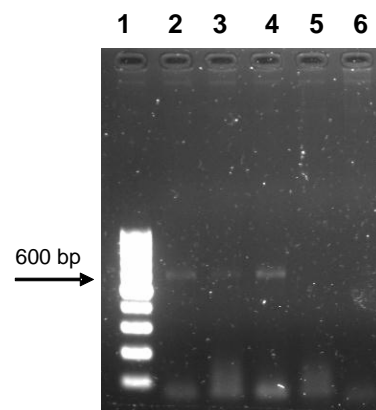


Figura 7. Eletroforese dos produtos de amplificação obtidos na RT-PCR. 1) Marcador de tamanho molecular (Ladder GeneRuler™ 100bp; Fermentas); 2), 3) e 4) fragmento de interesse amplificado com os oligos *EcoRI* e *XbaI* apresentando tamanho de 600 bp (seta). 5) controle utilizando RNA tratado 6) controle utilizando H₂O. Gel de agarose 1%.

IV.2 Clonagem da rgs-CaM em vetor pMAL-c2E

A região codificadora da rgs-CaM foi inserida no vetor pMAL-c2E digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*. Após a transformação em *E. coli*, os clones positivos foram confirmados por digestão do plasmídeo recombinante com as respectivas enzimas de restrição. A presença do inserto correspondente à região codificadora da rgs-CaM foi confirmada em todas as colônias analisadas (08 no total) (Figura 8).

IV.4 Indução da expressão da proteína rgs-CaM recombinante (MBP:rgs-CaM)

O plasmídeo recombinante foi inserido em *E. coli* linhagem BL-21 DE3 Rosetta visando a expressão da proteína recombinante. Cabe ressaltar que nenhuma colônia foi obtida usando a linhagem pRIL codon plus.

Quatro colônias transformadas foram selecionadas para o teste preliminar de expressão. Para tal, alíquotas de 1 ml da cultura de bactérias induzida por IPTG foram centrifugadas, lisadas, e as proteínas desnaturadas em tampão de lise para análise em SDS-PAGE. Alíquotas de 1 ml da cultura de bactérias sem indução por IPTG (não induzidas) foram usadas como controle. Neste caso, a adição de D-glucose para reprimir uma possível expressão vazada do sistema foi descartada, pois em experimentos prévios não foi constatado um efeito significativo dessa. O resultado obtido está representado na Figura 10.

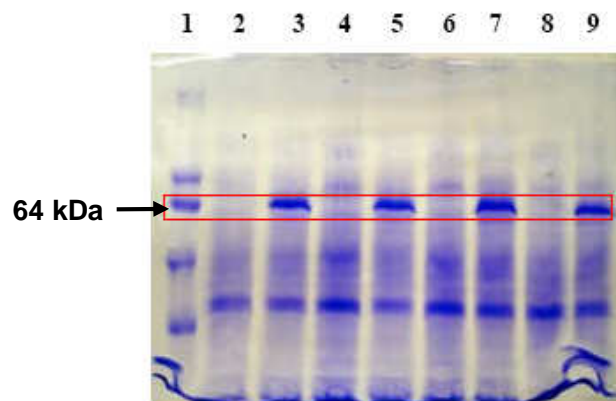


Figura 10. Indução da expressão da proteína de fusão MBP:rgs-CaM em BL-21 DE3 Rosetta: 1) Marcador de massa molecular (GE); 2), 4), 6) e 8) – Extrato protéico total de células não induzidas dos clones 1, 2, 3, e 4, respectivamente. 3), 5) 7) e 9) – Extrato protéico total de células induzidas com IPTG dos clones 1, 2, 3 e 4. Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de comassie. A posição da proteína de fusão é indicada por uma seta.

IV.5 Análise do teste de solubilidade para purificação da proteína

Todos os tampões apresentaram resultados positivos quanto a solubilidade da proteína de fusão, exceção feita ao tampão 50 mM MES pH 5,5, NaCl 100 mM (Fig. 11. 1b), no qual a proteína permaneceu na porção na fração insolúvel.

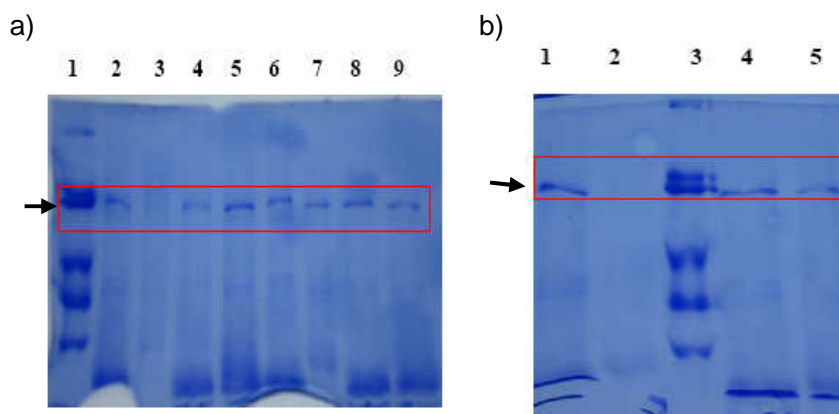


Figure 11. Teste de solubilidade da proteína de fusão MBP:rgs-CaM utilizando diferentes tampões. 1a) Marcador de massa molecular (GE); 2a), 4a), 6a) e 8a) fração insolúvel; 3a) proteína solúvel em 20 mM HEPES pH 7,0, NaCl 100 mM; 5a) proteína solúvel em 20 mM HEPES pH 7,0, NaCl 300 mM; 7a) proteína solúvel em 50 mM Tris-HCl pH 8,5, NaCl 100 mM; 9a) proteína solúvel em 50 mM Tris-HCl pH 8,5, NaCl 300 mM; Em b) Frações insolúvel (1.b) e solúvel (2.b) em tampão 50 mM MES pH 5,5, NaCl 100 mM; 3b) Marcador de massa molecular (GE); 4b) fração insolúvel e 5b) proteína solúvel com 50 mM MES pH 5,5, NaCl 300 mM. Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de comassie.

