

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Edmárcia Elisa de Souza

Clonagem, Expressão e Purificação de Domínios da Proteína AtRLI2 (RNase L Inhibitor), um Supressor Endógeno de Silenciamento por RNA de *Arabidopsis thaliana*, Visando Estudos Estruturais

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Genética do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Genética.

Botucatu-SP
Jan/2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Edmárcia Elisa de Souza

Clonagem, Expressão e Purificação de Domínios da Proteína AtRLI2 (RNase L Inhibitor), um Supressor Endógeno de Silenciamento por RNA de *Arabidopsis thaliana*, Visando Estudos Estruturais

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes
Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Sérgio Kimus Braz

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Genética do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Genética.

Botucatu-SP
Jan/2010

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Selma Maria de Jesus*

Souza, Edmárcia Elisa de.

Clonagem, expressão e purificação de domínios da proteína AtRLI2 (RNase L Inhibitor), um supressor endógeno de silenciamento por RNA de *Arabidopsis thaliana*, visando estudos estruturais / Edmárcia Elisa de Souza. – Botucatu : [s.n.], 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Co-orientador: Antonio Sérgio Kimus Braz

Assunto CAPES: 20801017

1. Proteína AtRLI2
2. Arabidopsis - Genética - Estudos experimentais

CDD 547.75

Palavras-chave: AtRLI2; Cristalografia de proteínas; RNase L inhibitor; Purificação de proteína; Silenciamento por RNA

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais José e Erotilde, pela compreensão de
minha ausência.*

*Aos meus irmãos Márcio e Kathiani, pela admiração e por sempre acreditarem em
minha capacidade.*

AGRADECIMENTOS

Um pouco de história:

Há 4 anos saí do Mato Grosso do Sul, meu querido estado, para realizar um sonho: cursar pós-graduação. Nestes 4 anos arrisquei-me numa nova cidade, em novos amigos.... Amigos que me viram esforçada, dedicada, às vezes triste e preocupada, espontânea, imediatista, teimosa e persistente com a realização do meu trabalho. Sem jamais perder a esperança, entre tantos desafios e percalços pelo caminho, hoje estou aqui, no intuito de concretizar esse sonho.

Agradeço primeiramente a **Deus** pela força de vontade e coragem de seguir em frente, de aceitar os desafios e de acreditar que podemos dar certo quando nos esforçamos.

Agradeço aos meus queridos pais José e Erotilde pela força, pelo apoio aos meus planos, e por entenderem que a ausência seria necessária para que pudesse concretizá-los. Vocês são a razão pela qual acordo todos os dias e sigo com coragem em busca dos meus objetivos!

Agradeço aos meus irmãos Márcio e Kathiani, pela irreverência com o meu trabalho e por sempre acreditarem em minha capacidade.

Meus agradecimentos ao meu orientador Marcos Roberto de Mattos Fontes, por sua receptividade e atenção, por apoiar e acreditar em meu trabalho.

Ao Dr. Antônio Sérgio Kimus Braz, por me apresentar ao mundo da ciência.

Ao professor Ivan de Godoy Maia, pelo uso do laboratório e reagentes, sem os quais a realização deste trabalho seria impossível. Agradeço a boa convivência e colaboração com o trabalho.

À Juliana Bravo e Flávio (Bonsai) pela ajuda nas análises do Sequenciamento do DNA e pela troca de informações em outros momentos. Vocês são Bons Amigos!!!

À Agnes pela ajuda no manuseio do Cromatógrafo e em outros momentos.

À Ana Angelita, pelas dicas para a dissertação.

Agradeço, à Regiane Degan Fávaro- Instituto Butantan - SP, pela realização do Sequenciamento do DNA.

À Débora Colombi pela realização do teste ELISA e colaboração.

Agradeço à secretaria do Departamento de Genética em especial à Aline e José pela disposição e apoio as questões burocráticas. Obrigada pela paciência das frequentes procuras!

À professora Maria Isabel Cano pelas indicações dos últimos momentos e a disponibilização de seu laboratório para realização do *Western Blotting* e outros experimentos. A todo seu grupo em especial às suas queridas alunas: Arina, Camila e Rita por me apoiarem.

Ao Prof. Paulo Ramos (Departamento de Biofísica) pela utilização do seu laboratório. Acertaremos as diárias e as pernoites!!!

Ao Prof. Silvio Luis de Oliveira (Departamento de Microbiologia e Imunologia) pela utilização dos animais para produção dos anticorpos.

Agradeço à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

Ao Prof. Jörg Kobarg - LNLS, pelo apoio ao trabalho e por proporcionar a realização de experimentos.

A Adrina Paes Leme - LNLS, pela realização da Espectrometria de Massas.

A todos do Departamento de Física e Biofísica, em especial aos colegas do meu grupo: Carlos Alexandre (Pituta), Agnes Alessandra, Juliana Isabel (Franguinha), Patrícia, Andréia, Angelo, Guilherme, Rafael (Dory), Ivan. Vocês foram bons companheiros!

A todos do Departamento de Genética especialmente aos colegas do BIOGEM: Rodrigo, Juliana Bravo, Márcio (Pellet), Flávio (Bonsai), Fábio, Alessandra, Carol, Layra, Cíntia e Marcela pela alegre e divertida convivência de todos esses anos. Sei que não foi fácil a pentelhação! Nunca me esquecerei de vcs!!!

Aos colegas do CAGEM: Tânia, Júlio, Vanusa, Juliana, Aletéia, Karina (Atoladinha), Susana, Helena, Virgínia, Andréia e Leonardo.

Pelo apoio, em outros momentos, agradeço especialmente a: Bruno Gamba e Karol, Juliana Bravo, Ana Teresa, Agnes, Rodrigo, Arina, Rita, Patrícia, Cíntia, Rosana e Marcos. Vocês foram Anjos quando precisei!!!

Devo dizer que gostei muito de conviver e aprender com essas pessoas e, principalmente, de saber que pude contar com todas elas quando necessitei.

A vocês o meu **Muito Obrigada!!!**

EPÍGRAFE

Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer!

Mahatma Gandhi.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. O inibidor de RNase L (RLI) e Suas Funções.....	16
1.2. O Silenciamento por RNA.....	19
1.3. O Mecanismo de Silenciamento por RNA.....	20
1.4. Outros Supressores Endógenos de Silenciamento por RNA em Plantas.....	22
1.5. Estrutura e Organização da RLI.....	23
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Origem e Obtenção dos Insertos Contendo os Domínios FeS e NBDs da proteína AtRLI2.....	28
3.2. Subclonagem do Inseto FeS e NBDs de AtRLI2 em pET28a(+)......	29
3.3. Sequenciamento dos Clones Positivos.....	31
3.4. Obtenção da Proteína Recombinante NBDs em <i>Escherichia coli</i>	32
3.5. Testes de Solubidade para a Proteína Recombinante NBDs.....	33
3.6. Produção e Purificação da Proteína Recombinante NBDs.....	34
3.7. Análise da expressão e purificação da proteína recombinante NBDs por <i>Western blotting</i>	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Obtenção dos Clones FeS e NBDs.....	37
4.2. Confirmação da Obtenção dos Clones NBDs e FeS por Sequenciamento do DNA	41
4.3. Obtenção da Proteína Recombinante NBDs e Testes de Solubilidade.....	44

4.4. Purificação da Proteína Recombinante NBDs em Condição Desnaturante e Nativa	50
4.5. Análise da expressão e purificação da proteína recombinante NBDs por <i>Western Blotting</i>	55
5. CONCLUSÕES	56
6. PERSPECTIVAS	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8. ANEXO	70
1. Preparo de células competentes.....	70
2. Controle do plasmídeo pET pelo promotor <i>T7lac</i>	71

RESUMO

A “RNase L inhibitor” (RLI) é uma proteína altamente conservada em *Eukaryota* e *Archaea* e foi primeiramente identificada em humanos, onde se mostrou reguladora da via 2’-5’ - oligoadenilato sintetase/ribonuclease L (OAS/RNase L), principal via induzida por interferon. Novas funções têm sido descritas para RLI em diferentes organismos, dentre elas o controle do silenciamento por RNA e resistência a vírus. Visando futuros estudos estruturais foi possível subclonar a sequência que codifica para o domínio NBDs (Nucleotide Binding Domain) de AtRLI2 de *Arabidopsis thaliana* em vetor de expressão pET-28a(+) capaz de expressar a proteína NBDs ligada a um His₆ tag. A proteína NBDs foi expressa e purificada por cromatografia de afinidade por níquel em condição nativa utilizando detergente N-lauril-sarcosil, com um rendimento da ordem de 8 mg/L e em condição desnaturante utilizando uréia, com um rendimento da ordem de 10 mg/L. Para renaturação da proteína utilizou-se dATP e cloreto de magnésio com posterior diálise obtendo-se uma diminuição significativa dos corpúsculos de inclusão e o aumento da solubilidade da proteína produzida em condição desnaturante. Para confirmar a presença dos resíduos His₆ tag em fusão com a proteína NBDs, testes de *Western blot* foram realizados utilizando extrato total das células induzidas, a proteína purificada e a proteína originada da diálise. Foi possível concluir que houve o reconhecimento do anticorpo monoclonal anti-His₆ tag à proteína confirmando o sucesso da obtenção e purificação da proteína fusionada à uma sequência de 6 histidinas. Etapas posteriores de purificação, a partir da proteína NBDs obtida, necessitam ser realizadas a fim de obter a proteína com grau de pureza significativo e em quantidades suficientes para a realização dos ensaios biofísicos e cristalográficos.

Palavras-Chave: RNase L inhibitor, AtRLI2, NBDs, FeS, Silenciamento por RNA, purificação de proteína, Cristalografia de proteínas.

ABSTRACT

The RNase L inhibitor (RLI) is a protein highly conserved in Eukaryota and Archaea and it was first identified in humans acting as a regulator of Oligoadenylate Synthetase/RNase L system (OAS/RNase L), the main pathway induced by interferon. New functions have been described for RLI in different organisms, among them the control of RNA silencing and virus resistance. In order to further structural studies could subcloned the coding sequence for the domain NBDs (nucleotide-binding domain) AtRLI2 of *Arabidopsis thaliana* in expression vector pET-28a (+) capable of expressing the protein NBDs linked to a His₆ tag. NBDs protein was expressed and purified by affinity chromatography on nickel in native condition using detergent N-laurylsarcosine with a yield of about 8 mg/L and denaturing conditions using urea with a yield of about 10 mg/L. For renaturation of the protein was used dATP and magnesium chloride with subsequent dialysis resulting in a significant reduction in inclusion bodies and increasing the solubility of the protein produced in denaturant condition. To confirm the presence of residues His₆ tag fusion protein with the NBDs, *Western blot* tests were conducted using total extract of induced cells, the purified protein and protein originated from dialysis. It was concluded that there was recognition of the monoclonal anti-His₆ tag protein confirming the success of obtaining and purification of protein fused to a sequence of 6 histidines. Later stages of purification from the protein obtained NBDs are being conducted to obtain the pure protein in sufficient quantities for the testing biophysical and crystallographic.

Keywords: RNase L inhibitor, AtRLI2, NBDs, FeS, silencing RNA, protein purification, protein crystallography.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.** Representação esquemática dos domínios funcionais presentes em proteínas RLI.....25
- Figura 2.** Mapa do vetor de expressão pET-28a(+) mostrando as regiões de clonagem e expressão.....31
- Figura 3.** Sequência completa do cDNA do gene de AtRLI2 de *Arabidopsis thaliana* depositadas no GenBank sob o número de acesso AT4G19210.1 gi|145340416|ref|NM_118041.4|, e suas regiões correspondentes aos domínios FeS e NBDs.....37/38
- Figura 4.** Diagrama mostrando a posição dos insertos FeS e NBDs em relação ao gene que codifica a proteína AtRLI239
- Figura 5.** Gel de agarose 1% (TBE 1x) corados com brometo de etídeo mostrando a subclonagem do inserto FeS de AtRLI2 em vetor pET-28a(+)......40
- Figura 6.** Gel de agarose 1% (TBE 1X) corado com brometo de etídeo mostrando a subclonagem do inserto NBDs de AtRL2 em vetor pET-28a(+)40
- Figura 7.** Análises da sequência de nucleotídeos obtida por sequenciamento automático utilizando o iniciador senso T7 para o sítio do promotor T7 do pET-28a(+), no qual o inserto NBDs de AtRLI2 foi clonado, usando o programa blastn.....42
- Figura 8.** Análises da sequência de nucleotídeos obtida por sequenciamento automático utilizando o iniciador reverso T7 correspondente a região do terminador T7 do pET-28a(+), no qual o inserto NBDs de AtRLI2 foi clonado, usando o programa blastn.....43
- Figura 9.** Gel SDS-PAGE 12% mostrando a indução da expressão em *E. coli* proteína da recombinante NBDs de AtRLI2.....46

- Figura 10.** Gel SDS-PAGE 12% mostrando a indução da expressão em *E. coli* e a insolubilidade da proteína recombinante NBDs de AtRLI2.....48
- Figura 11.** Gel SDS-PAGE 12% mostrando a solubilidade da proteína recombinante NBDs de AtRLI2, utilizando o detergente sarcosil.....49
- Figura 12.** Cromatograma da purificação da proteína recombinante NBDs em coluna de afinidade por níquel a partir de condição desnaturante utilizando 8 M de uréia.....51
- Figura 13.** Gel SDS-PAGE 12% mostrando o padrão de purificação em condição desnaturante em coluna de afinidade por níquel da proteína recombinante NBDs.....51
- Figura 14.** Cromatograma da purificação da proteína recombinante NBDs em coluna de afinidade por níquel a partir da fração solúvel utilizando 0,2% de sarcosil.....54
- Figura 15.** *Western blot* hibridizado com anticorpo anti-His₆-tag (diluição 1:1000) para a proteína recombinante NBDs de ATRLI2. A proteína obtida foi resolvida por separação em SDS-PAGE 12%.....55
- Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados na amplificação das sequências correspondentes aos domínios FeS e NBDs do gene *atrli2*. Em vermelho o sítio de restrição para enzima *Nde* I. Em amarelo o sítio de restrição para a enzima *Xho* I.....29
- Tabela 2.** Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento dos clones FeS e NBDs.....32
- Quadro 1.** Representação da sequência de nucleotídeos obtidas a partir de sequenciamento automático do plasmídeo pET28a(+) no qual os insertos FeS e NBDs de AtRLI2 foram clonados.....41

LISTA DE ABREVIATURAS

2–5A	2'-5' oligoadenilatos
ABC	ATP-binding cassette transporter
AGO	Argonaute
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CAP	Proteína ativadora de catabólito
CD	Dicroísmo circular
CFIDS	Síndrome de deficiência orgânica imune e fadiga crônica
CFTR	Regulador de Condutância Transmembrana em Fibrose Cística
CHS	Chalcona Sintase
dATP	desoxi- Adenosina trifosfato
DCL	Dicer-like
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DO	Densidade ótica
dsRNA	RNA de fita dupla
EMCV	Vírus da encefalomiocardite
ESP	<i>Enhanced silencing phenotype</i>
GFP	Proteína fluorescente verde
HC-Pro	<i>Helper component proteinase</i>
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
HP68	Proteína humana 68 kDa
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IFNs	Interferons
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosose
LB	Luria-Bertani
MES	Ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico
miRNAs	Micro RNAs
NBD	Domínio de ligação a nucleotídeo
nts	Nucleotídeos
OAS/RNase L	Oligoadenilato sintetase/ribonuclease L
OASes	Oligoadenilato sintetases
Pb	Pares de base
P-bodies	<i>Processing bodies</i>

piRNAs	<i>PIWI interacting RNAs</i>
PKR	Proteína cinase <i>R</i>
PTGS	Silenciamento gênico pós-transcricional
RdRPs	RNA polimerase dependente de RNA
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RLI	Inibidor de RNase L
RNAi	<i>RNA interference</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
siRNA	Pequenos RNAs interferentes
TGS	Silenciamento gênico transcricional
TMD	Domínio transmembrana
Tris	Tris(hidroximetil) amino metano
tRNA	RNA transportador
x g	Força gravitacional

1. INTRODUÇÃO

1.1. O inibidor de RNase L (RLI) e Suas Funções

O inibidor da ribonuclease L (RNase L inhibitor ou RLI), também denominado nas suas formas homólogas como ABCE1, RLI1, Pixie e HP68 (Zimmerman *et al.*, 2002; Kerr, 2004; Andersen e Leever, 2007; Smirnova *et al.*, 2008), possui a sequência de aminoácidos conservada e é uma proteína codificada pelo genoma de todos os *Eukaryota* e *Archaea* (Sarmiento *et al.*, 2006; Karcher *et al.*, 2008).

A RLI foi primeiramente identificada em humanos, onde mostrou ser um importante mediador da via 2'-5' - oligoadenilato sintetase (OAS)/ribonuclease L (RNase L) (sistema OAS/RNase L) (Bisbal *et al.*, 1995; Braz *et al.*, 2004; Kajaste-Rudnitski *et al.*, 2006). O sistema OAS/RNase L é parte da resposta imune inata induzida por interferon e ativado por moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) em resposta a padrões moleculares associados a patógenos, e cuja atividade resulta na degradação de RNAs de origem viral ou celular (Al-khatib, *et al.*, 2003; Kajaste-Rudnitski *et al.*, 2006; Silverman, 2007). Interferons (IFNs) são moduladores da resposta imune bem como controladores de várias funções celulares. Atua regulando negativamente a proliferação celular através da indução do ciclo celular e apoptose, e na transcrição de uma grande família de genes envolvidos na diferenciação celular. Quantidades ínfimas de dsRNA no citoplasma são suficientes para induzir a síntese de interferon e provocar alterações fisiológicas na célula bem como a degradação de RNA viral invasor (Kumar e Carmichael, 1998; Roy *et al.*, 2001; Kajaste-Rudnitski *et al.*, 2006).

A OAS e a ribonuclease L são proteínas induzidas por interferon e ativadas durante o processo de infecção por vírus, que acumulam intermediários de replicação na forma de dsRNA, culminando na degradação de RNA viral (Samuel, 2001; Sadler e Williams, 2008). Neste processo, moléculas longas de dsRNA (com mais que 30 pares de bases) ativam a enzima OAS que converte ATP em oligoadenilatos com ligação fosfodiesterase na porção 2'-5' (Hovanessian, 2007, Peters e Meister, 2007; Budt, *et al.*, 2009). As moléculas de dsRNA interagem com um domínio de ligação a RNA composto por uma carga positiva nesta porção, e após a ligação ao RNA, as 2'-5' OASes polimerizam ATP em 2'-5' oligoadenilatos (2-5A) (Xiang *et al.*, 2003, Liang *et al.*, 2006; Townsend *et al.*, 2008). A ligação de 2-5A a RNase L induz mudanças conformacionais que levam a dimerização e ativação de seu domínio endoribonuclease. Na ausência de 2-5A, a RNase L é monomérica e inativa (Samuel, 2001; Townsend *et*

al., 2008). A RNase L ativada pode então clivar especificamente RNAs virais bem como mRNAs e rRNAs celulares, levando a inibição da síntese de proteínas virais e estimulando a produção de interferons e da proteína quinase dependente de dsRNA (PKR) que leva a apoptose (Kumar e Carmichael, 1998; Bisbal *et al.*, 2000; Kajaste-Rudnitski *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2006; Silverman, 2007; Sadler e Williams, 2008, Budt *et al.*, 2009). Em contrapartida, a via de resposta contra vírus mediada por IFNs também pode ser desarmada por determinados vírus como o *Encephalomyocarditis virus* (EMCV) e o *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), que inibem a RNase L através do aumento da expressão da RLI, provocando assim a inibição do sistema OAS/RNase L (Bisbal *et al.*, 2000).