IV.6 Purificação da MBP:rgs-CaM

No processo de purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade, durante a eluição, um pico único foi observado no cromatograma (não mostrado). As frações presentes nesse intervalo foram coletadas e concentradas. Uma alíquota foi então retirada da fração concentrada e analisada em gel SDS-PAGE 12%, o que permitiu confirmar a presença da proteína de fusão purificada (Figura 12). O rendimento da expressão da proteína recombinante foi determinado em espectrofotômetro NanoDrop, sendo que para cada 1 litro de cultura de bactéria induzida obteve-se 10 mg de proteína.

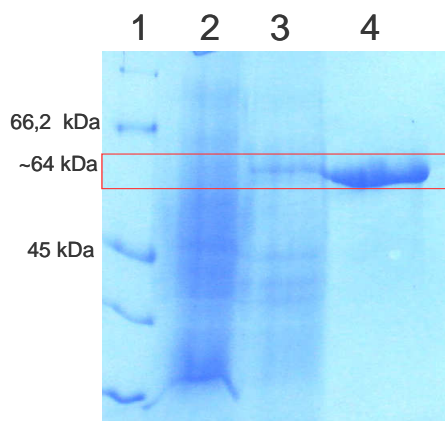


Figura 12. Visualização da proteína de fusão MBP:rgs-CaM após purificação. 1) Marcador de massa molecular (Fermentas); 2) Extrato protéico de células não induzidas; 3) Extrato protéico de células induzidas; 4) proteína purificada presente na fração concentrada. Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de comassie.

IV.7 Análise das propriedades físicas por DLS

Testes preliminares empregando o tampão Tris pH 8,5 contendo NaCl 100 mM resultaram em amostras com alta polidispersidade (Figura 13). Porém, quando 0,25% de Tween 20 foi acrescentado a este tampão, melhores resultados de polidispersidade foram obtidos (Figuras 14 e 15), o que gerou as condições adequadas para se iniciar os testes de cristalização. Os resultados obtidos na temperatura de 18°C foram: raio hidrodinâmico (Rh) 3,8 nm, polidispersidade (%Pd) 15,8, e massa molecular equivalente a uma macromolécula de 77 kDa (Figura 14). Quando a temperatura foi elevada de 18°C para 25°C, os valores obtidos foram: Rh = 4,8, %Pd = 16,9, e massa molecular de aproximadamente 132 kDa (Figura 15).

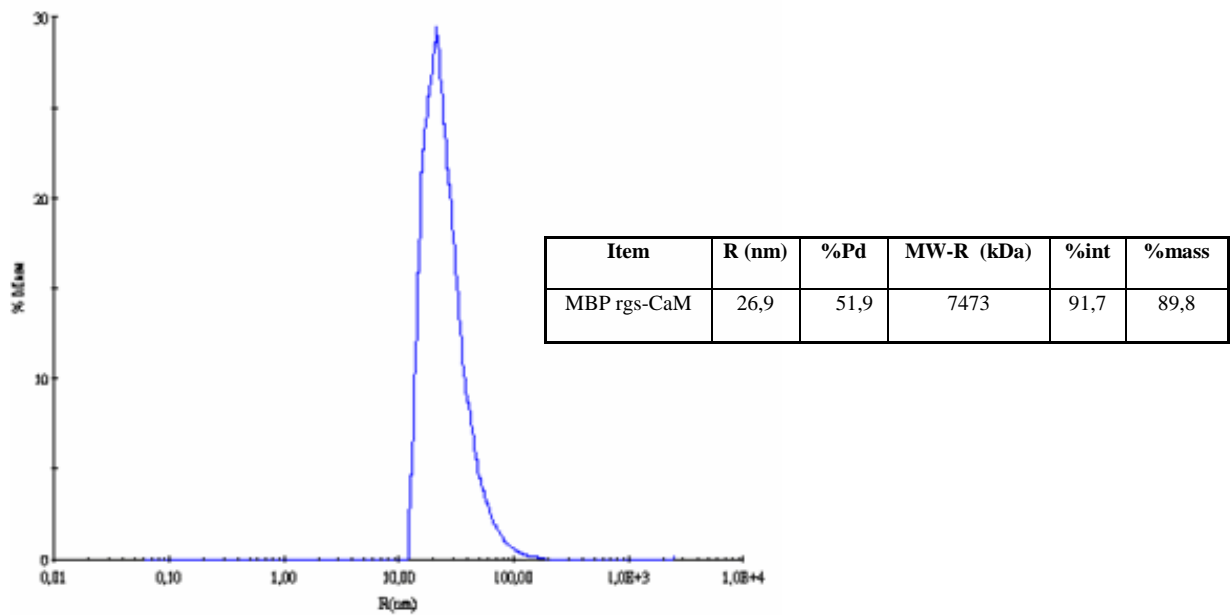


Figura 13. Dados de DLS obtidos para a proteína de fusão MBP:rgs-CaM em tampão Tris pH 8,5; NaCl 100 mM; Temperatura 18°C.

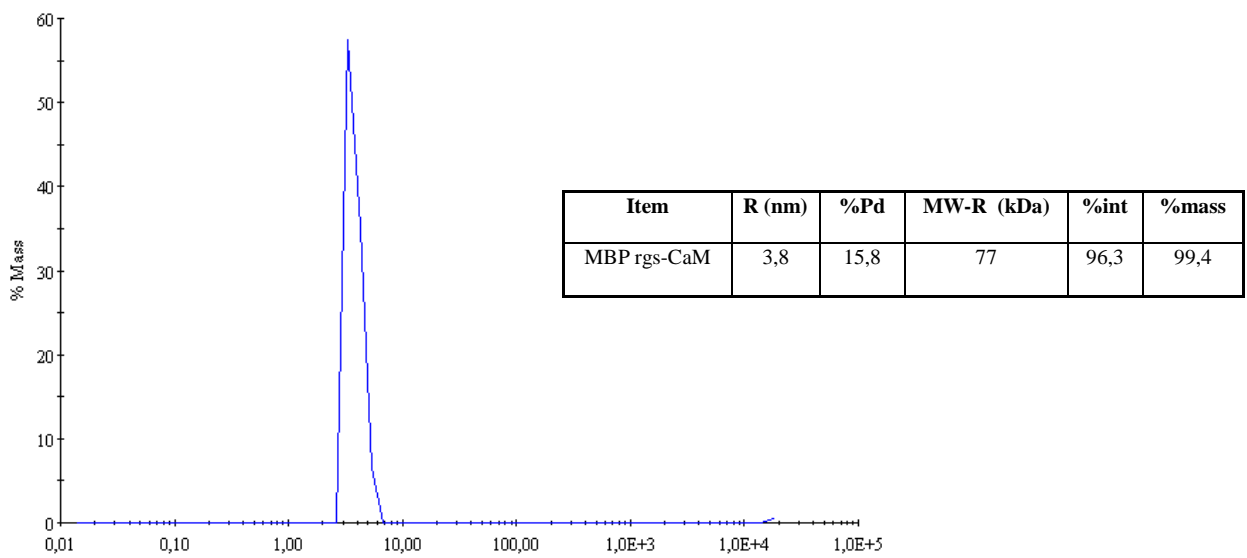


Figura 14. Dados de DLS obtidos para a proteína de fusão MBP:rgs-CaM em tampão Tris pH 8,5; NaCl 100 mM em presença de Tween 0,25%; Temperatura 18°C.

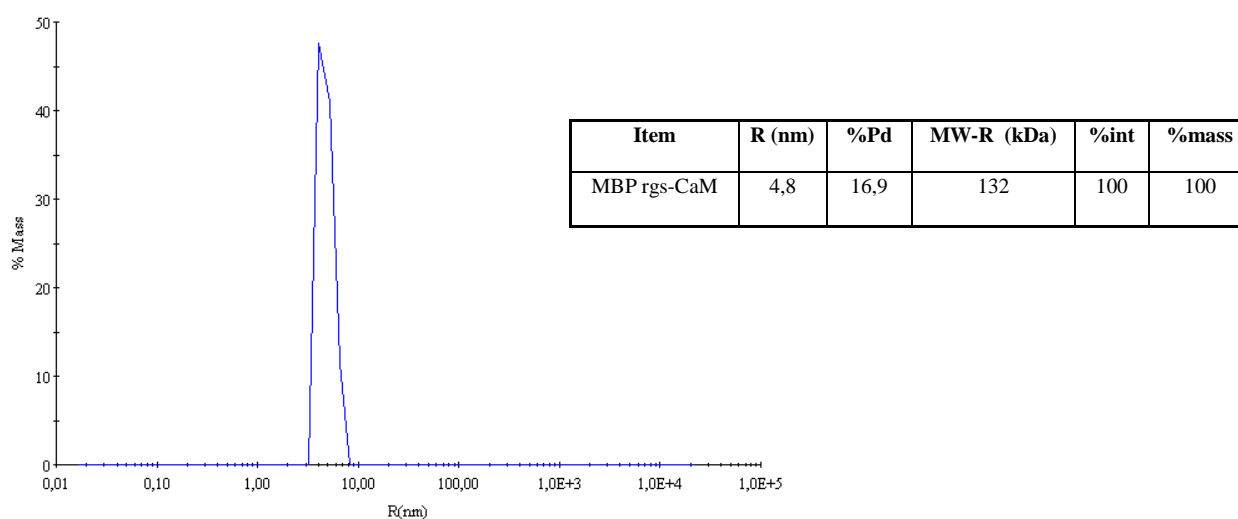


Figura 15. Dados de DLS obtidos para a proteína de fusão MBP:rgs-CaM em tampão Tris pH 8,5; NaCl 100 mM em presença de Tween 0,25%; Temperatura 25°C.

IV.8 Análise de Dicroísmo Circular da proteína MBP:rgs-CaM

A estrutura secundária da proteína MBP:rgs-CaM foi investigada por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) na região espectral do ultravioleta (190-260 nm). Os ensaios de CD detectaram as seguintes proporções de cada estrutura secundária: 36% de alfa-hélice, 15% de folha-beta, 16% de alça (*beta turn*) e 32% de estruturas aleatórias (*random coil*). Além disso, os ensaios de CD foram realizados para identificar eventuais diferenças estruturais induzidas pela remoção dos íons Ca^{2+} por EGTA (um agente quelante, compatível com CD). Nesse caso, uma diferença de espectro após a adição de 1 mM EGTA foi observada (Figura 16; Tabela 2), evidenciando a perda de estrutura em alfa-hélice.

Tabela 1: Estrutura secundária da proteína MBP:rgs-CaM determinada por espectroscopia de dicroísmo circular (CD).

<i>CD predição para MBP:rgs-CaM</i>	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm	#aa
Hélice	36.9%	36.6%	35.9%	36.2%	216
Antiparalela	6.9%	7.5%	7.3%	7.5%	40
Paralela	8.1%	8.2%	8.3%	8.0%	47
Alça	16.0%	16.1%	16.2%	16.3%	94
Estruturas aleatórias	32.0%	31.8%	31.7%	31.3%	187
Total	99.9%	100.1%	99.4%	99.3%	584
Subtotal Beta (anti /para)	15.0%	15.7%	15.6%	15.5%	

Tabela 2: Estrutura secundária da proteína MBP:rgs-CaM determinada por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) em presença de 1 mM EGTA.