A RLI pode formar um complexo com a RNase L, e portanto, levar a inibição da síntese de proteínas do sistema OAS/RNase L (Silverman, 2007). A ação inibitória da RLI sobre a RNase L parece estar, provavelmente, relacionada ao bloqueio da ligação de 2-5A a RNase L. Entretanto, tanto o sistema OAS/RNase L quanto a proteína RNase L são componentes descritos somente em mamíferos, e genes homólogos a RNase L são encontrados somente em Tetrápodes. A RLI, porém, é encontrada em todos os eucariontes e *Archaea*. Portanto, somente a função regulatória da RLI não esclarece sua conservação em outras espécies indicando que a mesma pode desempenhar outros papéis em outros organismos (Braz *et al.*, 2004; Sarmiento *et al.*, 2006; Andersen e Leever, 2007).

Apesar de ainda não se ter uma idéia precisa do papel que a RLI desempenha na fisiologia celular, cresce o número de evidências sugerindo um papel fundamental para esta proteína em diferentes organismos (Sturm *et al.*, 2009). Uma função comum para a RLI nos domínios *Eukaryota* e *Archaea* é desconhecida, no entanto, em *Saccharomyces cerevisiae* e *Caenorhabditis elegans*, uma forma homóloga de RLI conhecida como RLI1 (ou RLI1p) está envolvida na iniciação da tradução, biogênese de ribossomos e síntese de proteína (Dong *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Andersen e Leever, 2007). Em *S. cerevisiae* a RLI se liga aos fatores de iniciação da tradução eIF2 e eIF5, e forma parte do complexo de pré-iniciação necessário para a tradução do mRNA (Dong *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006). Em *C. elegans*, as regiões promotoras de genes que codificam RLI dirigem a expressão do gene repórter GFP (*green fluorescent protein*) em hipodermes, faringe, vulva, cabeça e neurônios indicando uma função essencial de RLI em todos os estágios de desenvolvimento (Zhao *et al.*, 2004). Também foi demonstrada a atuação da RLI no desenvolvimento embrionário em *Xenopus laevis*

(Andersen e Leever, 2007). Essas funções fundamentais explicam a alta conservação de outra forma homóloga de RLI em *Drosophila*, denominada Pixie (67 % de identidade com a RLI humana), que pode ser isolada de células em complexo com o fator de iniciação da tradução eIF3 e proteínas ribossomais de pequenas subunidades, reforçando seu papel na biogênese de ribossomos e iniciação da tradução (Andersen e Leever, 2007). A diminuição de Pixie mediada por RNAi (RNA de interferência) reduz a tradução global da célula (Coelho *et al.*, 2005). Essas e outras observações também sugerem que o impacto sobre o crescimento resulta de um efeito da RLI sobre a síntese protéica (Andersen e Leever, 2007).

Recentemente em humanos, a RLI foi encontrada desempenhando um papel crítico no processo de formação do capsídeo do *Human Immunodeficiency Virus* tipo 1 (HIV-1) (Lingappa e Thielen, 2009). Estudos sugerem um modelo no qual a RLI, conhecida neste caso como HP68 (para Human Protein 68 kDa), se associa pós-transcricionalmente a polipeptídios Gag (p55), presentes na montagem de capsídeos imaturos de HIV e outros lentivirus primatas, e promove mudanças conformacionais dependentes de ATP funcionando como uma chaperona durante a formação do capsídeo viral (Zimmerman *et al.*, 2002; Doohar e Lingappa, 2004; Chen *et al.*, 2006; Lingappa *et al.*, 2006; Smirnova *et al.*, 2008). Em indivíduos com *Chronic Fatigue Immune Dysfunction Syndrome* (CFIDS), uma desordem caracterizada por fadiga debilitante associada com anormalidades imunológicas e cognitivas, a super expressão da 2'-5' OASes está associada a um aumento na atividade da RNase L e a um decréscimo da RLI (Vojdani *et al.*, 1998; Nijs, 2005).

Outra função recentemente descrita para RLI em humanos está associada ao risco de câncer de próstata. O gene que codifica para a RNase L tem sua localização no cromossomo 1q23-q25, uma região associada a um *locus* de suscetibilidade ao câncer de próstata (Chen *et al.*, 2003; Shea *et al.*, 2008). Devido ao papel que a RLI desempenha na função da RNase L, e a localização de seu gene numa região implicada no risco de câncer de próstata, é possível inferir que uma variação no gene que codifica para a RLI aumenta o risco para este tipo de câncer (Shea *et al.*, 2008).

No genoma de plantas superiores como *Oriza sativa* (arroz) e *Arabidopsis thaliana* existem três formas parálogas para o gene que codifica a RLI (*AthaRLI1*-At3g13640; *AthaRLI2*- At4g19210 e *AthaRLI3*-At4g30300).

O fato de uma RLI de *Arabidopsis* (AtRLI2) ter sua expressão induzida em várias linhagens de plantas com silenciamento por RNA indica que esta proteína pode atuar

nesse mecanismo (Braz *et al.*, 2004). Estudos do padrão de expressão do gene *atharli2* indicam uma expressão ubíqua em todos os órgãos de *A. thaliana* e durante os estágios de diferenciação celular.

A idéia de uma provável atuação da RLI nas vias de silenciamento por RNA é reforçada por duas evidências importantes: 1º) moléculas de dsRNA também induzem a expressão da RLI em células *HeLa* (Martinand *et al.*, 1998) 2º) em estudos de agroinfiltração em *Nicotiana benthamiana*, a *AtRLI2* foi capaz de suprimir o silenciamento por RNA pela diminuição, a nível local e sistêmico, dos pequenos RNAs interferentes (siRNA) (Sarmiento *et al.*, 2006). Entretanto, mais estudos são necessários para determinar o mecanismo pelo qual a *AtRLI2* atua na supressão do silenciamento por RNA em planta.

1.2. O Silenciamento por RNA

O silenciamento por RNA é um mecanismo de regulação da expressão gênica a nível transcricional e pós-transcricional que consiste na degradação sequência-específica de genes homólogos em resposta a moléculas de dsRNA em plantas, fungos e animais (Sarmiento *et al.*, 2006; Ding e Voinnet, 2007; Nowotny e Yang, 2009; Padmanabhan *et al.*, 2009). O silenciamento por RNA atua, no contexto celular endógeno, contra vírus e transposons, na formação de heterocromatina, silenciamento do centrômero, regulação da expressão gênica, controle do metabolismo, crescimento e diferenciação celular, colaborando assim para a manutenção e integridade do genoma (Hannon, 2002; Dawe *et al.*, 2003; Almeida e Allshire, 2005; Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Grewal e Elgin, 2007; Gregory *et al.*, 2008; Gomase e Tagore, 2008; Jinek e Doudna, 2009).

As vias de silenciamento em plantas, fungos e animais compartilham um conjunto de proteínas relacionadas, sugerindo aspectos comuns no mecanismo de ação, e evidenciando tratar-se de uma aquisição ou inovação eucariótica (Zamore, 2002). O silenciamento por RNA foi primeiramente descoberto em plantas de petúnia, onde foi observada a supressão da expressão do gene que codifica a chalcona sintase (CHS) responsável pela biosíntese de flavonóides. O fenômeno observado, denominado co-supressão, resultou na produção de petúnias com flores brancas ao contrário de sua coloração violeta original, sugerindo um sistema de silenciamento gênico (Napoli *et al.*, 1990; Baulcombe, 2002; Shrey *et al.*, 2009). Fenômenos com características similares ao observado em petúnias foram descritos em outros organismos, recebendo diferentes

denominações. Em plantas, foi chamado PTGS (*post transcriptional gene silencing*); em fungos, “*quelling*” e em animais e eucariontes inferiores, RNAi (*RNA interference*). Entretanto, silenciamento por RNA e RNA de interferência são os termos mais comumente usados para descrever os mecanismos de silenciamento gênico guiado por moléculas de RNA dupla fita (Nakayashiki, 2005; Grishok, 2005; Kavi *et al.*, 2005; Li e Ding, 2005; Aravin e Tuschl, 2005; Sarmiento *et al.*, 2006). Nos últimos anos, diversos trabalhos têm demonstrado a aplicação desse sistema altamente conservado de resposta a dsRNA não somente na genômica funcional, mas também na terapêutica de doenças genéticas cujo alvo é o mRNA (Li e Ding, 2005; Gomase e Tagore, 2008).

1.3. O Mecanismo de Silenciamento por RNA

No silenciamento por RNA, a presença de moléculas de dsRNA dispara uma cadeia de eventos que culmina na degradação seqüência específica de moléculas de RNA homólogas ao dsRNA ativador (Vaucheret *et al.*, 2001; Waterhouse *et al.*, 2001; Hannon, 2002). A grande especificidade de reconhecimento das seqüências alvo é uma das características que mais se destaca nesse mecanismo. Tal especificidade é fornecida por pequenas moléculas de RNA de ~21 a 24 nts (nucleotídeos), produzidas a partir de dsRNA longos, que quando em fita simples pode formar um duplex com a molécula de RNA alvo (Dougherty e Parks, 1995; Sijen *et al.*, 1996; Hamilton e Baulcombe, 1999; Waterhouse *et al.*, 2001; Hannon, 2002). Na realidade, existem três principais classes desses pequenos RNA reguladores nas células: os pequenos RNAs interferentes (siRNAs), os micro RNAs (miRNAs) e os *PIWI interacting RNAs* (piRNAs), que se diferenciam entre si essencialmente por sua biogênese e precursores utilizados (Baulcombe, 2004, Gregory *et al.*, 2008). Essas moléculas conferem especificidade de seqüência para vários complexos inibidores, e podem guiar o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) pela clivagem ou degradação do mRNA, a inibição da tradução, e o silenciamento gênico transcricional (TGS) por metilação e/ou alteração da cromatina em torno do sítio de ligação (Small, 2007, Hutvagner e Simard, 2008; Siomi e Siomi, 2009). Dependendo do organismo e da molécula de dsRNA envolvida, o silenciamento pós-transcricional pode se processar por dois mecanismos: clivagem seqüência específica e degradação do mRNA e/ou repressão da tradução (Zamore, *et al.*, 2000; Matzke e Birchler, 2005; Wassenegger, 2005; Castanotto e Rossi, 2009).

Estudos relatam a possibilidade de que proteínas possam reconhecer o DNA cromossomal através do RNA sugerindo que essas moléculas possam promover o

silenciamento a nível transcricional. Guang e colaboradores (2008), buscando fazer uma triagem genética para identificar fatores essenciais para o RNAi no núcleo em *C. elegans*, identificou a proteína Argonaute NRDE-3 que liga siRNA ao RNA molde no citoplasma, e o redistribuiu para o núcleo onde atua na regulação da expressão gênica (Guang *et al.*, 2008).

O processo básico de RNA de interferência consiste em duas fases – a fase de iniciação, e a fase efetora (Shrey *et al.*, 2009). Na fase de iniciação as moléculas ativadoras de dsRNA longas são expressas ou introduzidas no contexto celular. Esses dsRNAs são processados por uma ribonuclease do tipo III denominada DICER ou DICER-LIKE (DCL) que produz, dependendo da isoforma, pequenos RNAs de ~21 nts com dois ou três nucleotídeos protuberantes na região 3' e um grupo fosfato na porção 5' que são necessários para a indução do complexo de silenciamento (Hammond *et al.*, 2000; Zamore *et al.*, 2000; Bernstein *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2003, Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Peters e Meister, 2007; Siomi e Siomi, 2009; Shrey *et al.*, 2009).

Na fase efetora, esses pequenos RNAs de dupla fita (miRNA ou siRNA) são reconhecidos e associados a domínios específicos de uma endonuclease do tipo II denominada Argonaute (AGO2), sendo então incorporados a um complexo multi-enzimático chamado *RNA induced silencing complex* (RISCs). Uma vez incorporado ao complexo AGO2–RISC, o RNA de dupla fita é desenovelado e somente a fita antisenso de ~21 nts é mantida no complexo. Esse processo ocorre de forma dependente de ATP e da atividade de uma RNA helicase. A fita de RNA antisenso é então usada para guiar o complexo RISC, ativo, à molécula complementar do mRNA alvo, desencadeando assim o silenciamento (Hammond *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 2007; Kawakami e Hashida, 2007; Peters e Meister, 2007; Gregory *et al.*, 2008; Siomi e Siomi, 2009; Jinek e Doudna, 2009; Carthew e Sontheimer, 2009). Cabe ressaltar que a porção 5' da molécula antisenso de um siRNA funcional é termodinamicamente menos estável do que a porção 5' da molécula senso, sendo esse o fator chave para seleção da molécula antisenso como guia pelo complexo RISC. A fita senso por sua vez é clivada por outras proteínas AGO (Shrey *et al.*, 2009).

Numa última etapa, a molécula guia de RNA antisenso é capaz de formar um dúplice com a molécula complementar do mRNA alvo, e em seguida, pela ação da proteína Argonaute (AGO2) presente no RISC ativado, ocorre a clivagem do mRNA homólogo. A especificidade do mecanismo é, portanto, determinada pelas moléculas de

RNA antisense presentes em RISC (Hutvagner e Simard, 2008; Siomi e Siomi, 2009), e que são complementares à molécula de mRNA alvo. Se a complementaridade para tal for perfeita, como ocorre com os siRNAs, a fita de mRNA é clivada rapidamente por AGO2 que reconhece a região 3' desprotegida (Aigner, 2007; Hutvagner e Simard, 2008; Siomi e Siomi, 2009; Shrey *et al.*, 2009). Se a complementaridade não for perfeita, como acontece com os miRNAs, o complexo AGO2–RISC bloqueia a tradução. A repressão da tradução e a degradação do RNA ocorrem quando as moléculas de RNA guias têm somente complementaridade limitada à região alvo, com o pareamento de bases ocorrendo usualmente na região 3' não traduzida (Zamore *et al.*, 2000, Matzke e Birchler, 2005, Wassenegger, 2005; Aigner, 2007; Hutvagner e Simard, 2008; Siomi e Siomi, 2009; Castanotto e Rossi, 2009). Além da repressão traducional, os miRNAs podem também mediar a degradação de mRNA em compartimentos citoplasmáticos conhecidos como *processing bodies* (P-bodies) (Liu *et al.*, 2005; De Fogerolles *et al.*, 2007).

1.4. Outros Supressores Endógenos de Silenciamento por RNA em Plantas

O PTGS foi o primeiro sistema reconhecido como mecanismo de resposta imune de planta contra infecção viral (Ding e Voinnet, 2007). Embora as plantas e demais eucariontes utilizem o silenciamento por RNA como mecanismo de defesa contra vírus, muitos vírus escapam deste sistema e se mostram capazes de suprimi-lo pela produção de supressores de silenciamento (Sarmiento *et al.*, 2006; Gy *et al.*, 2007). Embora inúmeros supressores virais exógenos de silenciamento tenham sido descritos (Baulcombe, 2002, Sarmiento *et al.*, 2006, Umbach e Cullen, 2009), pouco se sabe sobre os supressores endógenos do silenciamento em plantas.

O primeiro destes supressores foi identificado em tabaco, sendo denominado rgs-CaM. Trata-se de uma calmodulina capaz de interagir com o supressor viral HC-Pro (*helper componente proteinase*) codificado pelos potyvírus (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Posteriormente, observou-se que mutações introduzidas no promotor do gene *xrn4*, que codifica a exorribonuclease XRN4 de *Arabidopsis thaliana*, promovem silenciamento em RNA polimerases dependente de RNA (RdRPs) através da degradação de mRNA moldes para essas enzimas (Gazzani *et al.*, 2004). Além disso, mutações no gene ENHANCED SILENCING PHENOTYPE (ESP) que codifica proteínas envolvidas no processamento de RNA em *Arabidopsis thaliana*. Na ausência dessas proteínas ocorre a formação aberrante da região 3' não traduzida de moléculas de

RNA e como consequência, conduzem ao silenciamento (Herr *et al.*, 2006). Recentemente, foram descritos três novos supressores endógenos de PTGS em *Arabidopsis*: as exorribonucleases XRN2, XRN3 e FIERY1 (Gy *et al.*, 2007). Nesse estudo a eficiência de PTGS em mutantes *xrn3-3* e *xrn2-2* foi analisada, sendo demonstrado que XRN2 e XRN3 degradam miRNAs presentes no núcleo, enquanto FRY1 suprime PTGS pela regulação negativa de XRN2, XRN3 e XRN4.

1.5. Estrutura e Organização da RLI

Uma RLI típica tem cerca de 605 aminoácidos, apresenta uma massa molecular de aproximadamente 68 kDa e um pI teórico de 8.21. A RLI é o único membro da subfamília E da superfamília de proteínas ATP *binding cassette* (ABC) *transporters* (Kerr, 2004; Karcher *et al.*, 2008). Em *Saccharomyces cerevisiae* as proteínas ABCs foram classificadas num total de 6 subfamílias ou *clusters* com topologias distintas. O *cluster* que compartilha alta similaridade de sequência com a RLI humana pertence ao *locus* ABCE1 que foi, portanto, originalmente identificado como a proteína RLI (Iida *et al.*, 2002).

As proteínas ABC estão normalmente associadas com transporte de uma grande variedade de compostos, tais como açúcares, íons, peptídeos e outras moléculas orgânicas complexas. De maneira geral, proteínas ABC possuem dois domínios transmembrana (TMD) hidrofóbicos que ligam substrato, e dois domínios de ligação a nucleotídeo (NBDs) hidrofílicos localizados na superfície citoplasmática que fornecem a energia necessária para o transporte da ligação e hidrólise de ATP (trifosfato de adenosina) (Kerr, 2004; Dawson e Locher, 2006; Oancea *et al.*, 2009; Sturm *et al.*, 2009). Os NBDs são os elementos mais representativos das proteínas ABC estando envolvidos na transmissão de mudanças conformacionais ao domínio TMD, o qual é normalmente responsável pelo transporte dos substratos. Para atuar no transporte, um TMD deve estar fusionado a um NBD (Sturm *et al.*, 2009).

Entretanto, os dois domínios NBD da RLI (NBD1 e NBD2) não estão fusionados aos domínios TMD (Kerr, 2004; Andersen e Leever, 2007). O fato das RLIs serem comumente encontradas junto a um grupo de proteínas ABC solúveis não dotadas de segmento transmembrana, torna bastante improvável que as RLIs estejam relacionadas com transporte (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001; Smirnova *et al.*, 2008). Outras proteínas que possuem domínios NBD e que também não estão envolvidas em transporte são: SMC (*structural maintenance of chromosomes*); Rad50 (SMC *like*

dsDNA *break repair enzyme*); MutS (DNA *mismatch repair enzyme*); e UvrA9 (*nucleotide excision repair enzyme*) (Hopfner e Tainer, 2003; Karcher *et al.*, 2008).

Estruturalmente, os domínios NBD (Figura 1) possuem cinco motivos conservados. Dois desses motivos, denominados Walker A (WA) e Walker B (WB), estão separados por aproximadamente 90 a 120 aminoácidos e podem ser encontrados em todas as proteínas que se ligam a nucleotídeos (Bauer *et al.*, 1999; Morris e Phuntumart, 2009). Baseado na sequência de aminoácidos, o motivo WA (também conhecido como *P-loop*) possui tipicamente uma sequência consenso [GxxxxGK(S/T)] e forma um *loop* que se liga a fosfatos α e β de di- e tri-nucleotídeos. O domínio WB possui dois resíduos ácidos [xxxxDE] que coordenam o íon Mg^{2+} e polarizam a molécula de água atacante durante a hidrólise do ATP (Bauer *et al.*, 1999; Diederichs *et al.*, 2000; Gaudet e Wiley, 2001; Gangwar *et al.*, 2009).

A assinatura ABC (sig C), ou motivo C com sequência consenso LSGGQ, é a região diagnóstica para todos os transportadores ABC (Morris e Phuntumart, 2009). O sig C atua como um sensor gama fosfato de hidrólise de ATP que regula a dimerização dos domínios NBD. Essa dimerização ocorre devido à interação do sig C de um NBD com o WA do outro NBD. Além disso, existem dois motivos menos conservados como por exemplo o motivo *Q-loop* localizado numa região central entre WA e WB, e o *H-loop* posicionado abaixo do motivo WB. O *H-loop* contém um resíduo invariante de histidina que liga às moléculas de água atacante (Bauer *et al.*, 1999; Diederichs *et al.*, 2000; Gaudet e Wiley, 2001; Morris e Phuntumart, 2009). O *Q-loop* possui um resíduo de glutamina conservado, que entra em contato com o Mg^{2+} do sítio ativo e água atacante nucleofílica. Esse contato, aliado a sua localização tridimensional próxima a outras regiões adjacentes funcionais nos transportadores ABC e estrutura *coil-coil* no sítio de ligação a Mre11 em Rad50 (Hopfner e Tainer, 2003), tornam o *Q-loop* um bom candidato para transmissão de alterações conformacionais intra-subunidades, de forma dependente de ATP e um elemento crucial para a função de transporte (Jones e George, 2002; Karcher *et al.*, 2008).

Além dos domínios NBD típicos dos transportadores ABC, as RLIs possuem em sua região N-terminal um domínio de ligação do grupo ferro-enxofre (Fe-S) (Figura 1), que possui maior identidade com o subtipo 4Fe-4S da ferredoxina (Kerr, 2004; Meyer, 2008). A região N-terminal de RLI é composta por quatro resíduos de cisteína altamente conservados e apresenta a sequência consenso [D/E]xCxPxxCxxxCxxxCP (Decottignies e Goffeau, 1997; Kerr, 2004).

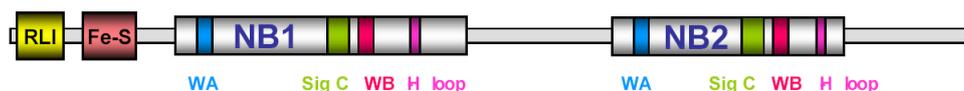


Fig. 1. Representação esquemática dos domínios funcionais presentes em proteínas RLI. (Braz *et al.*, 2004).

Os domínios de ligação a Fe-S normalmente atuam como carreadores de elétrons para reação redox, e podem ser encontrados em proteínas com as mais variadas funções tais como isomerização e desidratação, estabilização do *fold*ing, ligação e ativação de substrato (Braz *et al.*, 2004; Karcher *et al.*, 2008). O *cluster* Fe-S é o componente essencial para sua função enzimática e a presença desse grupo discrimina as proteínas RLI de outros membros da superfamília dos transportadores ABC. No transporte elétrico, eles operam como sensores, modulam a estabilidade da proteína e operam na ligação e modificação de ácidos nucleicos (Barthelme *et al.*, 2007). *Clusters* Fe-S são componentes conservados e essenciais para a célula. Em eucariontes o *cluster* Fe-S, cujo arranjo e maturação requerem uma maquinaria altamente complexa, é gerado dentro de mitocôndrias, onde podem desempenhar um papel na transferência eletrônica, e necessita ser exportado posteriormente para o citoplasma para serem incorporados às proteínas Fe-S (Lill, 2009).

Recentes estudos de cristalografia de raios-X resultaram em um modelo para a organização estrutural de *clusters* Fe-S em *Archaea*: dois clusters [4Fe-4S] que podem ser convertidos em [3Fe-4S] mediante estado de oxidação ou mutagênese em cisteínas (Barthelme *et al.*, 2007; Meyer, 2008). Esta considerável estabilidade dos *clusters* [4Fe-4S] é fornecida pela interação com ligantes podendo constituir um importante sítio de interação macromolecular (Barthelme *et al.*, 2007; Karther, 2008; Meyer, 2008). Entretanto, o mecanismo funcional desses diferentes *clusters* Fe-S em *Archaea* ainda não foi totalmente estabelecido.

O papel fundamental da RLI como inibidor da RNase L, na montagem do capsídeo do HIV, na iniciação da tradução e na biogênese de ribossomos sugerem que *clusters* Fe-S estejam envolvidos no reconhecimento e modificação química ou conformacional desses processos (Barthelme *et al.*, 2007). Contudo, uma compreensão mais detalhada do papel biológico essencial da RLI em planta e em outros organismos é atualmente dificultada por vários motivos, dentre eles, o desconhecimento do alvo para o mecanismo de sua ação. Como a RLI é uma das proteínas mais conservadas na

evolução e está presente em *Archaea* e eucariotos (Karcher *et al.*, 2008), um modelo estrutural obtido a partir do parálogo AtRLI2 poderá fornecer valiosas informações sobre o papel de RLI de planta e de outros organismos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi a análise da estrutura da proteína AtRLI2 de *Arabidopsis thaliana*, uma supressora de silenciamento por RNA.

Os objetivos específicos foram:

1. Clonar a proteína AtRLI2 e seus domínios FeS, NBD1, NBD2 e NBD1+NBD2 (NBDs) utilizando o sistema pET.
2. Expressão heteróloga em *E. coli* da proteína AtRLI2 e seus domínios FeS, NBD1, NBD2 e NBDs para sua purificação em larga escala e análise da proteína purificada.
3. Realizar estudos espectroscópicos como DLS (Espalhamento Dinâmico de Luz) e CD (Dicroísmo Circular) e ensaios iniciais de cristalização da proteína e/ou domínios, visando futuramente resolver a sua estrutura tridimensional por cristalografia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem e Obtenção dos Insetos Contendo os Domínios FeS e NBDs da proteína AtRLI2.

O gene que codifica a proteína AtRLI2 completa já se encontrava clonado em vetor pBART por Braz *et al.*, (2004). O gene completo foi sequenciado e apresentou 100% de identidade com a sequência de nucleotídeos e a predita de aminoácidos que codificam AtRLI2 de *A. thaliana*, depositada no GenBank com o nº de acesso: AT4G19210.1, segundo consta no site do genoma da *A. thaliana* (TAIR, www.arabidopsis.org).

A proteína AtRLI2 contém 2 domínios, FeS e NBDs, identificados *in silico* por homologia a domínios semelhantes no banco de dados Pfam como descrito em Braz *et al.*, 2004. Estes domínios se encontram distribuídos da seguinte forma: FeS (RLI + FeS) de 1 a 283 nts (1– 95 aa); NBD1 de 286 a 999 nts (96 – 333 aa); NBD2 de 1002 a 1815 nts (334 -605 aa); NBD1+NBD2 (NBDs) de 286 a 1815 nts (96-605 aa).

Para a clonagem individual dos domínios FeS e NBDs, usando metodologia baseada na amplificação por PCR, utilizou-se os oligonucleotídeos descritos na tabela 1. Aos oligos foram acrescentados sítios de restrição Nde I (5' CATATG 3'/ 3' GTATAC 5') e Xho I (5' CTCGAG 3'/ 3' GAGCTC 5') (tabela 1). Nesse caso, foi utilizado como molde o inserto do gene *atrli2* que se encontrava clonado em vetor pBART segundo descrito por Braz *et al.*, (2004). Os produtos de amplificação do FeS e NBDs foram visualizados em gel de agarose 1%, diluído em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) e corado por brometo de etídio para visualização em trans-iluminador UV (ultravioleta), e posteriormente purificados.

Para produção das proteínas recombinantes, os fragmentos amplificados correspondentes aos domínios FeS e NBDs de AtRLI2 foram subclonados em vetor de expressão pET-28a(+) (Novagen) (Fig. 2) e transformados em células competentes *E. coli* DH5 α (preparação das células competentes no Anexo 1) seguindo o protocolo de choque térmico descrito por Sambrook e Russel (2001).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação das sequências correspondentes aos domínios FeS e NBDs do gene *atrli2*. Em vermelho o sítio de restrição para enzima *Nde* I. Em amarelo o sítio de restrição para a enzima *Xho* I.

Proteína	Oligonucleotídeo	Sequência do oligonucleotídeo
FeS	Senso Nde F 001	5'-GGGAATTC CATATG GCAGATCGATTGAC-3'
	Reverso Xho R 095	5'-CCGC CTCGAG TCAGTGTAACTTAAAAGTGTTTGCCC-3'
NBDs	Senso Nde F 001	5'-GGGAATTC CATATG GCAGATCGATTGAC-3'
	Reverso Xho R 605	5'-CGC CTCGAG CTAATCATCCAAGTAGTAGTATG-3'

3.2. Subclonagem dos Insetos FeS e NBDs de AtRLI2 em pET28a(+)

Para a subclonagem dos fragmentos FeS e NBDs em pET-28a(+) (~5369bp), os DNAs plasmidiais foram digeridos com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I (Fermentas, EUA). Para tal calculou-se a proporção de plasmídeo em relação ao produto de amplificação da seguinte forma:

$$\frac{(QT)(TI) \times 3}{TP}$$

onde: QT = quantidade de plasmídeo (vetor) em ng; TI = tamanho do inserto em Kb e TP = tamanho do plasmídeo (vetor) em Kb.

Os plasmídios foram digeridos utilizando-se 2 U de *Nde* I e 2 U de *Xho* I; tampão R+ (1x) (Fermentas, EUA) e água ultrapura autoclavada em quantidade suficiente para um volume total de reação de 50 µl. Essa reação foi incubada a 37°C de 12 a 16 horas.

Em seguida, procedeu-se na reação de ligação do DNA plasmidial e dos fragmentos FeS e NBDs amplificados, usando-se aproximadamente 20 ng do DNA amplificado, 65-75 ng do vetor, tampão da T4 ligase (Fermentas, EUA) (1x), 2 U de T4 DNA ligase (Fermentas, EUA) e água ultrapura estéril para um volume final de 30 µl. A reação foi incubada a 16°C por 16 horas.

Os produtos de ligação foram usados para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH-5α seguindo o protocolo de choque térmico (Sambrook e Russel, 2001). As células transformadas foram crescidas a 37°C por 16 horas em meio LB (Luria-Bertani) sólido contendo 100 µg/mL de canamicina. As colônias selecionadas foram inoculadas em meio LB líquido contendo 100 µg/mL de canamicina e incubadas a temperatura de 37°C por 16 horas. A cultura foi submetida à mini-preparação de

plasmídeo por lise alcalina como descrito por Sambrook e Russel (2001) e em seguida o vetor pET-28a(+) foi submetido à digestão dupla pelas enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I para verificação da subclonagem.

Para a digestão da construção utilizando o inserto FeS, o plasmídeo foi digerido utilizando-se 2 U de *Nde* I e 2 U de *Xho* I; tampão R+ (1x) (Fermentas, EUA) e água ultrapura autoclavada em quantidade suficiente para um volume total de reação de 50 µl. Essa reação foi incubada a 37°C de 12 a 16 horas.

Para a digestão da construção utilizando o inserto NBDs, o plasmídeo foi digerido utilizando-se 2 U de *Xho* I; tampão R+ (1x) (Fermentas, EUA) e água ultrapura autoclavada em quantidade suficiente para um volume total de reação de 30 µl. Essa reação foi incubada a 37°C de 12 a 16 horas. Em seguida inativou-se a enzima *Xho* I a 65 °C por 5 min e adicionou-se 2 U de *Nde* I; tampão R+ (1x) (Fermentas, EUA) e água ultrapura autoclavada em quantidade suficiente para um volume total de reação de 40 µl. Essa reação foi incubada a 37°C por 12 a 16 horas. Os produtos da digestão foram fracionados em gel de agarose 1% diluído em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) e corado por brometo de etídio para visualização em trans-iluminador UV (ultravioleta). Os clones positivos FeS e NBDs foram ressuspensos em 20% de glicerol, congelados imediatamente em nitrogênio líquido (N₂) e armazenados em freezer -80°C.

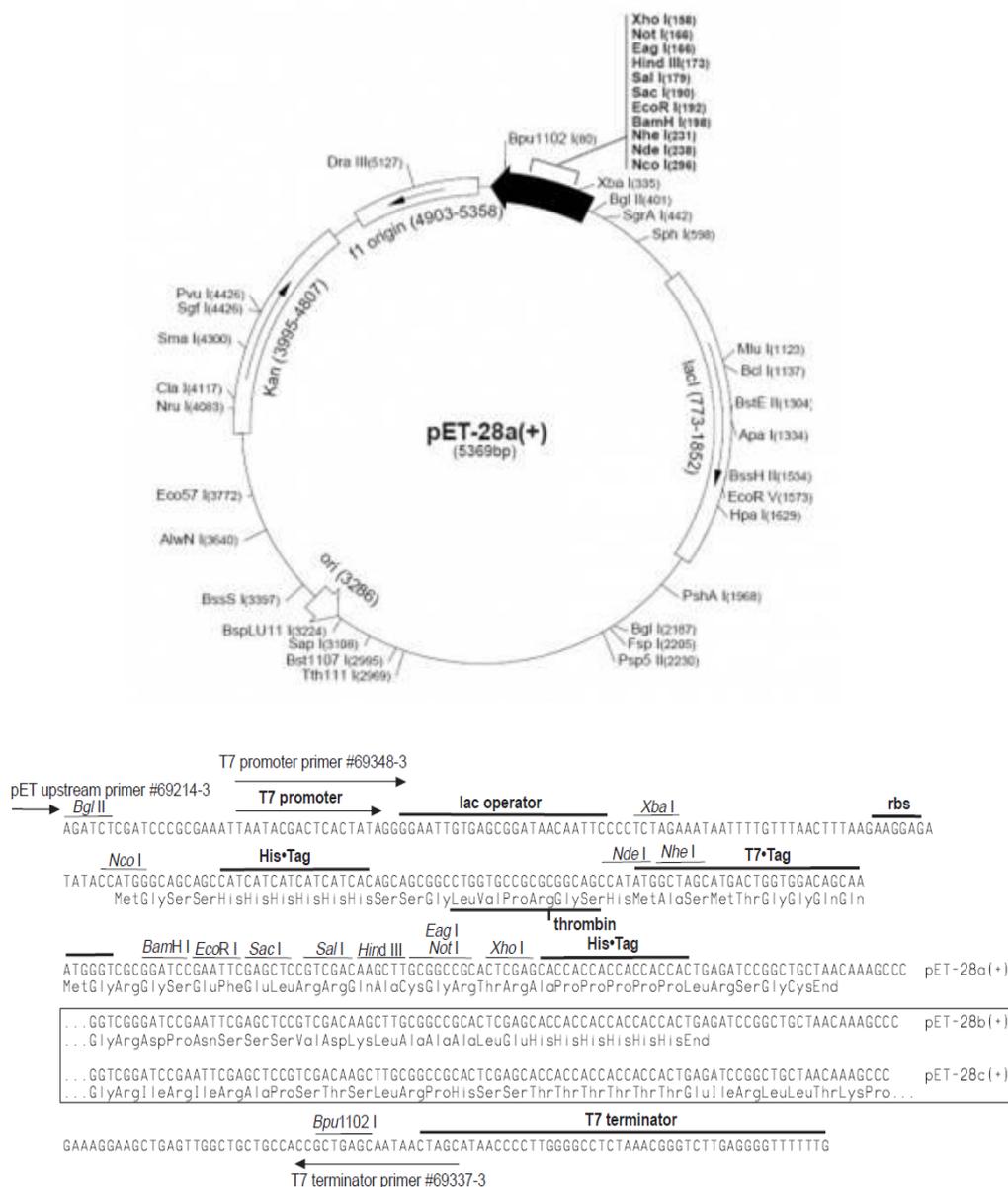


Fig. 2: Mapa do vetor de expressão pET-28a(+) mostrando as regiões de clonagem e expressão. Apresenta uma origem de replicação bacteriana (ori), um centro múltiplo de clonagem ou *polylinker* que contém os sítios de restrição enzimática, gene que confere resistência a canamicina (Kan) e promotor T7lac (fundido ao operador do gene lac) o que possibilita a indução da expressão da proteína recombinante por *isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG).

3.3. Sequenciamento dos Clones Positivos

Os clones considerados positivos por digestão enzimática foram sequenciados. A reação de sequenciamento foi realizada com um kit comercial “Big Dye” versão 3.1 (Applied Biosystems) utilizando os oligonucleotídeos descritos na tabela 2.

Como molde foram utilizados os DNAs plasmidiais (100 a 200 ng) obtidos a partir da mini-preparação de plasmídeo por lise alcalina como descrito por Sambrook e Russel (2001), e os iniciadores na concentração de 10 pmol/μl.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento dos clones FeS e NBDs.

Proteína	Oligonucleotídeo	Sequência do oligonucleotídeo
FeS e NBDs	Senso T7	5'- TTAATACGACTCACTATA-3'
	Reverso T7	5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

As reações de PCR para posterior sequenciamento foram processadas em termociclador *Mastercycler* personal (Eppendorf, German) consistindo das seguintes etapas: (1) desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto; (2) desnaturação a 96°C por 10 segundos; (3) anelamento do oligonucleotídeo a 55°C por 20 segundos; (4) extensão a 60°C por 4 minutos com repetição de 40 ciclos. Os sequenciamentos foram realizados em sequenciador automático modelo *ABI Prism 3100* (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram examinadas e editadas usando-se o programa ChromasPro, versão 1.5. As sequências obtidas correspondentes ao domínio NBDs foram comparadas as sequências depositadas no GenBank utilizando o programa blastn.

3.4. Obtenção da Proteína Recombinante NBDs em *Escherichia coli*

Os plasmídeos pET-28a(+) contendo o inserto NBDs foram transformados por choque térmico em células competentes de *Escherichia coli* da linhagem BL21 (DE3) pRIL *codon plus* e ArcticExpress (DE3) (Stratagene - EUA) (preparação das células competentes no Anexo 1) como descrito por Sambrook e Russel (2001). As colônias transformadas foram inoculadas em meio LB líquido contendo 100 µg/mL de canamicina e 50 µg/mL de cloranfenicol para linhagem BL21 (DE3) pRIL *codon plus* e 20 µg/mL de gentamicina e 50 µg/mL de cloranfenicol para a linhagem ArcticExpress (DE3) e foram incubadas a temperatura de 30°C sob agitação constante em agitador orbital. Um ensaio em separado utilizando essas condições de crescimento acrescida de 5 mg/mL de glicose para a cepa BL21 (DE3) pRIL *codon plus* foi realizado. A cultura foi monitorada até atingir uma DO (densidade óptica) de 0,6 em comprimento de onda a 600 nm quando a expressão foi induzida com adição de 1 mM de IPTG a uma temperatura de 28°C por 4 horas para linhagem BL21 (DE3) pRIL *codon plus* e 1 mM

de IPTG a uma temperatura de 13°C por 24 horas para a indução da expressão em células ArcticExpress (DE3).