Predição	195-260 nm	200-260 nm	205-260 nm	210-260 nm	#aa
Hélice	34.3%	34.8%	35.0%	34.9%	200
Antiparalela	8.3%	8.0%	7.5%	7.8%	49
Paralela	8.5%	8.5%	8.6%	8.3%	50
Alça	16.5%	16.5%	16.4%	16.6%	96
Estruturas aleatórias	32.4%	32.3%	32.2%	32.1%	189
Total	100.1%	100.0%	99.7%	99.6%	584
Subtotal Beta (anti /para)	16.8%	16.5%	16.1%	16.1%	

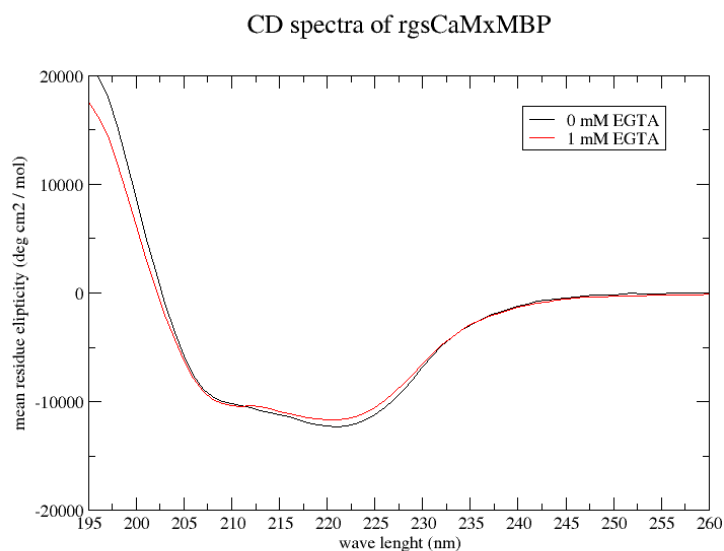


Figura 16. Espectro de CD da proteína recombinante MBP:rgs-CaM em presença ou ausência de EGTA . A linha azul representa amostra sem adição de EGTA, e a linha vermelha representa adição de 1 mM de EGTA.

IV.9 Predição *in silico* da estrutura secundária

Predições de bioinformática também foram realizadas usando a proteína rgs-CaM fusionada a MBP (Tabela 3), ou a proteína MBP (Tabela 4). Os resultados dessa predição indicam uma prevalência de alfa-hélices em ambas as proteínas analisadas (37,67% para a proteína de fusão e 35,38% para a MBP).

Tabela 3: Predição teórica da estrutura secundária da MBP:rgs-CaM

MBP:rgs-CaM	#aa	%
Alfa hélice	220	37.67%
Folha-beta	115	19.69%
Alça	61	10.45%
Estruturas aleatórias	188	32.19%
Total	584	100%

Tabela 4: Predição teórica da estrutura secundária da MBP (maltose-binding-protein)

MBP	#aa	%
Alfa hélice	138	35.38%
Folha-beta	76	19.49%
Alça	42	10.77%
Estruturas aleatórias	134	34.36%
Total	390	100%

V. DISCUSSÃO

No presente trabalho, a expressão da proteína rgs-CaM em *E. coli* BL-21 (DE3) Rosetta foi empreendida utilizando-se o plasmídeo pMal-c2E. As condições ideais de indução da expressão da proteína recombinante foram: adição de 1 mM de IPTG, temperatura de 28°C com período de incubação de 4 horas. Ensaio adicionais empregando outros plasmídeos (pET-28a , pET-29a e pGEX) bem como outras cepas de bactérias não foram satisfatórios.

A correta inserção da região codificadora da rgs-CaM no vetor de expressão foi confirmada por digestão com enzimas de restrição e sequenciamento. Cabe ressaltar que no sequenciamento observou-se uma total similaridade (100%) com a sequência deduzida de aminoácidos da rgs-CaM depositada no banco de dados do NCBI, além da proteína recombinante obtida após a indução apresenta massa molecular de ~ 64 kDa que é o esperado para a proteína de fusão MBP:rgs-CaM.

Testes de solubilidade foram realizados a fim de encontrar o tampão ideal para posterior purificação da proteína. Em todos os tampões testados a proteína de fusão esteve presente na fração solúvel, exceção feita ao tampão 50 mM MES pH 5,5 contendo 100 mM de NaCl. O tampão selecionado para os testes seguintes foi o tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,5 contendo 100 mM NaCl, pois nesta condição obteve-se boa quantidade de proteína recombinante na fração solúvel na presença de menor quantidade de sal. Os resultados dos ensaios de purificação da proteína de fusão MBP:rgs-CaM por cromatografia de afinidade em resina de amilose foram satisfatórios, e possibilitaram a obtenção de proteína pura e aparentemente livre de contaminantes. O rendimento total foi de 10 mg de proteína pura para cada 1 litro de cultura bacteriana induzida, quantificação essa obtida em espectrofotômetro. A quantidade de proteína recombinante obtida é suficiente para a realização das análises funcional e estrutural, bem como para se iniciar os testes de cristalização da proteína.

Os resultados obtidos no DLS são fundamentais para se conseguir o crescimento de cristais de proteína de boa qualidade, pois esta técnica permite avaliar a polidispersidade da proteína em solução, e, em condições de baixa polidispersidade, maior é a probabilidade de cristalização da proteína (D'arcy, 1994; Ferre-D'amare & Burley, 1994). A polidispersidade é alterada em função da variação de parâmetros como temperatura, pH, tampão, concentração de sal e outras substâncias. Essa técnica também permite analisar outras propriedades como: raio hidrodinâmico e massa molecular da proteína em solução, fornecendo dados sobre a oligomerização da proteína (Bloomfield, 2000).