As células foram coletadas por centrifugação (10 min a 16000 xg e ressuspendidas em 100 µl de tampão de lise (62,5 mM Tris, 2% SDS, 10% glicerol e 5% β mercaptoetanol). A lise celular para confirmação da indução da expressão, foi realizado nas amostras controle e induzida, e foi completada por aquecimento feito a uma temperatura de 95°C por 5 minutos, processo também necessário para desnaturação das proteínas presentes no tampão de lise. Os resultados foram observados em gel SDS-PAGE 12%. Os clones que apresentaram expressão adequada da proteína foram ressuspendidos em 20% de glicerol, congelados imediatamente em nitrogênio líquido (N₂) e armazenados em freezer -80°C.

3.5. Testes de Solubilidade para a Proteína Recombinante NBDs

Após a confirmação da expressão da proteína recombinante NBDs um novo processo de indução da expressão em *E. coli* BL21 (DE3) pRIL *codon plus*, em pequena escala, utilizando 1 mM de IPTG a uma temperatura de 28°C por 4 horas conforme descrito no item 3.4 foi realizado, a fim de verificar a solubilidade da proteína. As células foram coletadas por centrifugação a 10 min a 16000 xg a 4°C.

Inicialmente o *pellet* foi ressuspendido em 3 mL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 7,0 e NaCl 100 mM) acrescido de 200 µg/mL de lisozima, DNase I, RNase A e um coquetel de inibidores de protease. O resultado foi observado em gel SDS-PAGE 12% corado com *Comassie Blue*.

Protocolos alternativos de lise foram testados, utilizando-se variações no tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH8,8 com NaCl 100 mM; HEPES 20 mM pH 7,0 com NaCl 100 mM; HEPES 20 mM pH 7,0 com NaCl 200 mM; MES 50 mM pH 5,7 com NaCl 100 mM; Fosfato 50 mM pH 7,0 com NaCl 100 mM) bem como sonicação a uma potência de 50 W em pulsos de 30 segundos por 10 vezes. Variações de parâmetros de indução da expressão como temperatura e concentração do agente indutor foram realizadas utilizando as seguintes combinações: 0.4 mM de IPTG a 28° C por 4 horas; 0.4 mM de IPTG a 18° C por 4 horas e 0.2 mM de IPTG a 30°C por 3 horas como descrito por Barthelme e colaboradores (2007). Os resultados foram observados em gel SDS-PAGE 12%.

Também foram realizados o protocolo de lise descrito por Frangioni e Neel (2003) onde o *pellet* da cultura induzida foi ressuspendido em 3 mL de tampão de extração

Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM e 1 mM de EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) acrescido de 200 µg/mL de lisozima, DNase I, RNase A e um coquetel de inibidores de protease. O extrato foi incubado em gelo por 1 hora, agitando-se em vórtex, em intervalos de 10 min. A lise celular ocorreu pela adição de N-Lauril Sarcosil (Sarcosil) em diferentes concentrações: 0,2%, 0,4%, 0,5%, 1% e 1,5%. Após a sonicação utilizando uma potência de 50 W em pulsos de 10 segundos por 10 vezes, foi adicionado aos extratos o detergente Triton X-100, nas concentrações 1%, 1,5%, e 3,0% para as alíquotas da lise utilizando 0,4%, 0,5%, 1% e 1,5%.

3.6. Produção e Purificação da Proteína Recombinante NBDs

Após a confirmação da expressão e solubilidade da proteína recombinante NBDs um novo processo de indução da expressão em *E. coli* BL21 (DE3) pRIL *codon plus*, em larga escala foi realizado para uma purificação em condição desnaturante.

Para tal, as células contendo os clones previamente selecionados por produzirem a proteína NBDs foram inoculados em meio LB líquido contendo canamicina (100 µg/mL) e cloranfenicol (50 µg/mL) em seguida incubados por 12 a 16 horas a 37°C sob agitação constante em agitador orbital. Posteriormente, cerca de 10 mL da cultura bacteriana foram transferidos para 1 L de meio LB líquido contendo os agentes de seleção de canamicina e de cloranfenicol nas concentrações 100 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente. A cultura foi monitorada até atingir uma DO de 0,6 em comprimento de onda a 600 nm quando a expressão foi induzida com adição de 1 mM de IPTG a uma temperatura de 28°C por 4 horas. A cultura foi coletada por centrifugação (10 min, 4788 xg, a 4°C) e os *pellets* foram ressuspendidos em tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 7,5, NaCl 100 mM) acrescido de 200 µg/mL de lisozima, DNase I, RNase A e um coquetel de inibidores de protease. Em seguida, o extrato foi clarificado por centrifugação (10 min, 4788 xg, a 4°C) e uma alíquota do *pellet* e sobrenadante foram separadas para análise em gel SDS-PAGE 12% corado com *Comassie blue*. O *pellet* foi ressuspendido em tampão glicina 20 mM, pH 7,5 e o extrato sonicado a uma potência de 30 W em pulsos de 10 segundos por 10 vezes e em seguida centrifugado durante 20 min, 4788 x g, a 4°C para a obtenção dos corpúsculos de inclusão. Estes foram ressuspendidos em tampão glicina 50 mM pH 7,5 e as proteínas foram desnaturadas na presença de 8 M de uréia (concentração final).

A proteína insolúvel foi purificada em condição desnaturante em aparelho ÄKTA HPLC (GE Healthcare). A fração obtida da lise foi carregada em coluna cromatográfica

de afinidade contendo níquel (*Ni-NTA Qiagen*) e equilibrada com tampão 20 mM glicina, 500 mM NaCl, 7 M de uréia seguindo extensivas lavagens, para remoção de proteínas fracamente ligadas, reduzindo a possibilidade de contaminação da proteína de interesse. As proteínas em complexo com a fase estacionária (coluna contendo níquel) foram eluídas em tampão 20 mM glicina pH 8,0, 500 mM NaCl, 7 M Uréia e 0,5 M imidazol. As frações da eluição foram coletadas e analisadas em gel 12% SDS-PAGE corado com *Coomassie Blue* e quantificadas. As alíquotas mais puras da proteína foram reunidas em duas frações (A e B), de forma a se obter a mesma concentração da proteína em cada fração. À fração A adicionou-se 200 µg (concentração final) de DNA esperma de salmão (Eppendorf) e 10 mM de cloreto de magnésio a fim de obter a proteína renaturada. A fração B, serviu como controle e ambas foram dialisadas por 16 horas contra 2 L de tampão glicina 50 mM pH 7,5, sob agitação a 4°C, a fim de eliminar toda uréia e imidazol da mistura.

Após a diálise, essas amostras apresentavam-se precipitadas e foram separadas do sobrenadante por centrifugação por 10 min, 4788 x g, a 4°C. Em seguida os precipitados contendo as proteínas foram ressolubilizados em tampão glicina 50 mM pH 7,5 contendo e 7 M uréia (concentração final) e às duas frações (A e B) adicionou-se 60 µM de dATP (Fermentas, EUA), para a renaturação da proteína. As frações foram dialisadas por 4 horas contra 2 L de tampão glicina 50 mM pH 7,5 sob agitação a 4°C, a fim de eliminar toda uréia e os precipitados visíveis na mistura. As frações solúveis obtidas (A e B) foram quantificadas e visualizadas em gel SDS-PAGE 12 % corado com *Coomassie Blue*.

Uma purificação em condição nativa também foi empregada. Para tal as frações originadas da indução em larga escala foram submetidas ao teste de solubilidade utilizando sarcosil na concentração 0,2 % (item 3.5) e foram reunidas e carregada em coluna cromatográfica de afinidade contendo níquel (*Ni-NTA Qiagen*), em aparelho ÄKTA HPLC (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 com 100 mM NaCl e 10 mM de imidazol seguida de extensivas lavagens, para remoção de proteínas fracamente ligadas, reduzindo a possibilidade de contaminação da proteína de interesse. Utilizou-se tampão de eluição Tris-HCl 20 mM pH 7,5 com 100 mM NaCl e 100 mM de imidazol para retirada das proteínas em complexo com a fase estacionária (coluna contendo níquel).

A concentração e o grau de pureza da proteína após a purificação foram medidos utilizando espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc). Para tal foi

realizada uma predição teórica do coeficiente de extinção molar ou absorvidade molar (ϵ) através do programa *ProtParamTools* (<http://www.expasy.org/tools/#primary>). A análise da composição deduzida de aminoácidos da proteína NBDs iniciou-se pela tradução no programa *Translate tool* (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>) utilizando a sequência de DNA que codifica para o domínio NBDs do gene *atrli2* (nº de acesso: At4g19210).

Outro método utilizado para dosagem da concentração final da proteína, foi o método de Bradford (1976) que se baseia na complexação do reagente de Bradford com as cadeias polipeptídicas das proteínas, comparado a uma curva padrão de BSA (Bovine Serum Albumin) para obtenção da curva padrão. O sistema de reação foi composto por 980 μ l da solução corante de Bradford (BioRad) e 20 μ l da amostra. Uma reação utilizando 980 μ l da solução corante de Bradford e 20 μ l de água foi usada como branco. A mistura foi homogenizada e a absorbância a um comprimento de onda de 280 nm foi verificada.

3.7. Análise da expressão e purificação da proteína recombinante NBDs por *Western blot*

A expressão e a purificação da proteína NBDs fusionada aos resíduos His₆-tag foi analisada através de *Western blot*. Estes ensaios foram realizados utilizando-se extratos totais induzidos de *E. coli*, bem como a proteína recombinante purificada. Para tal utilizou-se o *Kit Amplified Alkaline Phosphatase immun-Blot* (Bio-RAD) e o anticorpo primário monoclonal anti-His₆ tag (Abican) na proporção 1:1000, cedidos gentilmente pela Prof. Maria Isabel Cano do Departamento de Genética – UNESP-Botucatu. O ensaio foi realizado conforme recomendação do fabricante.

As proteínas NBDs expressas, purificadas e dialisadas foram resolvidas em gel SDS-PAGE 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando aparato próprio para o fim submerso em tampão de transferência. O sistema foi submetido a uma voltagem de 100 V por 16 horas e em seguida reveladas com anticorpo primário monoclonal anti-His₆ tag (Abican) na proporção 1:1000, utilizando-se o *Kit Amplified Alkaline Phosphatase immun-Blot* (Bio-RAD).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção dos Clones FeS e NBDs

A partir da sequência de nucleotídeos e aminoácidos de AtRLI2 indentificadas no banco de dados de domínios de proteínas Pfam por Braz *et al.*, 2004 (nº de acesso do TAIR: AT4G19210.1) (sequência completa do cDNA do gene na figura 3) foram desenhados 4 genes truncados para se obter proteínas contendo os domínios nomeados FeS (FeS+RLI), NBD1, NBD2 e NBDs (NBD1+NBD2) conforme mostrado na Figura 4. O inserto FeS compreende a porção N-terminal da proteína apresentando 283 pares de base (pb), NBD1 (713 pb) correspondente à porção mediana e o NBD2 (813 pb) representam a porção C- terminal de AtRLI2. Os insertos FeS e NBD1 ligado à NBD2 (NBDs, 1626 nts) correspondem as construções trabalhadas.

```
ttcattctgagcaaagcagtaactctcaggtgctgtgctctccgctggttccttagaac
aatcggcacacgctttttcatttcaatcttcttcttctactcttaagtatctcaggtctg
ttgagag
```

FeS

```
atggcagatcgattgacacgtattgctattgtgagttcagaccgttgcaagccaaagaaa
M A D R L T R I A I V S S D R C K P K K
tgtcgccaagagtgcaagaagagttgtcctgtgggtcaagacaggaaaactttgtattgag
C R Q E C K K S C P V V K T G K L C I E
gtgactggttggttccaagcttctttatctcagaggagttgtgtatcggttgcggtatt
V T V G S K L A F I S E E L C I G C G I
tgtgtgaagaaatgcccgtttgaagctattcagattatcaatcttccaagagacttgag
C V K K C P F E A I Q I I N L P R D L E
aaagatacagccatcgttatggggcaaacacttttaagtta
K D T T H R Y G A N T F K L
```

NBDs

```
acaggtcccagttccaagaccagggcaggtgctaggggttggttgaaccaatggtattg
T G S Q F Q D Q G R C - G W L E P M V L
gaaaatcaactgctctgaaaattttggtggaagctcaaaccaaatggggccgtttca
E N Q L L - K F W L E S S N Q I W A V S
ctagtcctccagactggcaagaaatcttgactcacttccgtgggttcagaacttcaaact
L V L Q T G K K S - L T S V V Q N F K T
acttcacacgtattctagaagataatcttaaggccattataaagcctcaatagtgcgacc
T S H V F - K I I L R P L - S L N M S T
acatcccaagagcagttaaaggcaatggtggagaggtccttgaccagaaggatgagagag
T S Q E Q L K A M L E R S L T R R M R E
ataagaaggcagagctctgtgctgatctggagctgaaccaggtcattgaccgtgatggtg
I R R Q S S V L I W S - T R S L T V M L
agaatctctgggtggtgagctgcagaggtttgcaatcgctggttggccatacaaaaatg
R I Y L G V V S C R G L Q S L L L P Y K M
cagagatttacatggttgaacatctagttacctcgatgtaagcaaagactcaaag
Q R F T C L M N H L V T S M L S K D S K
ctgctcaagttggtcgttctctcctgaggcctaataagctacgtcattggttggagcatg
L L K L F V L S - G L I A T S L L W S M
atctcagtggttcttgattacttgtcggatttcatgtgctgtctgtatgggaaaccaggag
I S V F L I T C R I S F A V C M G N Q E
cctatggtggtgactctccccttctctgtcagagaaggaaatcaacatcttcttggtctg
```

P M V W - L S P S L S E K E S T F S W L
 gatttggttcctacagaaaatttacgtttttagagatgaatccttgaccttcaagggttgctg
 D L F L Q K I Y V L E M N L - P S R L L
 agactccacaagaaagtgctgaagagatacagtcgtacgctaggtacaaataccacgca
 R L H K K V L K R Y S R T L G T N T P R
 tgaccaaaactcaaggaaacttcagggttgagagtgctcggaagggtgaattcactgactctc
 - P K L K E T S G - E C R K V N S L T L
 agattattgtaatgcttggggagaatggtacaggggaagacaacatttattcggatgctgg
 R L L - C L G R M V Q G R Q H L F G C W
 ccgggttgttgaaaccagacgacagagaccagacagagataccagaattcaatg
 P G C - N Q T T Q K D Q T E R Y Q N S M
 tttcgtataagccacaaaagatcagcccaaagtttcagaattcagttaggcacctgctac
 F R I S H K R S A Q S F R I Q L G T C Y
 atcaaaagattcagagattccttacatgcatccacaatttatgtcggatgtgatgaaaccac
 I K R F E I L T C I H N L C R M - - N H
 ttcagattgagcagttgatggatcaagaagttgtcaatctctcaggaggagaattgcaa
 F R L S S - W I K K L S I S Q E E N C K
 gggttgcattaactctgtgcctcggaaagcctgcgatataacctgatcgatgagccaa
 G L H - L C A S E S L R I Y T - S M S Q
 gtgcatactctcgattctgagcaacgtattgttgcttctaaagtcataaagcgatttattc
 V H I S I L S N V L L L L K S - S D L F
 tccacgcaaagaaaactgcattttagtgcgagcatgactttataatggcgacctatttgg
 S T Q R K L H L - S S M T L - W R P I W
 cagaccgggtcattgtgatgaaggacaaccatccattgattgtactgcaaattgtcctc
 Q T G S L C M K D N H P L I V L Q I V L
 aatcactgctcagtggaatgaatctcttctctcatctgaacatcacattcagacggg
 N H C S V E - I S S Y L I - T S H S D G
 atccccaccaatttcagaccaagaatcaacaaattggagtcgaccaaagacagggaaacaga
 I P P I S D Q E S T N W S R P K T G N R
 agtctgcaggctcatactactacttggatgat **tag**
 S L Q A H T T T W M I
 ttaggacaactaccaagagaatatagggcattgttcgaattccagaagggtcttttgctc
 agaggaagttgatctatgagctcggaaatattttacgcagccatctgttttccgagtgcat
 aagcacagatgtttctttctgtgcaagcttttaattgttgtttcatcagttttacttcta
 cttttctctctcacagcttttattaactgagcaataaaaagttaagaatctgtaacctt
 tttttctttttggctttgtacttctctgagttgatgatttcaacatttactgtgatgttac
 tactttggattttacaatctattgcctatttttacatt

Fig. 3. Sequência completa do cDNA do gene de AtRLI2 de *Arabidopsis thaliana* depositadas no GenBank sob o número de acesso AT4G19210.1 gi|145340416|ref|NM_118041.4|, e suas regiões correspondentes aos domínios FeS e NBDs. Em vermelho estão as sequências 5'e 3' UTR do gene, respectivamente. Em azul está o códon de início da transcrição e em roxo o códon de parada. Em cinza está sequência de aminoácidos deduzida na *ORF* +1 a partir do programa *ProtParamTools* (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>).

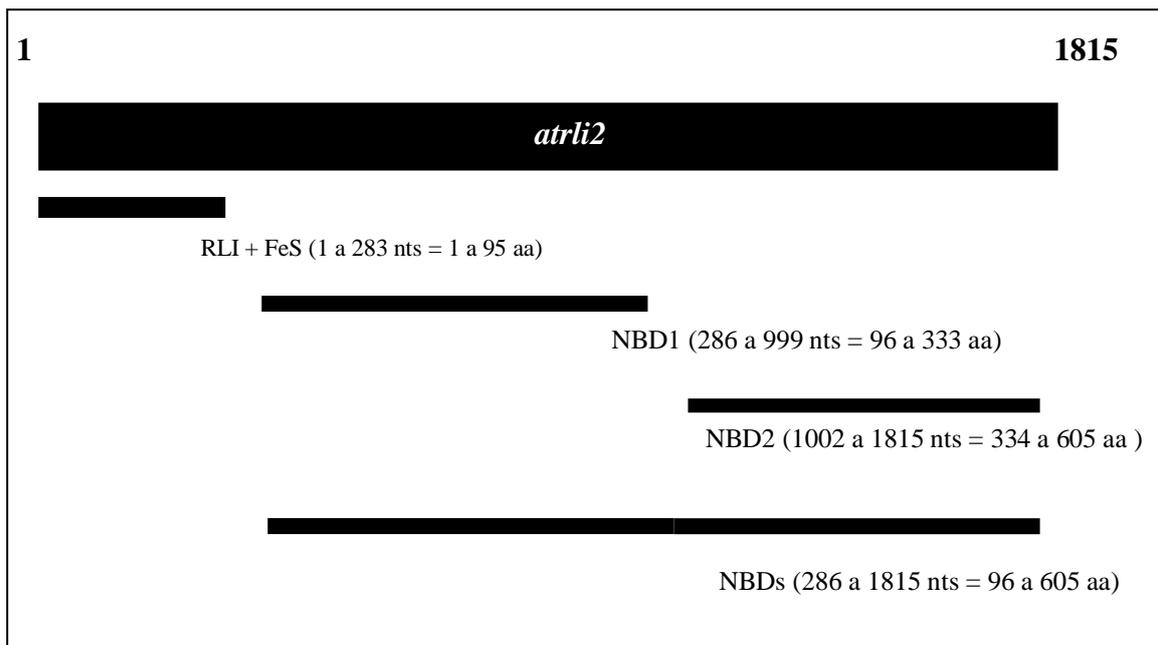


Fig. 4. Diagrama mostrando a posição dos fragmentos FeS e NBDs em relação ao gene que codifica a proteína AtRLI2. Os números 1 a 1815, indicam a posição do primeiro e último nucleotídeo (nts) no gene *atrli2*, nucleotídeos 286 a 999 no NBD1, nucleotídeos 1002 a 1815 no NBD2 e nucleotídeos 286 a 1815 nos NBDs. O número correspondente de aminoácidos para cada fragmento é indicado por aa.

Para a subclonagem dos insertos FeS e NBDs o vetor de expressão pET-28a(+) foi digerido previamente com as enzimas de restrição específicas *Nde* I e *Xho* I, de forma a permitir a produção de terminais coesivos para uma clonagem direcionada no vetor e que as proteínas resultantes fossem expressas, em fase de leitura, com uma cauda de resíduos de histidina (*His₆ tag*) na sua porção N-terminal o que possibilita a posterior purificação das proteínas usando coluna cromatográfica de afinidade por níquel (*Ni-NTA Qiagen*) em HPLC (*High-performance liquid chromatography*). Os produtos de amplificação por PCR já continham os fragmentos de extremidades coesivas de forma a facilitar a clonagem direcionada. As subclonagens dos insertos FeS e NBDs foram confirmadas por digestão com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I fracionada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio conforme mostrado nas Figs. 5 e 6, respectivamente.

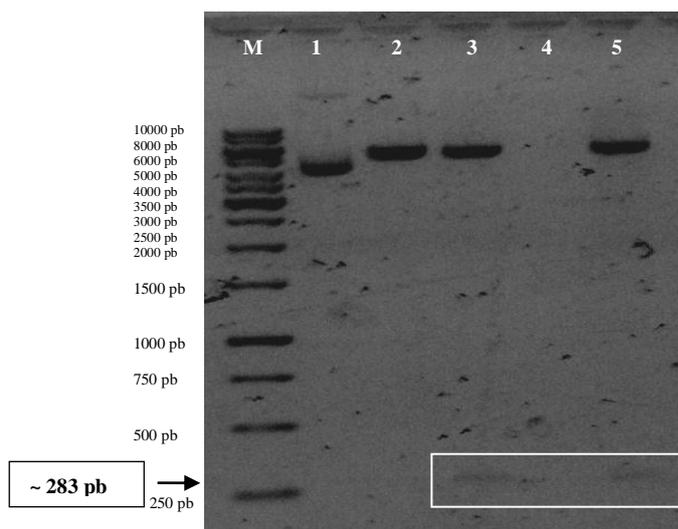


Fig. 5. Gel de agarose 1% (TBE 1x) corados com brometo de etídeo mostrando a subclonagem do inserto FeS de AtRLI2 em vetor pET-28a(+). Reação de digestão com enzimas *Nde* I e *Xho* I. M: Marcador de massa molecular 1Kb - O'GeneRuler *ready-to-use* (Fermentas, EUA). Na linha 1 está o plasmídeo pET-28a(+) fechado sem o inserto, na linha 2 está o plasmídeo com o inserto linearizado com *Nde* I, nas linhas 3 e 5 está o plasmídeo digerido com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I e os clones FeS destacados por um retângulo em branco. A caixa seguida de uma seta indica a posição do número específico de pares de base do FeS (~283 bp).

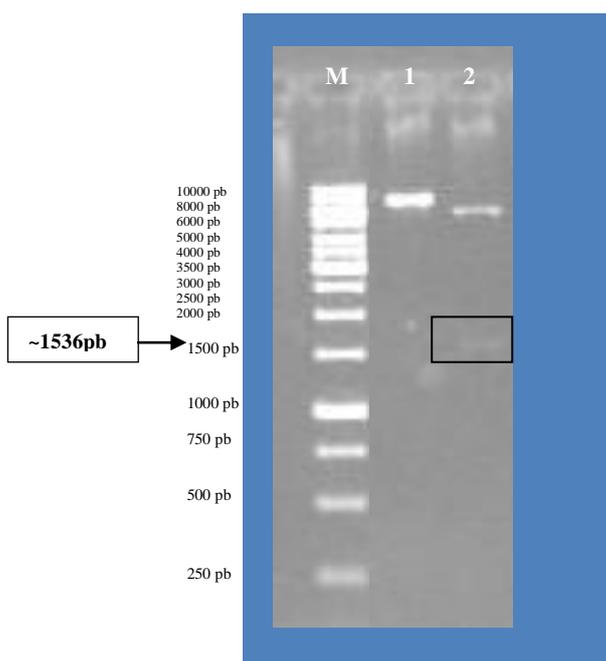


Fig. 6. Gel de agarose 1% (TBE 1X) corado com brometo de etídeo mostrando a subclonagem do inserto NBDs de AtRL2 em vetor pET-28a(+). Reação de digestão com enzimas *Nde* I e *Xho* I. M: Marcador de massa molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 250-10,000 pb (Fermentas, EUA). Na linha 1 está o plasmídeo com o inserto linearizado com *Nde* I, nas linhas 2 está o plasmídeo digerido com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I e o clone NBDs destacado por um retângulo em preto. A caixa seguida de uma seta indica a posição do número específico de pares de base do NBDs (~1536).

4.2. Confirmação da Obtenção dos Clones NBDs e FeS por Sequenciamento do DNA

Os clones NBDs e FeS considerados positivos por digestão enzimática (*Nde* I e *Xho* I) do plasmídeo pET-28a(+) foram sequenciados utilizando os iniciadores descritos na tabela 2, para certificar-se de que os clones continham a sequência codificante para cada domínio.

O resultado do sequenciamento utilizando o iniciador senso T7 correspondente à região do promotor T7 do pET-28a(+) no qual o inserto NBDs foi subclonado, revelou que o inserto NBDs encontra-se inserido em fase de leitura com o plasmídeo pET-28a(+) e que este possui o resíduo His₆ tag na região N-terminal bem como o sítio de restrição para enzima *Nde* I (Quadro 1, linha A).

Para verificar a identidade das sequências obtidas correspondentes ao domínio NBDs com gene *atrli2* de *Arabidopsis thaliana*, foi realizada uma comparação com o GenBank usando o programa blastn. A sequência comparada apresentou uma identidade de 100% com o gene *atrli2* de *Arabidopsis thaliana* como mostra a Figura 7.

Quadro 1. Representação da sequência de nucleotídeos obtidas a partir de sequenciamento automático do plasmídeo pET-28a(+) no qual os insertos FeS e NBDs de AtRLI2 foram clonados. Na linha A está o resultado do sequenciamento do clone NBDs usando o iniciador senso T7. Em vermelho os nucleotídeos correspondentes ao resíduo His₆ tag na porção N-terminal, em verde o sítio de restrição *Nde* I e sublinhado os nucleotídeos correspondentes às regiões NBDs. Na linha B está o resultado do sequenciamento do clone FeS usando o iniciador senso T7. Em amarelo as posições das seqüências do sítio de reconhecimento ribossomal (rbs) do pET28(a+), em vermelho uma modificação no sítio anterior ao sítio de restrição *Nde* I, em verde o sítio de restrição *Nde* I, sublinhado, os nucleotídeos correspondentes à região FeS, em roxo o *stop* codon TGA, em azul o sítio *Xho* I, e em cinza, os nucleotídeos correspondentes ao resíduo His₆ tag na porção C-terminal.

<p>A</p> <p>CATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGACAGGCTCCCAGTTCCAAGACCAGGGCAGGTGCTAGGGTTGGTTGGAACCAATGGTATTGGAAAATCAACTGCTCTGAAAATTTGGCTGGAAAGCTCAAACAAA TTTGGGCCGTTTCACTAGTCTCCAGACTGGCAAGAAATCTTGACTCACTTCCGCGGTTCCAGAACTTCAAACTACTT CACACGTATCTAGAAGATAATCTTAAGGCCATTATAAAGCCTCAATATGTCGACCACATCCCAAGAGCAGTTAAAG GCAATGTTGGAGAGGTCCTTGACCAGAAGGATGAGAGAGATAAGAAGGCAGAGCTCTGTGCTGATCTGGAGCTGAA CCAGGTCATTGACCGTGATTTGAGAATTTATCTGGTGGTGAGCTGCAGAGGTTTGAATCGCTGTTGTTGCCATACA AAATGCAGAGATTACATGTTTGATGAACCATCTAGTTACCTCG</p>
<p>B</p> <p>ANAGTTCCTCNTAGNNNNNTTTTGNAGAACATTTAAGAAGGAGATATTNCCCTGGTGAACGAAATGCGAGATG ACACGCGTCCGCATATGGCAGATCGATTGACTCNTATNGCNATTGTGAGTTCAGACCGTTGCAAGCCAAAGAAATGT CGCCAANGAGTGCAAGAAGAGTTGTCTGTGGTCAAGACAGGAAAACCTTTGTATTGAGGTGACTGTTGGTTCCAAGC TTGCTTTTATCTCAGAGGAGTTGTGAATCGGNTGCGGTATTTGTGTGAAGAAATGCCCGTTGAAGCTATNCAGATTA TCAATCTTCCAAGAGACTTGGAGAAAAGATACGACCCATCGTTATGGGGCAAACACTTTTAAAGTTACACTGACTCGAG CACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGNTAACAAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCNCTGA</p>


```

Query 1      GAGCCTGCAGACTTCTGTCCCTGTCTTTGGTCGACTCCAATTTGTTGATTCTTGGTCTG 60
|
Sbjct 1923   GAGCCTGCAGACTTCTGTCCCTGTCTTTGGTCGACTCCAATTTGTTGATTCTTGGTCTG 1864

Query 61     AAATTGGTGGGATCCCGTCTGAATGTGATGTTTCAGATGAGATAAGAAGAGATTTCATTCCA 120
|
Sbjct 1863   AAATTGGTGGGATCCCGTCTGAATGTGATGTTTCAGATGAGATAAGAAGAGATTTCATTCCA 1804

Query 121    CTGAGCAGTGATTGAGGACAATTTGCAGTACAATCAATGGATGGTTGTCCTTCATACACA 180
|
Sbjct 1803   CTGAGCAGTGATTGAGGACAATTTGCAGTACAATCAATGGATGGTTGTCCTTCATACACA 1744

Query 181    ATGACCCGGTCTGCCAAATAGGTGCGCATTATAAAGTCATGCTCGACTACAAATGCAGTT 240
|
Sbjct 1743   ATGACCCGGTCTGCCAAATAGGTGCGCATTATAAAGTCATGCTCGACTACAAATGCAGTT 1684

Query 241    TTCTTTGCGTGGAGAATAAATCGCTTTATGACTTTAGAAGCAACAATACGTTTGCTCAGAA 300
|
Sbjct 1683   TTCTTTGCGTGGAGAATAAATCGCTTTATGACTTTAGAAGCAACAATACGTTTGCTCAGAA 1624

Query 301    TCGAGATATGCACTTGGCTCATCGATCAGGTATATATCCGCAGGCTTCCGAGGCACAGA 360
|
Sbjct 1623   TCGAGATATGCACTTGGCTCATCGATCAGGTATATATCCGCAGGCTTCCGAGGCACAGA 1564

Query 361    GTTAATGCAACCCCTTTGCAATTCTCCTCCTGAGAGATTGACAACCTTCTTGATCCATCAAC 420
|
Sbjct 1563   GTTAATGCAACCCCTTTGCAATTCTCCTCCTGAGAGATTGACAACCTTCTTGATCCATCAAC 1504

Query 421    TGCTCAATCTGAAGTGGTTTCATCACATCCGACATAAATTGTGGATGCATGTAAGAATCT 480
|
Sbjct 1503   TGCTCAATCTGAAGTGGTTTCATCACATCCGACATAAATTGTGGATGCATGTAAGAATCT 1444

Query 481    CGAATCTTTTGATGTAGCAGGTGCCTAACTGAATTCTGAAACTTTGGGCTGATC 534
|
Sbjct 1443   CGAATCTTTTGATGTAGCAGGTGCCTAACTGAATTCTGAAACTTTGGGCTGATC 1390

```

ID GENE: 827661 – *atrli2* de *Arabidopsis thaliana*

Length=2279

Score = 987 bits (534), Expect = 0.0

Identities = 534/534 (100%), Gaps = 0/534 (0%)

Strand=Plus/Minus

Fig. 8. Análises da sequência de nucleotídeos obtida por sequenciamento automático utilizando o iniciador reverso T7 correspondente a região do terminador T7 do pET-28a(+), no qual o inserto NBDs de *AtRLI2* foi clonado, usando o programa blastn. As sequências das linhas *Query* correspondem a sequências obtidas utilizando o iniciador reverso T7 correspondente a região do terminador T7 do pET-28a(+). As sequências das linhas *Sbjct* correspondem as sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank. A comparação de sequência indicou 100% de indentidade com gene *atrli2* de *Arabidopsis thaliana*.

O resultado do sequenciamento utilizando o iniciador senso T7 correspondente a região do promotor T7 do pET-28a(+) no qual o inserto FeS foi subclonado revelou a presença da região codificante para o domínio FeS, do códon de terminação TGA, o sítio de restrição para a enzima *Xho* I, e os resíduos *His6 tag* (Quadro 1, linha B). Entretanto, os resultados evidenciaram que o plasmídeo apresenta uma modificação entre os seus sítios anterior ao sítio de restrição *Nde* I levando a formação de um peptídeo diferente do *His6 tag* que quando comparado a sequências depositadas no GeneBank apresentam 100% de indentidade com sequência própria de *Xylella fastidiosa*

(dados não mostrados). Esta modificação não foi identificada nas análises de digestão enzimática (Fig. 5) uma vez que as bandas digeridas foram geradas no tamanho esperado.

Essa construção já havia sido induzida à expressão em *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) pRIL *codon plus* e obtida na fração solúvel. A proteína produzida expressa também foi purificada e apresentou características próprias de *clusters* FeS como cor, oxidação e tamanho molecular esperado. O rendimento da purificação foi da ordem de 80 mg/L. Para os estudos estruturais, a proteína purificada foi avaliada por experimentos de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Nestas condições, uma baixa polidispersidade (8,9%) foi obtida e com base nestes resultados, experimentos de cristalização da proteína foram iniciados. Foram obtidos pequenos cristais após um mês da montagem dos experimentos. A fim de realizar estudos funcionais, anticorpos contra a proteína também foram obtidos e titulação dos anticorpos feita por ELISA mostrou que os anticorpos produzidos reconheceram o peptídeo a um alto título (1/2560) (dados não detalhados e não mostrados).

No entanto, devido à presença da modificação, não foi possível concluir a integridade desta construção não sendo possível confirmar se o inserto, ao ser expresso, poderia ter saído de fase de leitura com plasmídeo pET-28a(+). Sendo assim, optou-se por trabalhar com a construção correspondente ao domínio NBDs, uma vez que este se encontra corretamente clonado.

4.3. Obtenção da Proteína Recombinante NBDs e Testes de Solubilidade

O plasmídeo pET-28a(+) carregando o fragmento de DNA codificante para a proteína NBDs foi transformado em bactérias *E. coli* competentes da cepa de expressão BL21 (DE3) pRIL *codon* e *E. coli* ArcticExpress (DE3).

A escolha por esses sistemas de expressão no contexto deste trabalho deveu-se ao fato de que as células hospedeiras da série BL21 são deficientes nas proteases Lon e OmpT, que podem degradar a proteína recombinante, e possuem o lisogene lambda DE3 que confere elementos genéticos relevantes compatíveis com o sistema pET. O vetor pET-28a(+) possui o promotor da T7 RNA polimerase cuja expressão requer o fragmento DE3 (gene 1 do bacteriófago T7) que esta sob controle do promotor *lacUV5* induzido por IPTG o qual se associa ao repressor e o inibi, deixando o promotor livre

para a interação com a RNA polimerase e posterior transcrição do gene que esta sob seu controle. Uma cópia do gene *lacI* que codifica uma proteína repressora, o repressor *lac*, esta presente no genoma de *E. coli* e no sistema pET. O repressor *lac* reprime o promotor *lacUV5* e o promotor híbrido T7/*lac* codificado pela expressão do plasmídeo. A T7 RNA polimerase é transcrita quando o IPTG se liga e libera o repressor *lac* do operador *lac*. A transcrição do gene alvo, que esta clonado no sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo e sob o controle do promotor híbrido T7/*lac*, é iniciada subsequentemente pela T7 RNA polimerase (Anexo 2) (Novagen, 2005; Sorensen e Mortensen, 2005).

Além desse sistema de expressão altamente controlado em bactéria o vetor pET possui uma seqüência que codifica uma calda para 6 resíduos de histidina (*His₆ tag*) na região N-terminal e C-terminal permitindo que a proteína de interesse produzida seja purificada por cromatografia de afinidade tanto em condições nativas quanto desnaturantes por sua ligação a íons níquel imobilizados em coluna cromatográfica (Novagen, 2005; Sorensen e Mortensen, 2005). Os resíduos *His₆ tag* por serem de pequeno tamanho são pouco imunogênicos não interferindo significativamente na produção de anticorpos em animais modelos, contribuem muito pouco para a conformação da molécula não comprometendo significativamente a função biológica da proteína e elimina comumente a necessidade de remoção proteolítica (Sambrook e Russel, 2001; Woestenenk *et al.*, 2004). Além disso, estudos sugerem que *His₆ tag* posicionados na região N-terminal tem um efeito menos negativo sobre a solubilidade da proteína do que *tags* posicionados na região C-terminal (Woestenenk *et al.*, 2004).

As cepas de expressão BL21 (DE3) pRIL *codon plus* possuem códons raros, o que diminui a incompatibilidade de códons preferenciais entre o gene a ser expresso e o hospedeiro (Sambrook e Russel, 2001).

As cepas ArcticExpress co-expressam as chaperoninas Cpn10 e Cpn60 de *Oleispira antarctica*. O emprego do ensaio de expressão utilizando esta cepa representa uma estratégia para recuperação da proteína recombinante na sua forma solúvel, uma vez que as chaperoninas podem conferir melhor processamento de proteínas em baixas temperaturas e, potencialmente, aumentar o rendimento da proteína na sua forma ativa. Além disso, as cepas de expressão ArcticExpress faltam, naturalmente, a protease Lon que pode degradar proteínas recombinantes (Schein, 1989; Ferrer *et al.*, 2003).

Neste trabalho, não se obteve sucesso na indução da expressão da proteína recombinante NBDs usando cepas ArcticExpress (dados não mostrados). A proteína foi

obtida em *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) pRIL *codon plus* onde se conseguiu induzir a expressão utilizando 1 mM de IPTG a uma temperatura de 28°C por 4 horas em uma DO de 0,6 num comprimento de onda a 600 nm. De acordo com os resultados mostrados na Figura 9, pode-se observar que o teste de expressão foi bem sucedido, resultando na proteína apresentando o seu tamanho esperado (~64 kDa).