A proteína de fusão MBP:rgs-CaM foi testada em diversas condições a fim de se obter os menores valores possíveis de polidispersidade. Após testes com diferentes combinações de pH, temperatura, tampão e aditivos, encontrou-se uma condição com baixa polidispersidade (15,8%) utilizando-se o tampão Tris pH 8,5; NaCl 100mM; Tween 0,25%. A adição de Tween 20 se mostrou fundamental para a baixa polidispersidade, pois na sua ausência há formação de diversos aglomerados, aumentando assim a polidispersidade (51,9%), condição que diminuiria a probabilidade de cristalização da proteína. Nessa condição, a massa molecular da proteína recombinante é de 77 kDa, valor que está próximo do valor estimado (64 kDa). É importante ressaltar que os resultados obtidos no DLS correspondem a valores aproximados, já que o cálculo da massa molecular é feito com base no raio hidrodinâmico, e leva em consideração proteínas perfeitamente globulares (Wilson, 2003). Na referida condição (Tris pH 8,5; NaCl 100mM; Tween 0,25%), ao se variar a temperatura de 18°C para 25°C, a massa molecular da proteína muda de 77 kDa para 132 kDa. Esta variação na massa molecular pode estar relacionada com mudanças estruturais sofridas pela proteína em solução, já que ao se aumentar a temperatura, aumenta-se o raio hidrodinâmico da proteína em solução, e altera-se conseqüentemente a massa molecular estimado pelo DLS.

A análise de Dicroísmo Circular (CD) tem a capacidade de detectar a absorção diferencial dos componentes levógiro e dextrógiro de uma radiação circularmente polarizada. Tal efeito ocorre quando uma molécula possui cromóforo quiral (opticamente ativo) ou quando está presente em um meio quiral. A existência de interações específicas da luz com os cromóforos presentes nas proteínas (ligação peptídica, pontes dissulfeto e resíduos aromáticos), produz espectros característicos para cada tipo de estrutura secundária e terciária presentes na proteína, espectros esses que podem ser avaliados por CD (Woody, 1995; Kelly & Price, 1997).

Até o momento não existem relatos na literatura de estudos estruturais sobre a proteína rgs-CaM. As análises de CD empregando a proteína rgs-CaM fusionada a MBP evidenciaram um alto conteúdo de alfa-hélices (Tabela 1), além de estruturas secundárias do tipo folha-beta e alça, indicando uma proteína estruturada. Predições *in silico* da estrutura secundária da proteína MBP:rgs-CaM também indicaram uma predominância de alfa-hélices (Tabela 3), reforçando os dados obtidos no CD. A predição *in silico* da MBP indicou 138 aminoácidos em região de alfa-hélice, enquanto que para a proteína de fusão MBP:rgs-CaM foram detectados 216 aminoácidos em região de alfa hélice. Estes dados sugerem que tanto a MBP (proteína carreadora) quanto a rgs-CaM estão bem estruturadas, caso contrário, a quantidade de alfa-hélices seria menor. Uma mudança de espectro foi observada quando a proteína de fusão foi colocada em presença de 1 mM de EGTA, sugerindo perdas estruturais em regiões de alfa-hélice, provavelmente por remoção de íons Ca^{2+} da estrutura da proteína. Essa mudança era esperada considerando o conhecido efeito dos íons Ca^{2+} na estrutura das calmodulinas (De Koninck & Schulman, 1998; Bouche *et al.*, 2005; Huang & Liu, 2007).

De maneira geral, esses dados indicam que a proteína rgs-CaM obtida no presente trabalho atendeu às exigências de pureza e quantidade necessárias para que testes de cristalização possam ser iniciados, e para que novos estudos funcionais sejam empreendidos.

VI. CONCLUSÕES

- A proteína rgs-CaM foi expressa com êxito em *E. coli* na forma de uma proteína de fusão com a MBP;
- A proteína de fusão MBP:rgs-CaM apresenta tendência em formar agregados de tamanhos diversos que podem ser desfeitos com a adição de Tween 20;
- Experimentos de espectroscopia revelam que a proteína recombinante apresenta alta predominância de alfa-hélices, sugerindo uma proteína estruturada;
- A adição de EGTA causa perda de estrutura alfa hélice da MBP:rgs-CaM, provavelmente pela remoção de íons Ca^{2+} da estrutura;

VII. PERSPECTIVAS

- Iniciar os ensaios de cristalização da proteína MBP:rgs-CaM, e uma vez obtidos cristais, utilizar-se da difração de raio-X para resolver suas estruturas tridimensionais;
- Testar *in vitro* a interação entre a proteína rgs-CaM e a proteína viral HC-Pro, e caso se confirme essa interação, determinar a região de interação entre as proteínas;

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, G. S.; REDDY, V. S.; LINDGREN, P. B.; JAKOBEK, J. L.; REDDY, A. S. Differential expression of genes encoding calmodulin-binding proteins in response to bacterial pathogens and inducers of defense responses. **Plant Mol Biol**, v.51, p.803-815, 2003.
- ANANDALAKSHMI, R.; MARATHE, R.; GE, X.; HERR, J. M., JR.; MAU, C.; MALLORY, A.; PRUSS, G.; BOWMAN, L.; VANCE, V. B. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, v.290, p.142-144, 2000.
- ANANDALAKSHMI, R.; PRUSS, G. J.; GE, X.; MARATHE, R.; MALLORY, A. C.; SMITH, T. H.; VANCE, V. B. A viral suppressor of gene silencing in plants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, p.13079-13084, 1998.
- BABU, Y. S.; SACK, J. S.; GREENHOUGH, T. J.; BUGG, C. E.; MEANS, A. R.; COOK, W. J. Three-dimensional structure of calmodulin. **Nature**, v.315, p.37-40, 1985.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v.116, p.281-297, 2004.
- BECLIN, C.; BERTHOME, R.; PALAUQUI, J. C.; TEPFER, M.; VAUCHERET, H. Infection of tobacco or Arabidopsis plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans)genes. **Virology**, v.252, p.313-317, 1998.
- BERGER, P. H.; WYATT, S. D.; SHIEL, P. J.; SILBERNAGEL, M. J.; DRUFFEL, K.; MINK, G. I. Phylogenetic analysis of the Potyviridae with emphasis on legume-infecting potyviruses. **Arch Virol**, vol.142(10), p.99-1979, 1997.
- BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M.; HANNON, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v.409, p.363-366, 2001.
- BLOOMFIELD, V. A. Static and dynamic light scattering from aggregating particles. **Biopolymers**, v.54, p.168-172, 2000.
- BOHM, G. CDNN: CD spectra deconvolution software version 2.1. Univ. of Halle-Wittenberg, Halle, Germany, 1997.
- BOUCHE, N.; YELLIN, A.; SNEDDEN, W. A.; FROMM, H. Plant-specific calmodulin-binding proteins. **Annu Rev Plant Biol**, v.56, p.435-466, 2005.
- BRIGNETI, G.; VOINNET, O.; LI, W. X.; JI, L. H.; DING, S. W.; BAULCOMBE, D. C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **EMBO J**, v.17, p.6739-6746, 1998.
- CAMPOS-PEREIRA, T. Estudo da atividade de supressão da proteína HC-Pro e análises do perfil de expressão de PTGS em cana-de-açúcar. **Tese** (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Campinas, p.60, 2002.