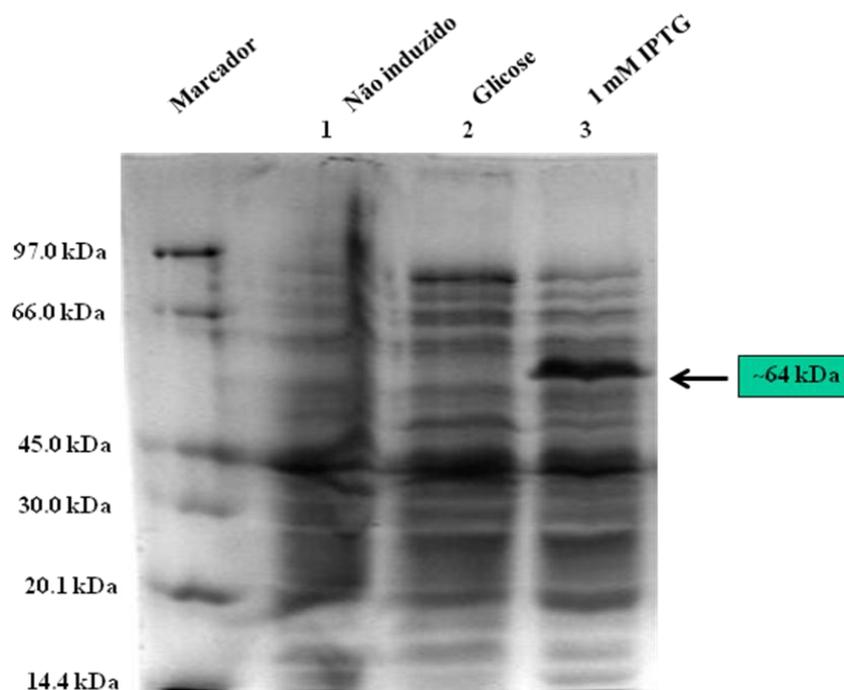


Fig. 9. Gel SDS-PAGE 12% mostrando a indução da expressão em *E. coli* proteína da recombinante NBDs de AtRLI2. O gel foi corado com *Comassie blue*. Marcador de peso molecular LMW *Protein Molecular Weight Markers* (GE Healthcare). Na linha 1 está extrato protéico total de células sem adição de IPTG que serviu como controle, na linha 2 está extrato protéico total de células com adição de 5 mg/mL de glicose na etapa de crescimento a 37°C a fim de evitar uma possível expressão basal da proteína e toxicidade ao hospedeiro e na linha 3 está o extrato protéico total de células cuja expressão foi induzida com adição de 1 mM de IPTG a uma temperatura de 28°C por 4 horas em uma DO de 0,6 num comprimento de onda a 600 nm. A caixa em verde seguida de uma seta indica a banda referente à proteína (~64 kDa).

Um ensaio de indução da expressão utilizando 5 mg/mL de glicose nas condições de crescimento a 37°C foi realizado a fim de evitar essa expressão basal. Para essa condição não houve sucesso na expressão (Fig. 9), provavelmente, pela super-regulação da expressão da proteína heteróloga pela glicose que atua regulando negativamente o gene *lac operon* (Novagen, 2005; Sorensen e Mortensen, 2005; Tan *et al.*, 2007).

A utilização da glicose nos ensaios de expressão da proteína NBDs, deu-se ao fato de que na ausência de IPTG ocorre uma expressão basal da T7 RNA polimerase

que esta sob controle do promotor *lacUV5* no lisogene DE3 ocasionando, subsequentemente, uma expressão basal da proteína alvo cuja sequência esta inserida posteriormente ao promotor T7 do pET. As proteínas recombinantes expressas em *E. coli* podem interferir na função normal da célula e portanto podem ser tóxicas para a bactéria (Novagen, 2005).

Como descrito por Grossman e colaboradores (1998), um baixo nível de expressão basal no sistema pET pode ser mantido pela suplementação do meio com glicose. Na fase estacionária do crescimento bacteriano, toda glicose é primeiramente consumida e fontes alternativas de carbono são então utilizadas causando aumento dos níveis de cAMP (*Cyclic Adenosine Monophosphate*) estimulando a transcrição do promotor *lacUV5* e subsequentemente a expressão da T7 RNA polimerase no lisogene DE3 (Novy e Morris, 2001) juntamente com a expressão do gene alvo como descrito anteriormente. Entretanto, promotores *lacUV5* são menos sensíveis à regulação pelo complexo cAMP-CAP (cAMP- Activator Protein Catabolites), que estimula o início da transcrição, do que o promotor *lac*. O cAMP é produzido em resposta a baixos níveis de glicose, contudo, a incorporação de glicose no meio de cultura reduz os níveis de cAMP e aumenta a repressão do promotor *lac* significativamente (Novy e Morris, 2001). A glicose atua, então, evitando ou minimizando uma expressão basal da proteína alvo no intuito de neutralizar uma possível toxicidade da proteína recombinante para o hospedeiro (Novagen, 2005; Sorensen e Mortensen, 2005).

Inicialmente, o comportamento da proteína NBDs quanto à solubilidade foi analisado no tampão de extração Tris-HCl 50 mM pH 7,0 e NaCl 100 mM acrescido de 200 µg/mL de lisozima. Para esta condição a proteína apresentou-se na fração insolúvel (dados não apresentados).

Na tentativa de favorecer a expressão da proteína na sua forma solúvel em condição nativa algumas modificações foram empregadas ao protocolo original de expressão, dentre elas a diminuição da temperatura de indução e menor concentração de IPTG. A temperatura é uma variável do sistema que afeta diretamente o nível de expressão e a solubilidade da proteína, logo, uma diminuição na temperatura leva a uma diminuição nos níveis de expressão, permitindo que o peptídeo tenha maior tempo de alcançar corretamente sua estrutura terciária.

Outros procedimentos foram testados para obter a proteína na fração solúvel tais como variação do tampão de lise, variação da força iônica, e a adição de diferentes agentes

solubilizadores tais como detergente iônico e não-iônico e agentes redutores. Os resultados mostraram que, na maioria dos testes empregados, a proteína continuava na fração insolúvel do lisado celular. A Figura 10 mostra a insolubilidade da proteína utilizando sonicação a uma potência de 50 W.

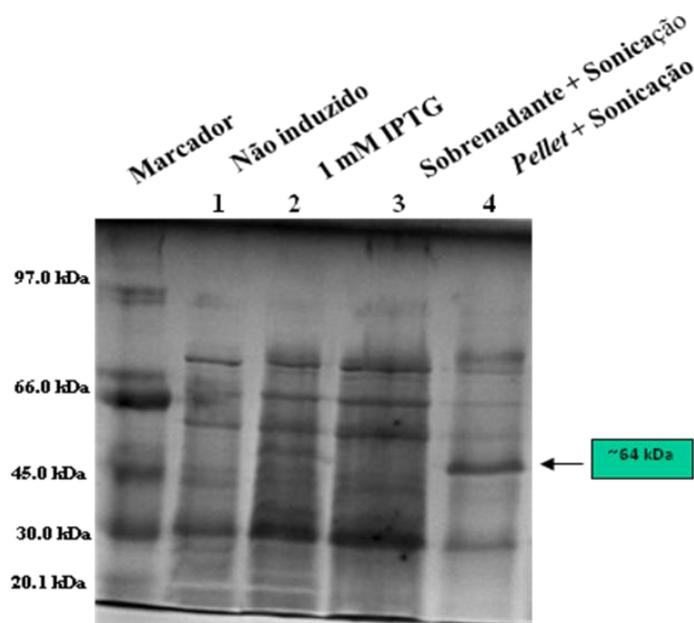


Fig. 10. Gel SDS-PAGE 12% mostrando a indução da expressão em *E. coli* e a insolubilidade da proteína recombinante NBDs de AtRLI2. O gel foi corado com *Comassie blue*. Marcador de peso molecular LMW *Protein Molecular Weight Markers* (GE Healthcare). Na linha 1 está extrato protéico total de células sem adição de IPTG que serviu como controle, na linha 2 extrato protéico total de células cuja expressão foi induzida com adição de 1 mM de IPTG a uma temperatura 28°C por 4 horas, nas linhas 3 e 4 estão o sobrenadante do extrato protéico total de células e o *pellet* do extrato (fração insolúvel), respectivamente, obtidos a partir de sonicação a uma potência de 50 W em pulsos de 30 s. A caixa em verde seguida de uma seta indica a banda referente a proteína (~64 kDa).

Testou-se também o protocolo de lise celular pela adição de N-Lauril Sarcosil (Sarcosil) em diferentes concentrações: 0,2%, 0,4%, 0,5%, 1% e 1,5%, segundo descrito por Frangioni e Neel (2003). Para este protocolo obte-se a proteína NBDs na fração solúvel em todas as condições testadas (Fig. 11 A e B).

A proteína NBDs é topologicamente semelhante à domínios NBDs da proteína de membrana ABC *transporter* (Karcher et al., 2008). Proteínas de membrana sofrem extensivas interações hidrofóbicas e possuem uma forte tendência a formar agregados. Prévios estudos afirmam que o detergente iônico forte sarcosil pode ser capaz de solubilizar componentes membranares e evitar a agregação dessas proteínas interrompendo ou prevenindo essas interações hidrofóbicas (McNally *et al.*, 1991; Frangioni e Neel, 2003). Todavia, a utilização de detergente iônico forte, faz com que a proteína assuma uma estrutura inativa devido à formação de complexos detergente/proteína.

Além disso detergentes iônicos são incompatíveis com o níquel presente na coluna cromatográfica diminuindo assim, a eficiência da purificação (Invitrogen, 2006). Neste caso, utilizou-se o detergente não-iônico triton X-100, nas alíquotas contendo as concentrações 0,4%, 0,5%, 1% e 1,5% de sarcosil (Fig. 11 A e B) e adicionou-se EDTA para sequestrar o sarcosil e aumentar a eficiência da purificação da proteína NBDs. Na presença de cátion divalente a extração pelo sarcosil decresce sendo necessário a adição de um agente quelante como o EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid), uma vez que este pode inibir cátions divalentes (Frangioni e Neel, 2003).

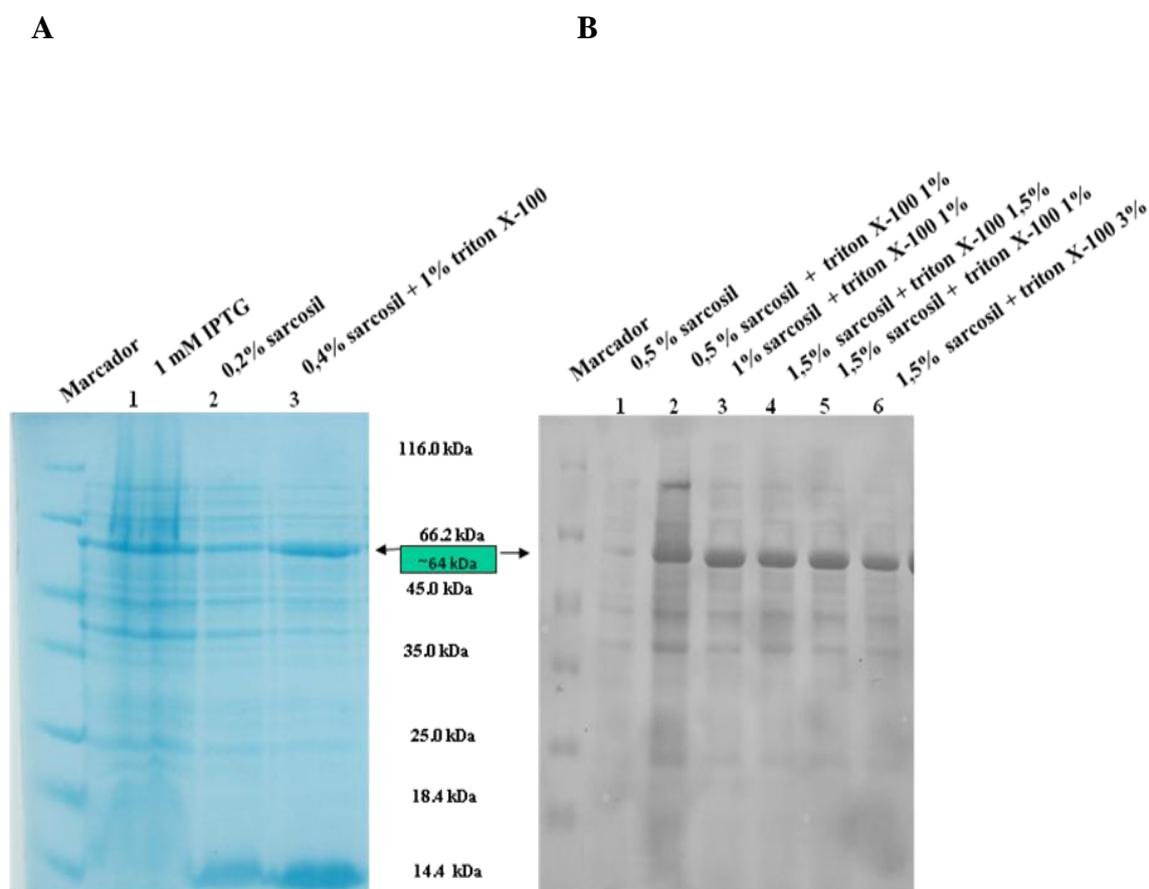


Fig. 11. Gel SDS-PAGE 12% mostrando a solubilidade da proteína recombinante NBDs de AtRLI2, utilizando o detergente sarcosil. O gel foi corado com *Comassie blue*. Marcador de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas, EUA). Em A, na linha 1 está o extrato protéico total de células induzida à expressão com 1 mM de IPTG a 28°C por 4 horas, na linha 2 está o sobrenadante do extrato protéico total de células (fração solúvel), obtido a partir da adição de sarcosil na concentração de 0,2%, na linha 3 está o sobrenadante do extrato protéico total de células (fração solúvel), obtido a partir da adição de sarcosil na concentração de 0,4% e triton X-100 1%. As amostras 2 e 3 foram sonicadas a uma potência de 50 W em pulsos de 10 segundos por 10 vezes. Em B, na linha 1, está o sobrenadante do extrato protéico total de células (fração solúvel), obtido a partir da adição de sarcosil na concentração de 0,5% , nas linhas 2, 3, 4 e 5 está o sobrenadante do extrato protéico total de células com a adição de: sarcosil 0,5% e triton X-100 1%, sarcosil 1% e triton X-100 1%, sarcosil 1,5% e triton X-100 1%, respectivamente, com posterior sonicção a uma potência de 50 W em pulsos de 10 segundos por 10 vezes. Na linha 6, está o sobrenadante do extrato protéico total de células utilizando sarcosil 1,5% e triton X-100 3%. A caixa em verde e as setas indicam a banda referente à proteína (~64 kDa).

4.4. Purificação da Proteína Recombinante NBDs em Condição Desnaturante e Nativa

A proteína NBDs foi purificada em condição desnaturante utilizando uréia para solubilizar a proteína (ver Material e Métodos, item 3.6).

Nesta condição, a proteína que estava totalmente presente na fração insolúvel do lisado celular na forma de corpos de inclusão (dados não mostrados) foi ressuspensa em tampão glicina 50 mM pH 7,5 e desnaturadas na presença de 8 M de uréia. Devido ao tamanho da proteína NBDs (512 aminoácidos), é muito provável o rearranjo para uma conformação inativa com posterior formação de agregados.

Segundo Gottesman e colaboradores (1997), os corpos de inclusão são resultado da acumulação intracelular de proteínas dobradas parcialmente ou dobradas incorretamente formando agregados protéicos insolúveis e sem atividade. A formação dos corpos de inclusão está relacionada a uma falha e/ou sobrecarga do sistema de controle da qualidade de proteínas quando a célula é submetida a algum tipo de estresse, como a exposição a temperaturas elevadas ou superexpressão de proteínas recombinantes. Para Georgiou e Segatori (2005) é difícil expressar proteínas insolúveis para o meio e obtê-las na forma solúvel e ativa, pois frequentemente, a superexpressão conduz à produção destes corpúsculos, que são agregados insolúveis de proteínas, tornando obrigatório, na maioria dos casos, uma etapa posterior de renaturação.

Neste trabalho, a proteína foi purificada em condição desnaturante em cromatografia por afinidade em coluna de níquel (ver Material e Método, item 3.6) com um rendimento da ordem de 10 mg/L (Fig. 12) e foi posteriormente dialisada.

As frações foram eluídas em tampão 20 mM glicina pH 8,0, 500 mM NaCl, 7 M Uréia e 0,5 M imidazol. O imidazol é usado para eluir proteínas com cauda de histidinas ligadas a íons níquel em coluna cromatográfica, visto que em determinada concentração, este composto compete com as histidinas pelos íons níquel através de coordenação química liberando, assim, a proteína de interesse.

A Figura 13 mostra o fracionamento em gel SDS-PAGE 12% de algumas das alíquotas eluídas da purificação cromatográfica comprovando que a proteína recombinante NBDs foi purificada.

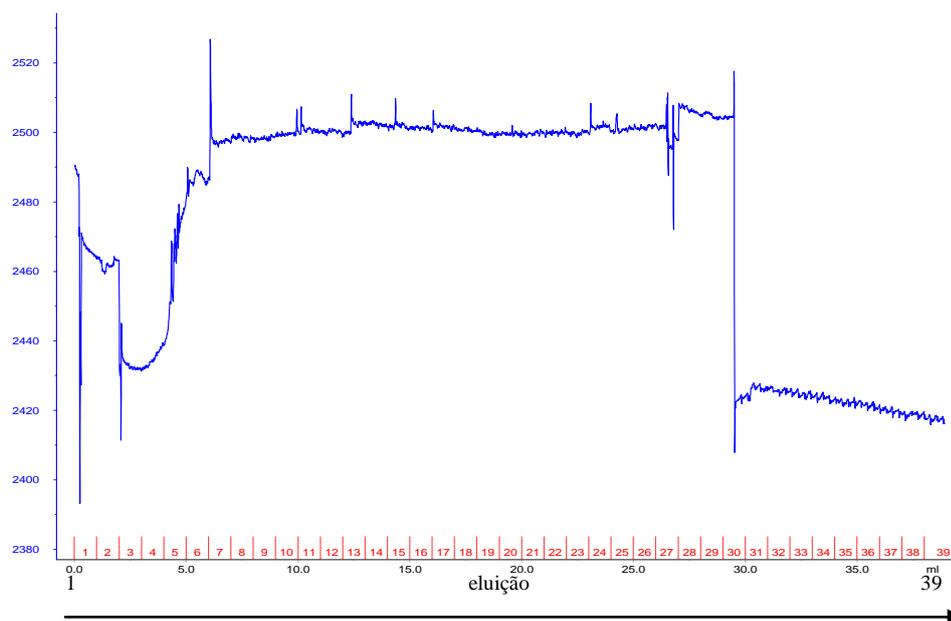


Fig. 12. Cromatograma da purificação da proteína recombinante NBDs em coluna de afinidade por níquel a partir de condição desnaturante utilizando 8 M de uréia. A figura contém o momento da eluição 1-39. As proteínas recombinantes foram eluídas em tampão 20 mM glicina pH 8,0, 500 mM NaCl, 7 M Uréia e 0,5 M imidazol. As alíquotas 1 à 39 apresentaram um rendimento de 10 mg/L.

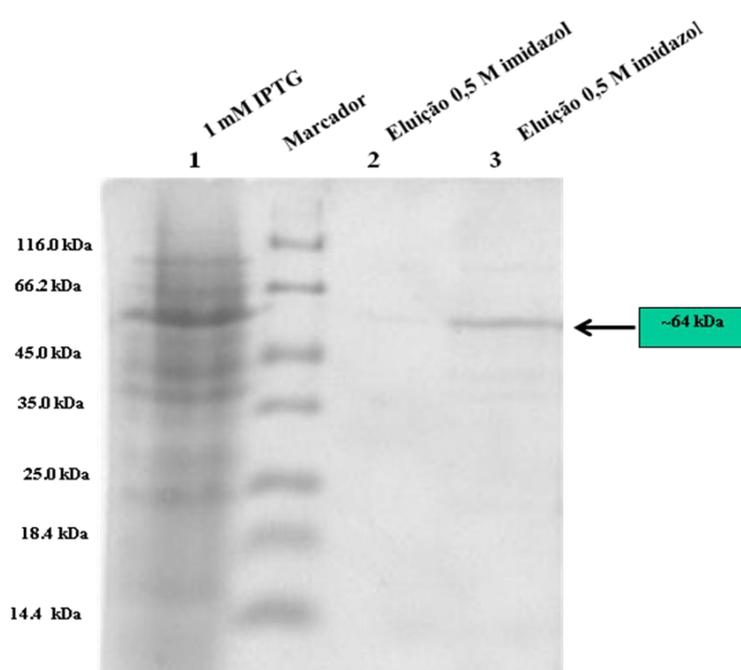


Fig. 13. Gel SDS-PAGE 12% mostrando o padrão de purificação em condição desnaturante em coluna de afinidade por níquel da proteína recombinante NBDs. O gel foi corado com *Comassie blue*. Na linha 1 está o sobrenadante do extrato protéico total de células de *E. coli* BL21 (DE3) pRIL codon plus com expressão induzida com 1mM de IPTG; Marcador de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas, EUA); nas linhas 2 e 3 estão as frações eluídas em tampão 20 mM glicina pH 8,0, 500 mM NaCl, 7 M Uréia e 0,5 M imidazol. A caixa em verde seguida de uma seta indica a banda referente à proteína (~ 64 kDa).

As alíquotas eluídas foram quantificadas em absorbância obtida num comprimento de onda a 280 nm calculando-se o coeficiente de extinção molar ou absorvidade molar (ϵ) teórico da proteína. O coeficiente de extinção molar é a capacidade de um mol de substância absorver luz em um certo comprimento de onda. É largamente utilizado para se ter uma estimativa da absorção da sequência de aminoácidos de uma dada proteína purificada quando submetida a um dado comprimento de onda ou análise espectrofotométrica. O coeficiente de extinção molar é comumente estimado a partir dos resíduos de tirosina, triptofano, cisteína oxidada ou cistina e fenilalanina (compostos de cadeia fechada) em um dado comprimento de onda (Pace *et al.*, 1995; Gasteiger *et al.*, 2005). Se o coeficiente de extinção molar é conhecido, este pode ser usado para determinar a concentração de uma proteína em solução (Gill e Von Hippel, 1989). Mas este método apresenta erros significativos quando as amostras não apresentam o aminoácido triptofano em sua composição (Pace *et al.*, 1995).

As alíquotas que apresentaram um melhor grau de pureza foram reunidas em duas frações (A e B) de forma a se obter a mesma concentração da proteína em cada fração.

Na tentativa de encontrar condições para ressolubilizar a proteína NBDs e evitar a formação dos agregados insolúveis foram adicionados à fração A 200 μ g de DNA esperma de salmão (Eppendorf) e 10 mM de cloreto de magnésio a fim de obter a proteína renaturada. O cloreto de magnésio foi usado na mistura uma vez que o Mg^{2+} é um co-fator essencial para que a hidrólise do ATP seja catalisada pelo NBDs (Hou *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2009). A fração B, serviu como controle. Em seguida, foi realizada a troca do tampão da amostra onde as frações foram dialisadas para a retirada gradual da uréia e do imidazol da mistura conforme descrito em Material e Métodos, item 3.6.

Durante a diálise, as amostras formavam agregados insolúveis indicando problemas na conformação funcional ou enovelamento da proteína. Desta forma, as frações A e B contendo a proteína em corpúsculos de inclusão foram separadas do sobrenadante por centrifugação e foram ressolubilizadas em tampão glicina 50 mM pH 7,5 contendo 7 M de uréia. Adicionou-se 60 μ M de dATP (2'-deoxi ATP) e 10 mM de cloreto de magnésio nas duas frações para a renaturação da proteína.

Ambas as frações foram novamente dialisadas a fim de eliminar toda uréia presente na mistura e até que não restasse precipitados visíveis, o que era um indicativo de que a proteína estava renaturada e assim pronta para ser utilizada.

Os domínios NBDs (Nucleotide Binding Domains) possuem *motifs* conservados de ligação e hidrólise de ATP o qual lhe confere a base estrutural e funcional. Mudanças conformacionais geradas de maneira dependente de ATP são observadas em ABC-ATPases de bactéria, levedura e *Drosophila*. A ligação e hidrólise de ATP no domínio NBDs de RLI desses organismos, também são essenciais para a sua função (Dawson e Locher, 2006; Andersen e Leever, 2007; Karcher *et al.*, 2008). Prévios estudos estruturais realizados por Karcher e colaboradores (2008) em RLI de *Archea*, sugerem que o ATP induz mudanças conformacionais ao domínio NBD1 e NBD2, pela conexão estrutural entre o motivo de ligação à nucleotídeo Y-loop do NBD1 e o domínio FeS o que ocasiona, provavelmente, o reposicionamento do domínio FeS.

Cai e colaboradores (2006) utilizaram o dATP, um análogo hidrolisável do ATP, para dirigir mudanças conformacionais à CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) (cuja perda da função acarreta em fibrose cística) através da interação do dATP com o motivo LSGGQ do NBD1 e NBD2 de CFTR. O dATP conduz a um aumento significativo da abertura do canal de propagação de CFTR em comparação com o ATP (Bompadre *et al.*, 2008).

A disponibilidade de proteínas NBDs puras, ativas e em quantidade suficiente para estudos biofísicos e estruturais é muito útil para a elucidação das bases da atuação da proteína no mecanismo de mudanças conformacionais ao domínio FeS de AtRLI2. No entanto, a expressão de fragmentos NBDs homólogos à proteínas ABC tem sido um problema devido a predisposição significativa desses fragmentos à geração de corpúsculo de inclusão limitando a solubilidade e a purificação (Roosbeek *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2008).

Neste trabalho o dATP foi utilizado na tentativa de renaturar a proteína NBDs. O acesso do sítio de ligação a ATP da proteína NBDs pode ser aumentado na presença de dATP podendo levar a um rearranjo conformacional ativo e a estabilidade da molécula, podendo assim, evitar a formação de agregados.

As frações dialisadas foram quantificadas utilizando-se o método de Bradford sendo possível observar um aumento significativo do rendimento da proteína após a adição de dATP na diálise quando comparado à adição de DNA esperma de salmão (dados não mostrados).

No entanto, apesar do rendimento significativo obtido com o uso do dATP, não obteve-se uma quantidade suficiente da proteína para a realização dos ensaios biofísicos e cristalográficos. Desta forma optou-se pela purificação em condição nativa utilizando os extratos originados da lise com o detergente sarcosil na concentração 0,2%. A utilização de sarcosil na concentração 0,2% tem mostrado ser compatível com a purificação usando-se resina de níquel (Invitrogen, 2006).

A proteína foi purificada em condição nativa em cromatografia por afinidade em coluna contendo níquel, conforme descrito em Material e Método, item 3.6, utilizando os extratos originados da lise com o detergente sarcosil na concentração 0,2%. A Figura 14 mostra o momento da eluição da proteína NBDs em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 com 100 mM NaCl e 100 mM de imidazol. Para este protocolo obteve-se sucesso em purificar a proteína sem problemas de precipitação.

As alíquotas de cada fração da eluição foram analisadas por SDS-PAGE 12% (dados não mostrados) e quantificadas em A_{280} calculando-se o coeficiente de extinção molar ou absorvidade molar (ϵ) teórico da proteína onde obteve-se um rendimento da ordem de 8 mg/L.

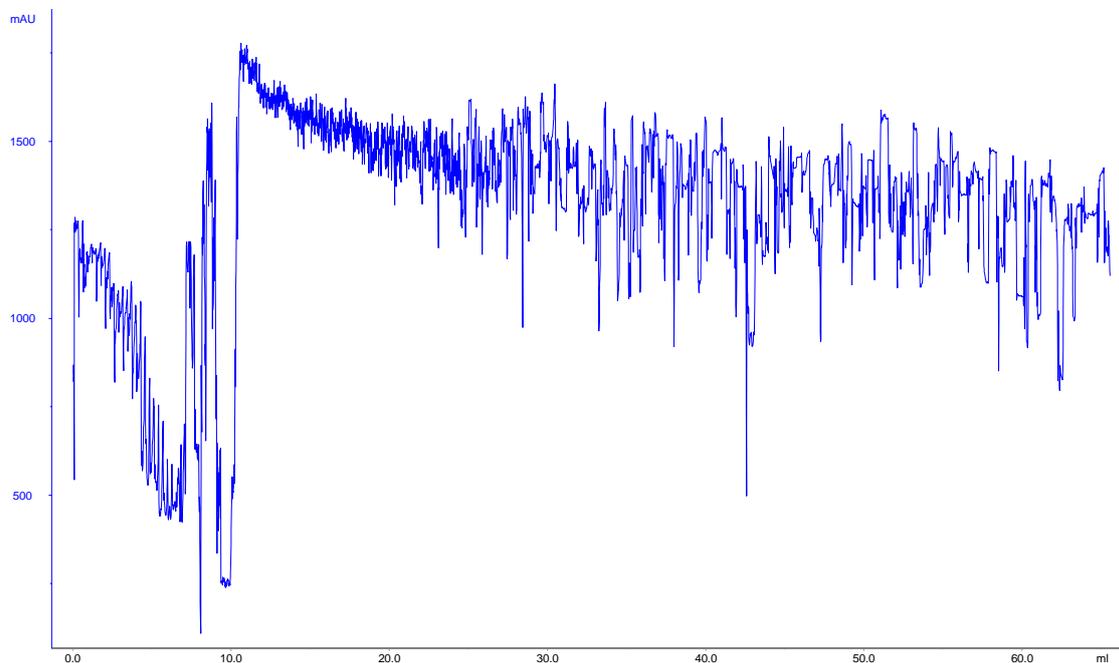


Fig. 14. Cromatograma da purificação da proteína recombinante NBDs em coluna de afinidade por níquel a partir da fração solúvel utilizando 0,2% de sarcosil. A figura contém o momento da eluição de 1 a 60 mL. A proteína recombinante foi eluída Tris-HCl 20 mM pH 7,5 com 100 mM NaCl e 100 mM de imidazol. As alíquotas 1 à 60 apresentaram um rendimento de 8 mg/L.

Entretanto, nesta condição não obteve-se um grau de pureza significativo e a purificação necessita ser melhorada devendo-se ser empregadas, para tanto, novas etapas de purificação como em gel-filtração e/ou troca-iônica, bem como eletroforese bidimensional a fim de se obter preparações da proteína em quantidade e grau de pureza adequado para a realização dos estudos biofísicos e estruturais.

4.5. Análise da expressão e purificação da proteína recombinante NBDs por *Western blot*

Para confirmar a obtenção e purificação da proteína NBDs fusionada aos resíduos His₆ tag foi realizado um *Western blot* revelado com anticorpo monoclonal anti-His₆ tag. O *Western blot* é um método largamente utilizado para identificação e caracterização de proteínas de interesse e leva a um aumento significativo do sinal durante a imunodeteção da proteína que é particularmente mais efetivo com utilização de anticorpos monoclonais, uma vez que reconhecem somente o epítopo simples específico da proteína de interesse (Abeyrathne e Lam, 2007).

Para a realização do *Western blot* neste estudo, os extratos celulares obtidos da indução, bem como as amostras protéicas purificadas e dialisadas foram resolvidas em SDS-PAGE 12% e imobilizadas à membrana de nitrocelulose. Incubando-se a membrana com anticorpos anti-His₆ tag e revelação com substrato adequado, foi possível constatar o aparecimento das bandas de aproximadamente 64 kDa correspondentes à proteína NBDs (Fig. 15). Observa-se também na Figura 15, o reconhecimento do anticorpo à proteína purificada e após ser dialisada, confirmando o sucesso da obtenção e purificação da proteína fusionada a uma sequência de 6 histidinas.



Fig. 15. *Western blot* revelado com anticorpo anti-His₆-tag (diluição 1:1000) para a proteína recombinante NBDs de ATRLI2. A proteína obtida foi resolvida por separação em SDS-PAGE 12%. Na figura A: M= marcador de massa molecular *Kaleidoscope Prestained Standards* (Fermentas – EUA). Na linha 1 está o extrato celular originado da indução da expressão com 1 mM de IPTG, a 28°C por 4 horas. Nas linhas 2, 3, 4, 5 e 6 estão as amostras originadas da purificação eluídas com 20 mM glicina pH 8,0, 500 mM NaCl, 7 M Uréia e 0,5 M imidazol. Na figura B, está a amostra da proteína após a diálise em tampão 50 mM de glicina, 60 µM de dATP e 10 mM de cloreto de magnésio. A seta indica o reconhecimento do anticorpo à proteína produzida na banda correspondente à massa molecular da proteína NBDs (~64 kDa).

5. CONCLUSÕES

- O domínio NBDs de ATRLI2 foi clonado em vetor pET-28a(+).
- O domínio FeS de ATRLI2 foi clonado em vetor pET2-8a(+), no entanto, não foi possível confirmar por sequenciamento do DNA a integridade da construção e os resultados obtidos não puderam ser utilizados.
- A proteína NBDs de ATRLI2 foi expressa na forma recombinante fusionada a um His₆ tag em *E. coli* BL21 (DE3) pRIL *codon plus*.
- A proteína NBDs foi obtida na fração solúvel utilizando o detergente *N*-lauril-sarcosil.
- A proteína NBDs foi purificada em cromatografia líquida por afinidade a níquel, em condição desnaturante, com um rendimento de 10 mg/L, a partir da expressão em *E. coli* BL21 (DE3) pRIL *codon plus*.
- A proteína NBDs foi purificada em cromatografia líquida por afinidade a níquel, em condição nativa, com um rendimento de 8 mg/L, a partir da expressão em *E. coli* BL21 (DE3) pRIL *codon plus*.
- A proteína NBDs recombinante expressa e purificada foi analisada por *Western blot* utilizando o anticorpo comercial anti-His₆ tag que reconheceu a proteína produzida na banda correspondente à massa molecular da proteína NBDs (~64 kDa).

6. PERSPECTIVAS

- Realização de novos passos cromatográficos utilizando cromatografia de troca iônica e gel filtração visando a obtenção da proteína pura e em maiores quantidades para realização dos ensaios biofísicos e cristalográficos.
- Realização dos estudos espectroscópicos de DLS, CD e dos ensaios iniciais de cristalização com a proteína NBDs visando futuramente resolver a sua estrutura tridimensional por cristalografia.
- Realização da reclonagem do domínio FeS e clonagem do gene de ATRLI2 completo para posterior expressão, purificação e cristalização.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ABEYRATHNE, P.D.; LAM, J.S. Conditions that allow for effective transfer of membrane proteins onto nitrocellulose membrane in Western blots. **Can. J. Microbiol.**, v.53, p.526-532, 2007.

AIGNER, A. Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo. **RNA Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.76, p.9–21, 2007.

AL-KHATIB, K.; WILLIAMS, B.R.; SILVERMAN, R.H.; HALFORD, W.; CARR, D.J. The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR and the murine 2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent RNase L are required for IFN-beta-mediated resistance against herpes simplex virus type 1 in primary trigeminal ganglion culture. **Virology**, v.313, p.126-135, 2003.

ALMEIDA, R.; ALLSHIRE, R.C. RNA silencing and genome regulation. **Trends Cell. Biol.**, v.15, p.251–258, 2005.

ANANDALAKSHMI, R.; MARATHE, R.; G.E, X.; HERR J.R, J.M.; 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.

ANDERSEN, D.S.; LEEVERS, S.J. The essential *Drosophila* ATP-binding cassette domain protein, pixie, binds the 40 S ribosome in an ATP-dependent manner and is required for translation initiation. **J. Biol. Chem.**, v.282, p.14752-14760, 2007.

ARAVIN, A.; TUSCHL, T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. **FEBS Lett.**, v.579, p.5830-5840, 2005.

BARTHELME, D.; SCHEELE, U.; DINKELAKER, S.; JANOSCHKA, A.; MACMILLAN, F.; ALBERS, S.V.; DRIESSEN, A.J.; STAGNI, M.S.; BILL, E.; MEYER-KLAUCKE, W.; SCHÜNEMANN, V.; TAMPÉ, R. Structural organization of essential iron-sulfur *clusters* in the evolutionarily highly conserved ATP-binding cassette protein ABCE1. **J. Biol. Chem.**, v.282: p.14598-14607, 2007.

BAUER, B.E.; WOLFGER, H.; KUCHLER, K. Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. **Biochim. Biophys Acta**, v.1461, p. 217-236, 1999.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BAULCOMBE, D. Viral suppression of systemic silencing. **Trends Microbiol.**, v.10, p.306-308, 2002.

BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature**, v.431, p.356–363, 2004.

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.

BISBAL, C.; MARTINAND, C.; SILHOL, M.; LEBLEU, B.; SALEHZADA, T. Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2–5A pathway. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.13308–13317, 1995.

BISBAL, C.; SILHOL, M.; LAUBENTHAL, H.; KALUZA, T.; CARNAC, G.; MILLIGAN, L.; LE ROY, F.; SALEHZADA, T. The 2`-5` Oligoadenylate/RNase L/RNase L inhibitor pathway regulates both MyoD mRNA stability and muscle cell differentiation. **Mol. Cell Biol.**, v. 20, p. 4959-4969, 2000.

BOMPADRE, S. G.; MIN LI, M.; CHANG HWANG, TZYH-CHANG. Mechanism of G551D-CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) Potentiation by a High Affinity ATP Analog. **The Journal of Biological Chemistry**. vol. 283, p. 5364–5369, 2008.

BRAZ, A.S.K.; FINNEGAN, J.; WATERHOUSE, P.; MARGIS, R. A plant orthologue of RNase L Inhibitor (RLI) is induced in plants showing RNA interference. *Journal of Molecular Evolution*. **J. Mol. Evol.**, v.59, p.20–30, 2004.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248–254, 1976.

BUDT, M.; NIEDERSTADT, L.; VALCHANOVA, R.S.; JONJIĆ, S.; BRUNE, W. Specific inhibition of the PKR-Mediated antiviral response by the murine cytomegalovirus proteins m142 and m143. **J. Virol.**, v.83, p.1260-1270, 2009.

CAI, Z.; TADDEI, A.; SHEPPARD, D. N. Differential Sensitivity of the Cystic Fibrosis (CF)-associated Mutants G551D and G1349D to Potentiators of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Cl⁻ Channel . **J. Biol. Chem** v. 281, p.1970-1977, 2006.

CARTHEW, R.W.; SONTHEIMER, J.E. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v.136, p. 642–655, 2009.

CASTANOTTO, D.; ROSSI, J.J. The promises and pitfalls of RNA interference-based therapeutics. **Nature**, v.457, p.426-433, 2009.