CARRINGTON, J. C.; AMBROS, V. Role of microRNAs in plant and animal development. **Science**, v.301, p.336-338, 2003.

CARRINGTON, J. C.; FREED, D. D.; SANDERS, T. C. Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. **J Virol**, v.63, p.4459-4463, 1989.

COLLER, J.; PARKER, R. General translational repression by activators of mRNA decapping. **Cell**, v.122, p.875-886, 2005.

CRONIN, S.; VERCHOT, J.; HALDEMAN-CAHILL, R.; SCHAAD, M. C.; CARRINGTON, J. C. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. **Plant Cell**, v.7, p.549-559, 1995.

D'ARCY, A. Crystallizing proteins - a rational approach? **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.50, p.469-471, 1994.

DAWE, R. K. RNA interference, transposons, and the centromere. **Plant Cell**, v.15, p.297-301, 2003.

DE KONINCK, P.; SCHULMAN, H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. **Science**, v.279, p.227-230, 1998.

DELANY, I.; SPOHN, G.; PACHECO, A. B.; IEVA, R.; ALAIMO, C.; RAPPUOLI, R.; SCARLATO, V. Autoregulation of *Helicobacter pylori* Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site. **Mol Microbiol**, v. 46, p.1107-1122, 2002.

DING, S. W.; VOINNET, O. Antiviral immunity directed by small RNAs. **Cell**, v.130, p.413-426, 2007.

DOUGHERTY, W. G.; PARKS, T. D. Transgenes and gene suppression: telling us something new? **Curr Opin Cell Biol**, v.7, p.399-405, 1995.

DUVAL, F. D.; RENARD, M.; JAQUINOD, M.; BIOU, V.; MONTRICHARD, F.; MACHEREL, D. Differential expression and functional analysis of three calmodulin isoforms in germinating pea (*Pisum sativum* L.) seeds. **Plant J**, v.32, p.481-493, 2002.

ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes Dev**, v.15, p.188-200, 2001.

FERRE-D'AMARE, A. R.; BURLEY, S. K. Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. **Structure**, v.2, p.357-359, 1994.

GAZZANI, S.; LAWRENSEN, T.; WOODWARD, C.; HEADON, D.; SABLONSKI, R. A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. **Science**, v.306, p.1046-1048, 2004.

- GUO, D.; MERITS, A.; SAARMA, M. Self-association and mapping of interaction domains of helper component-proteinase of potato A potyvirus. **J Gen Virol**, v.80 (Pt 5), p.1127-1131, 1999.
- GY, I.; GASCIOLLI, V.; LAURESSERGUES, D.; MOREL, J. B.; GOMBERT, J.; PROUX, F.; PROUX, C.; VAUCHERET, H.; MALLORY, A. C. Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. **Plant Cell**, v.19, p.3451-3461, 2007.
- HAMILTON, A. J.; BAULCOMBE, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, v.286, p.950-952, 1999.
- HAMMOND, S. M. RNAi, microRNAs, and human disease. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.58 Suppl 1, p.s63-68, 2006.
- HAMMOND, S. M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D.; HANNON, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. **Nature**, v.404, p.293-296, 2000.
- HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v.418, p.244-251, 2002.
- HIMBER, C.; DUNOYER, P.; MOISSIARD, G.; RITZENTHALER, C.; VOINNET, O. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. **EMBO J**, v.22, p.4523-4533, 2003.
- HOEFLICH, K. P.; IKURA, M. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. **Cell**, v.108, p.739-742, 2002.
- HUANG, B. C.; LIU, R. Comparison of mRNA-display-based selections using synthetic peptide and natural protein libraries. **Biochemistry**, v.46, p.10102-10112, 2007.
- HUTVAGNER, G.; ZAMORE, P. D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. **Science**, v.297, p.2056-2060, 2002.
- IIDA, T.; KAWAGUCHI, R.; NAKAYAMA, J. Conserved ribonuclease, Eri1, negatively regulates heterochromatin assembly in fission yeast. **Curr Biol**, v.16, p.1459-1464, 2006.
- IKURA, M.; CLORE, G. M.; GRONENBORN, A. M.; ZHU, G.; KLEE, C. B.; BAX, A. Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. **Science**, v.256, p.632-638, 1992.
- KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C. Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. **Virology**, v.209, p.268-273, 1995.
- KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. **Cell**, v.95, p.461-470, 1998.
- KASSCHAU, K. D.; CRONIN, S.; CARRINGTON, J. C. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. **Virology**, v.228, p.251-262, 1997.

KASSCHAU, K. D.; FAHLGREN, N.; CHAPMAN, E. J.; SULLIVAN, C. M.; CUMBIE, J. S.; GIVAN, S. A.; CARRINGTON, J. C. Genome-wide profiling and analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS Biol*, v.5, p.e57, 2007.

KASTENMAYER, J. P.; GREEN, P. J. Novel features of the XRN-family in Arabidopsis: evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.97, p.13985-13990, 2000.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim Biophys Acta*, v.1338, p.161-185, 1997.

KENNEDY, S.; WANG, D.; RUVKUN, G. A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature*, v.427, p.645-649, 2004.

KLAHRE, U.; CRETE, P.; LEUENBERGER, S. A.; IGLESIAS, V. A.; MEINS, F., JR. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, p.11981-11986, 2002.

KOOTER, J. M.; MATZKE, M. A.; MEYER, P. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci*, v.4, p.340-347, 1999.

KRETSINGER, R. H. Calcium coordination and the calmodulin fold: divergent versus convergent evolution. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, v.52, p.499-510, 1987.

KUMAR, M.; CARMICHAEL, G. G. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*, v.62, p.1415-1434, 1998.

LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RADMARK, O.; KIM, S.; KIM, V. N. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, v.425, p.415-419, 2003.

LI, W. X.; DING, S. W. Viral suppressors of RNA silencing. *Curr Opin Biotechnol*, v.12, p.150-154, 2001.

LIU, H. T.; LI, B.; SHANG, Z. L.; LI, X. Z.; MU, R. L.; SUN, D. Y.; ZHOU, R. G. Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat. *Plant Physiol*, v.132, p.1186-1195, 2003.

LU, C.; TEJ, S.S.; LUO, S.; HAUDENSCHILD, C. D.; MEYERS, B. C.; GREEN, P. J. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science*, v.309, p. 1567-1569, 2005.

LUCAS, W. J.; YOO, B. C.; KRAGLER, F. RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.2, p.849-857, 2001.

MA, L.; XU, X.; CUI, S.; SUN, D. The presence of a heterotrimeric G protein and its role in signal transduction of extracellular calmodulin in pollen germination and tube growth. *Plant Cell*, v.11, p.1351-1364, 1999.

MAIA, I. G.; BERNARDI, F. Nucleic acid-binding properties of a bacterially expressed potato virus Y helper component-proteinase. **J Gen Virol**, v.77 (Pt 5), p.869-877, 1996.

MAIA, I. G.; HAENNI, A.; BERNARDI, F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. **J Gen Virol**, v.77 (Pt 7), p.1335-1341, 1996.

MALLORY, A. C.; MLOTSHWA, S.; BOWMAN, L. H.; VANCE, V. B. The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. **Plant J**, v.35, p.82-92, 2003.

MALLORY, A. C.; REINHART, B. J.; BARTEL, D.; VANCE, V. B.; BOWMAN, L. H. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, p.15228-15233, 2002.

MALLORY, A. C.; VAUCHERET, H. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. **Nat Genet**, v.38 Suppl, p.S31-36, 2006.

MATRANGA, C.; TOMARI, Y.; SHIN, C.; BARTEL, D. P.; ZAMORE, P. D. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. **Cell**, v.123, p.607-620, 2005.

MATZKE, M.; MATZKE, A. J. RNAi extends its reach. **Science**, v.301, p.1060-1061, 2003.

MATZKE, M.; MATZKE, A. J.; KOOTER, J. M. RNA: guiding gene silencing. **Science**, v.293, p.1080-1083, 2001.

MEADOR, W. E.; MEANS, A. R.; QUIOCHO, F. A. Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 A structure of a calmodulin-peptide complex. **Science**, v.257, p.1251-1255, 1992.

MLOTSHWA, S.; VOINNET, O.; METTE, M. F.; MATZKE, M.; VAUCHERET, H.; DING, S. W.; PRUSS, G.; VANCE, V. B. RNA silencing and the mobile silencing signal. **Plant Cell**, v.14 Suppl, p.S289-301, 2002.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. **Plant Cell**, v.2, p.279-289, 1990.

NOWOTNY, M.; YANG, W. Structural and functional modules in RNA interference. **Curr Opin Struct Biol**, v.19, p.286-293, 2009.

NYKANEN, A.; HALEY, B.; ZAMORE, P. D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. **Cell**, v.107, p.309-321, 2001.

PADMANABHAN, C.; ZHANG, X.; JIN, H. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. **Curr Opin Plant Biol**, v.12, p.465-472, 2009.

PALAUQUI, J. C.; ELMAYAN, T.; POLLIEN, J. M.; VAUCHERET, H. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. **EMBO J**, v.16, p.4738-4745, 1997.

PLASTERK, R. H. RNA silencing: the genome's immune system. **Science**, v.296, p.1263-1265, 2002.

PLISSON, C.; DRUCKER, M.; BLANC, S.; GERMAN-RETANA, S.; LE GALL, O.; THOMAS, D.; BRON, P. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. **J Biol Chem**, v.278, p.23753-23761, 2003.

POPESCU, S. C.; POPESCU, G. V.; BACHAN, S.; ZHANG, Z.; SEAY, M.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M.; DINESH-KUMAR, S. P. Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density Arabidopsis protein microarrays. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, p.4730-4735, 2007.

PROVOST, P.; SILVERSTEIN, R. A.; DISHART, D.; WALFRIDSSON, J.; DJUPEDAL, I.; KNIOLA, B.; WRIGHT, A.; SAMUELSSON, B.; RADMARK, O.; EKWALL, K. Dicer is required for chromosome segregation and gene silencing in fission yeast cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, p.16648-16653, 2002.

PRUSS, G.; GE, X.; SHI, X. M.; CARRINGTON, J. C.; BOWMAN VANCE, V. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. **Plant Cell**, v.9, p.859-868, 1997.

RAJAGOPALAN, R.; VAUCHERET, H.; TREJO, J.; BARTEL, D. P. A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*, v.20, 3407-3425, 2006.

RAMACHANDRAN, V.; CHEN, X. Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. **Science**, v.321, p.1490-1492, 2008.

REDDY, A. S. Calcium: silver bullet in signaling. **Plant Sci**, v.160, p.381-404, 2001.

RIECHMANN, J. L.; LAIN, S.; GARCIA, J. A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. **J Gen Virol**, v.73 (Pt 1), p.1-16, 1992.

ROJAS, M. R.; ZERBINI, F. M.; ALLISON, R. F.; GILBERTSON, R. L.; LUCAS, W. J. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. **Virology**, v.237, p.283-295, 1997.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning laboratory manual ed. 3. **Cold Spring Harbor Press**. Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SARMIENTO, C.; NIGUL, L.; KAZANTSEVA, J.; BUSCHMANN, M.; TRUVE, E. AtRLI2 is an endogenous suppressor of RNA silencing. **Plant Mol Biol**, v.61, p.153-163, 2006.

SHI, X. M.; MILLER, H.; VERCHOT, J.; CARRINGTON, J. C.; VANCE, V. B. Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. **Virology**, v.231, p.35-42, 1997.

SIJEN, T.; WELLINK, J.; HIRIART, J. B.; VAN KAMMEN, A. RNA-Mediated Virus Resistance: Role of Repeated Transgenes and Delineation of Targeted Regions. **Plant Cell**, v.8, p.2277-2294, 1996.

SILHAVY, D.; MOLNAR, A.; LUCIOLI, A.; SZITTYA, G.; HORNYIK, C.; TAVAZZA, M.; BURGYN, J. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. **EMBO J**, v.21, p.3070-3080, 2002.

SISTRUNK, M. L.; ANTOSIEWICZ, D. M.; PURUGGANAN, M. M.; BRAAM, J. Arabidopsis TCH3 encodes a novel Ca²⁺ binding protein and shows environmentally induced and tissue-specific regulation. **Plant Cell**, v.6, p.1553-1565, 1994.

SLEDZ, C. A.; WILLIAMS, B. R. RNA interference in biology and disease. **Blood**, v.106, p.787-794, 2005.

SNEDDEN, W.; FROMM, H. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. **New Phytol**, vol.151, p.35-66, 2001.

SOURET, F. F.; KASTENMAYER, J. P.; GREEN, P. J. AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. **Mol Cell**, v.15, p.173-183, 2004.

TANG, G.; REINHART, B. J.; BARTEL, D. P.; ZAMORE, P. D. A biochemical framework for RNA silencing in plants. **Genes Dev**, v.17, p.49-63, 2003.

TOMARI, Y.; MATRANGA, C.; HALEY, B.; MARTINEZ, N.; ZAMORE, P. D. A protein sensor for siRNA asymmetry. **Science**, v.306, p.1377-1380, 2004.

TOWNLEY, H. E.; KNIGHT, M. R. Calmodulin as a potential negative regulator of Arabidopsis COR gene expression. **Plant Physiol**, v.128, p.1169-1172, 2002.

URCUQUI-INCHIMA, S.; MAIA, I. G.; ARRUDA, P.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. **Virology**, v.268, p.104-111, 2000.

VAN DER KROL, A. R.; MUR, L. A.; BELD, M.; MOL, J. N.; STUITJE, A. R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **Plant Cell**, v.2, p.291-299, 1990.

VAN DER LUIT, A. H.; OLIVARI, C.; HALEY, A.; KNIGHT, M. R.; TREWAVAS, A. J. Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. **Plant Physiol**, v.121, p.705-714, 1999.

VANCE, V. B.; BERGER, P. H.; CARRINGTON, J. C.; HUNT, A. G.; SHI, X. M. 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. **Virology**, v.206, p.583-590, 1995.

VARGASON, J. M.; SZITTYA, G.; BURGYN, J.; HALL, T. M. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. **Cell**, v.115, p.799-811, 2003.

SHREY, K.; SUCHIT, A.; NISHANT, M.; VIBHA, R. RNA interference: Emerging diagnostics and therapeutics tool. **Biochim and Biophys Research**, v.386, p.273-277, 2009.

VAUCHERET, H.; BECLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **J Cell Sci**, v.114, p.3083-3091, 2001.

VOINNET, O.; PINTO, Y. M.; BAULCOMBE, D. C. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, p.14147-14152, 1999.

VOINNET, O.; VAIN, P.; ANGELL, S.; BAULCOMBE, D. C. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. **Cell**, v.95, p.177-187, 1998.

VOLPE, T. A.; KIDNER, C.; HALL, I. M.; TENG, G.; GREWAL, S. I.; MARTIENSSEN, R. A. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. **Science**, v.297, p.1833-1837, 2002.

WATERHOUSE, P. M.; WANG, M. B.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. **Nature**, v.411, p.834-842, 2001.

WILSON, W. W. Light scattering as a diagnostic for protein crystal growth--a practical approach. **J Struct Biol**, v.142, p.56-65, 2003.

WINSTON, W. M.; MOLODOWITCH, C.; HUNTER, C. P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. **Science**, v.295, p.2456-2459, 2002.

WOODY, R. W. Circular dichroism. **Methods Enzymol**, v.246, p.34-71, 1995.

YANG, T.; LEV-YADUN, S.; FELDMAN, M.; FROMM, H. Developmentally regulated organ-, tissue-, and cell-specific expression of calmodulin genes in common wheat. **Plant Mol Biol**, v.37, p.109-120, 1998.

YANG, T.; POOVAIAH, B. W. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. **Plant Sci**, v.8, p.505-512, 2003.

YANG, T.; POOVAIAH, B. W. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, p.4097-4102, 2002.

YANG, T.; SEGAL, G.; ABBO, S.; FELDMAN, M.; FROMM, H. Characterization of the calmodulin gene family in wheat: structure, chromosomal location, and evolutionary aspects. **Mol Gen Genet**, v.252, p.684-694, 1996.

ZAMORE, P. D.; TUSCHL, T.; SHARP, P. A.; BARTEL, D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. **Cell**, v.101, p.25-33, 2000.