CHEN, H.; GRIFFIN, A.R.; WU, Y.Q.; TOMSHO, L.P.; ZUHLKE, K.A.; LANGE, E.M.; GRUBER, S.B.; COONEY, K.A. RNASEL mutations in hereditary prostate cancer. **J. Med. Genet.**, v.40, p.21, 2003.

CHEN, Z.Q.; DONG, J.; ISHIMURA, A.; DAAR, I.; HINNEBUSCH, A.G.; DEAN, M. The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors. **J. Biol. Chem.**, v.281, p. 7452-7457, 2006.

COELHO, C.M.; KOLEVSKI, B.; BUNN, C.; WALKER, C.; DAHANUKAR, A.; LEEVERS, S.J. Growth and cell survival are unevenly impaired in pixie mutant wing discs. **Development**, v. 132, p.5411–5424, 2005.

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

DAWSON, R.J.; LOCHER, K.P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. **Nature**, v. 443, p.180–185, 2006.

DE FOUGEROLLES, A.; VORNLOCHER, H.P.; MARAGANORE, J.; LIEBERMAN, J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.6, p.443-453, 2007.

DECOTTIGNIES, A.; GOFFEAU, A. Complete inventory of the yeast ABC protein. **Nat. Genet.**, v.15, p.137–145, 1997.

DIEDERICHS, K.; DIEZ, J.; GRELLER, G.; MULLER, C.; BREED, J.; SCHNELL, C.; VONRHEIN, C.; BOOS, W.; WELTE, W. Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. **EMBO J.**, v.19, p.5951-5961, 2000.

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

DONG, J.; LAI, R.; NIELSEN, K.; FEKETE, C.A.; QIU, H.; HINNEBUSCH, A.G. The essential ATP-binding cassette protein RLI1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.42157-42168, 2004.

DOOHER, J.E.; LINGAPPA, J.R. Conservation of a Stepwise, Energy-Sensitive Pathway Involving HP68 for Assembly of Primate Lentivirus Capsids in Cells. **J. Virol.**, v.78, p.1645-1656, 2004.

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

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.

ESTÉVEZ, A.M.; HAILE, S.; STEINBUHEL, M.; QUIJADA, L.; CLAYTON, C. Effects of depletion and overexpression of the *Trypanosoma brucei* ribonuclease L inhibitor homologue. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.133, p.137-141, 2004.

FERRER, M., CHERNIKOVA, T. N., YAKIMOV, M. M., GOLYSHIN, P. N.; TIMMIS, K. N. Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. **Nat Biotechnol.** vol. 2, p.1266-1267, 2003.

FRANGIONI, J.V.; NEEL, B.G. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-Transferase (pGEX) fusion proteins. **Analytical Biochemistry.**, v. 210, p.179-187, 2003.

GANGWAR, D.; KALITA, M.K.; GUPTA, D.; CHAUHAN, V.S.; MOHMMED, A.A. systematic classification of *Plasmodium falciparum* P-loop NTPases: structural and functional correlation. **Malar. J.**, v.18, p.8:69, 2009.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKERA.; DUVAUD S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J.M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. New Jersey: Human Press, 2005. p . 571-607.

GAUDET, R.; WILEY, D.C. Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. **EMBO J.**, v.20, p.4964-4972, 2001.

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.

GEORGIU, G.; SEGATORI, L. Preparative Expression of Secreted Proteins in Bacteria: Status Report and Future Prospects. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 16, p. 538-545, 2005.

GILL, S.C.; VON HIPPEL, P.H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. **Anal. Biochem.**, v. 182, p.319–326, 1989.

GOMASE, V.S.; TAGORE, S. RNAi a tool for target finding in new drug development. **Curr. Drug Metab.**, v.9, p.241-244, 2008.

GOTTESMAN, S; WICKNER S; MAURIZI, M.R. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. **Genes Dev**, v.11, p. 815–823, 1997.

GREGORY, B.D.; O'MALLEY, R.C.; LISTER, R.; URICH, M.A.; TONTI-FILIPPINI, J.; CHEN, H.; MILLAR, A.H.; ECKER, JR. A link between RNA metabolism and silencing affecting *Arabidopsis* Development. **Dev. Cell**, v.6, p.854-866, 2008.

GREWAL, S.I.; ELGIN, S.C. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. **Nature**, v.447, p.399-406, 2007.

GRISHOK, A. RNAi mechanisms in *C. elegans*. **FEBS Lett.**, v.579, p.5932-5939, 2005.

GROSSMAN, T.H.; KAWASAKI, E.S.; PUNREDDY, S.R.; OSBURNE M.S. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. **Gene**, v.209, p.95-103, 1998.

GUANG, S.; BOCHNER A.F.; PAVELEC, D.M.; BURKHART, K.B.; HARDING, S.; LACHOWIEC, J.; KENNEDY S. An argonaute transports siRNAs from the cytoplasm to the nucleus. **Science**, v. 321, p.537-541, 2008.

GY, I.; GASCIOLLI, V I.; LAURESSERGUES, D.; MOREL, J. B.; GOMBERT, J.; PROUX, F.; PROUX, E.; 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.; 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.

HERR, A.J.; MOLNAR, A.; JONES, A.; BAULCOMBE, D.C. Defective RNA processing enhances RNA silencing and influences flowering of *Arabidopsis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.103, p.14994–15001, 2006.

HOPFNER, K.P.; TAINER, J.A. Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures. **Curr. Opin. Struct. Biol**, v.13, p.249–255, 2003.

HOU, YUE-XIAN, CUI, L.; RIORDAN, J. R.; CHANG, XIU-BAO. ATP binding to the first nucleotide-binding domain of multidrug resistance protein MRP1 increases binding and hydrolysis of ATP and trapping of ADP at the second domain. **The Journal of Biological Chemistry**. vol. 277, p.5110–5119, 2002.

HOVANESSIAN, A.G. On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: the 2'-5'oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.18, p.351-61, 2007.

HUTVAGNER, G.; SIMARD, M.J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.9, p.22–32, 2008.

HWANG, TZYH-CHANG; SHEPPARD, D. N. Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation. **J Physiol**. v.5 87, p.2151–2161, 2009.

IIDA, A.; SAITO, S.; SEKINE, A.; MISHIMA, C.; KITAMURA, Y.; KONDO, K.; HARIGAE, S.; OSAWA, S.; NAKAMURA, Y. Catalog of 605 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among 13 genes encoding human ATP-binding cassette transporters: ABCA4, ABCA7, ABCA8, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, and ABCG8. **J. Hum. Genet.**, v.47, p.285-310, 2002.

INVITROGEN. **Ni-NTA Purification System**. Versão C. USA:Invitrogen, 2006. p. 2.

JINEK, M.; DOUDNA, J.A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. **Nature**, v.457, p.405-412, 2009.

JONES P.M.; GEORGE, A.M. Mechanism of ABC transporters: A molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit. **PNAS**, v.99, p.12639–12644, 2002.

JONES-RHOADES, M.W.; BARTEL, D.P.; BARTEL, B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.57, p.19–53, 2006.

KAJASTE-RUDNITSKI, A.; MASHIMO, T.; FRENKIEL, M.P.; GUÉNET, J.L.; LUCAS, M.; DESPRÈS, P. The 2',5' Oligoadenylate synthetase 1b Is a potent inhibitor of west nile virus replication inside infected cells. **J. Biol. Chem.**, v.281, p.4624-4637, 2006.

KARCHER, A.; SCHELE, A.; HOPFNER, K.P. X-ray structure of the complete ABC enzyme ABCE1 from *Pyrococcus abyssi*. **J. Biol. Chem.**, v.283, p.7962-7971, 2008.

KAVI, H.H.; FERNANDEZ, H.; XIE, W.; BIRCHLER, J.A. RNA silencing in *Drosophila*. **FEBS Lett.**, v.579, p.5940-5949, 2005.

KAWAKAMI, S.; HASHIDA, M. Targeted delivery systems of small interfering RNA by systemic administration. **Drug Metab. Pharmacokinet**, v.22, p.142–151, 2007.

KERR, I.D. Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.315, p.166–173, 2004.

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.

LI, H.W.; DING, S.W. Antiviral silencing in animals. **FEBS Lett.**, v.579, p.5965-5973, 2005.

LIANG, S.L.; QUIRK, D.; ZHOU, A. RNase L: Its biological roles and regulation. **IUBMB Life**, v.58, p.508-514, 2006.

LILL, R. Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. **Nature**, v.60, p.831-838, 2009.

LINGAPPA, J.R.; THIELEN, B.K. Assembly of immature HIV-1 capsids using a cell-free system. **Methods Mol. Biol.**, v.485, p.185-195, 2009.

LINGAPPA, J.R.; DOOHER, J.E.; NEWMAN, M.A.; KISER, P.K.; KLEIN, K.C. Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are required for interaction of HIV-1 Gag with ABCE1 (HP68), a cellular protein important for HIV-1 capsid assembly. **J. Biol. Chem.**, v.281, p.3773-3784, 2006.

LIU, J.; VALENCIA-SANCHEZ, M.A.; HANNON, G.J.; PARKER, R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. **Nat. Cell Biol.**, v.7, p.719-723, 2005.

MCNALLY, E., SOHN, R., FRANKEL, S., AND LEINWAND, L. **Methods Enzymol.**, v. 196, p.368-389, 1991.

MAO, C.P.; LIN, Y.Y.; HUNG, C.F.; WU, T.C. Immunological research using RNA interference technology. **Immunology**, v.121, 295-307, 2007.

MARTINAND, C.; SALEHZADA, T.; SILHOL, M.; LEBLEU, B.; BISBAL, C. The RNase L inhibitor (RLI) is induced by double-stranded RNA. **J. Interferon Cytokine**, v.18, p.1031-1038, 1998.

MATZKE, M.A.; BIRCHLER, J. ARNAi-mediated pathways in the nucleus. **Nat. Rev. Genet.**, v.6, p.24-35, 2005.

MEYER, J. Iron–sulfur protein folds, iron–sulfur chemistry, and evolution. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v.13, p.157–170, 2008.

MORRIS, P.F.; PHUNTUMART, V. Inventory and comparative evolution of the ABC superfamily in the genomes of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora sojae*. **J. Mol. Evol.**, v.68, p.563-575, 2009.

NAKAYASHIKI, H. RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. **FEBS Lett.**, v.579, p.950-957, 2005.

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.

NIJS, J.; DE MEIRLEIR, K. Impairments of the 2-5A synthetase/RNase L pathway in chronic fatigue syndrome. **In Vivo**, v19, p.1013-1021, 2005.

NOVAGEN. **pET System Manual**. 11 ed. USA:NOVAGEM,2005. p.80.

NOVY, R.; MORRIS, B. Use of glucose to control basal expression in the pET system innovations. **BioTechniques**, v.12, p.1-3, 2001.

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

OANCEA, G.; O'MARA, M.L.; BENNETT, W.F.; TIELEMAN, D.P.; ABELE, R.; TAMPÉ, R. Structural arrangement of the transmission interface in the antigen ABC transport complex TAP. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.106,p.5551-5556, 2009.

PACE, N.; VAJDOS, F.; FEE, L.; GRIMSLEY G. GRAY, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein **Protein Sci.**, v.4, p.2411-2423, 1995.

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.

PARK, S.; LIM, B.B.C.; PEREZ-TERZI, C.; MER, G.; TERZIC.; A. Interaction of Asymmetric *ABCC9*-Encoded Nucleotide Binding Domains Determines KATP Channel SUR2A Catalytic Activity. **J Proteome Res.** v. 7, p. 1721–1728, 2008.

PETERS, L.; MEISTER, G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. **Mol. Cell**, v.26, p.611-623, 2007.

ROOSBEEK, S.; CASTER, H.; LIU, Q.Z., BERNE, P.F.; DUVERGER, N.; CHRISTIAENS, B.; VANDEKERCKHOVE, J.; PEELMAN, F.; LABEUR, C.; ROSSENEU, M. Expression and activity of the nucleotide-binding domains of the human ABCA1 transporter. **Protein Expression Purif** v. 35, p.102–110, 2006

ROY, F.L.; BISBAL, C.; SILHOL M.; MARTINAND, C.; LEBLEU, B.; SALEHZADA, T. The 2–5A/RNase L/RNase L inhibitor (RNI) pathway regulates mitochondrial mRNAs stability in interferon α -treated H9 cells. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.48473–48482, 2001.

SADLER, A. J.; WILLIAMS, B.R.G. The IFN family of cytokines are now recognized as key components of the innate immune response and the first line of defence against

virus infection. Interferon-inducible antiviral effectors. **Nat. Rev. Immunol.**, v.8, p.559–568, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMUEL, C.E. Antiviral actions of interferons. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, p.778–809, 2001.

SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R.; DAVIES, T.G.; COLEMAN, J.O.; REA, P.A. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. **J. Biol. Chem.**, v.276, p.30231-30244, 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.

SHEA, P.R.; ISHWAD, C.S.; BUNKER, C.H.; PATRICK, A.L.; KULLER, L.H.; FERRELL, R.E. RNASEL and RNASEL-inhibitor variation and prostate cancer risk in afro-caribbeans. **Prostate**, v.68, p.354-359, 2008.

SCHEIN, C. H. Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria. **Biotechnology** vol.7, p.1141-1148, 1989.

SHREY, K.; SUCHIT, A.; NISHANT, M.; VIBHA, R. RNA interference: emerging diagnostics and therapeutics tool. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, v. 386, p.273-277, 2009.

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.

SILVERMAN, R.H. Viral encounters with 2',5'-Oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. **J. Virol.**, v.81, p.12720-12729, 2007.

SIOMI, H.; SIOMI, M.C. On the road to reading the RNA-interference code. **Nature**, v.457, p.396-404, 2009.

SMALL, I. RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Current Opinion in Biotechnology*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.18, p.148-153, 2007.

SMIRNOVA, E.V.; COLLINGWOOD, T.S.; BISBAL, C.; TSYGANKOVA, O.M.; BOGUSH, M.; MEINKOTH, J.L.; HENDERSON, E.E.; ANNAN, R.S.; TSYGANKOV, A.Y. TULA proteins bind to ABCE-1, a host factor of HIV-1 assembly, and inhibit HIV-1 biogenesis in a UBA-dependent fashion. **Virology**, v.372, p.10-23, 2008.

SORENSEN, H.P.; MORTENSEN, K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, v.115, p.113-28, 2005.

STURM, A.; CUNNINGHAM, P.; DEAN, M. The ABC transporter gene family of *Daphnia pulex*. **BMC Genomics**, v.10, p.170, 2009.

TAN, H.; WANG, J.; ZHAO, Z.K. Purification and refolding optimization of recombinant bovine enterokinase light chain overexpressed in *Escherichia coli*. **Protein Exp. Purif.**, v.56, p.40-47, 2007.

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.

TOWNSEND, H.L.; JHA, B.K.; HAN, J.Q.; MALUF, N.K.; SILVERMAN, R.H.; BARTON, D.J. A viral RNA competitively inhibits the antiviral endoribonuclease domain of RNase L. **RNA**, v.14, p.1026-1036, 2008.

UMBACH, J.L.; CULLEN, B.R. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. **Genes Dev.**, v.23, p.1151-1164, 2009.

VAUCHERET, H.; FAGARD, M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. **Trends Genet.**, v.17, p.29-35, 2001.

VOJDANI, A.; CHOPPA, P.C.; LAPP, C.W. Downregulation of RNase L inhibitor correlates with upregulation of interferon-induced proteins (2-5A synthetase and RNase L) in patients with chronic fatigue immune dysfunction syndrome. **J. Clin. Lab. Immunol.**, v.50, p.1-16, 1998.

WANG, C.; CASTRO, A.F.; WILKES, D.M.; ALTENBERG, G.A. Expression and purification of the first nucleotide-binding domain and linker region of human multidrug resistance gene product : comparison of fusions to glutathione S-transferase, thioredoxin and maltose-binding protein. **Biochem. J.** v. 338, p. 77-81, 1999.

WASSENEGGER, M. The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. **Cell**, v.122, p.13-6, 2005.

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

WOESTENENK, E.A.; HAMMARSTRÖM, M.; VAN DEN BERG, S.; HÄRD, T.; BERGLUND, H. His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors. **J. Struct. Func. Genom.**, v.5, p.217-29, 2004.

XIANG, Y.; WANG, Z.; MURAKAMI, J.; PLUMMER, S.; KLEIN, E. A.; CARPTEN, J.D.; TRENT, J.M.; ISAACS, W.B.; CASEY, G.; SILVERMAN R.H. Effects of RNase L mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2',5'-oligoadenylates. **Cancer Res.**, v. 63, p.6795-6801, 2003.

ZAMORE, P.D. Ancient pathways programmed by small RNAs. **Science**, v.17, p.1265-1269, 2002.

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.

ZHAO, Z.; FANG, L.L.; JOHNSON, R.; BAILLIE, D.L. ATP-binding cassette protein E is involved in gene transcription and translation in *Caenorhabditis elegans*. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, v.323, p.104-111, 2004.

ZIMMERMAN, C.; KLEIN, K.C.; KISER, P.K.; SINGH, A.R.; FIRESTEIN, B.L.; RIBA, S.C.; LINGAPPA, J.R. Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. **Nature**, v.415, p.88-92, 2002.

8. ANEXO

ANEXO 1: **Preparo de células competentes**

As cepas de *E. coli* DH5 α e BL21 (DE3) *Codon Plus* mantidas em estoque em cultura permanente a -80°C, foram inoculadas em 3 mL de meio líquido SOB (Tryptona 2%, Extrato de levedura 1%, NaCl 17 mM, MgCl₂ 10 mM e KCl 5 mM) e incubadas a 37°C sob agitação de 190 rpm por 14 horas. Em seguida, 500 μ l destas culturas foram usados para inocular 50 mL de meio SOB os quais foram incubados a 37°C sob agitação de 190 rpm até uma DO de 0,6 num comprimento de onda a 600 nm. As culturas foram então mantidas no gelo por 15 minutos e adicionadas de 1 mL de MgCl₂ 1 M estéril. As células foram centrifugadas a 4000 x g por 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram desprezados e o *pellet* ressuscitado em 20 mL de solução 1 contendo KCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, KAC 30 mM pH 6,9, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15%, pH 5,8 e incubadas no gelo por mais 30 minutos. Logo após, foi realizada uma nova centrifugação a 4000 x g por 5 minutos a 4°C e sobrenadantes foram descartados e os precipitados novamente ressuscitados com 20 mL de solução 2 contendo: NaMOPS 10 mM pH7,0, KCl 10 mM, CaCl₂ 74 mM, glicerol 15%, pH 6,2. As células foram cuidadosamente transferidas para microtubo em alíquotas de 100 μ l, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido (N₂) e armazenados em freezer -80°C em alíquotas de 100 μ l.

ANEXO 2. **Controle do plasmídeo pET pelo promotor T7lac.** 1. Genoma de *E. coli*: Destacando o local do promotor *lac* no cromossomo da célula com o operador *lacUV5* reprimido pela proteína repressora, codificada pelo gene *lacI*, impedindo a ligação da RNA polimerase de *E. coli*. Posteriormente ao promotor *lac*, está o gene T7 gene 1, que codifica para a T7 RNA polimerase do fago T7. Com a adição de IPTG a proteína repressora é liberada do operador *lac* permitindo a ligação da T7 RNA polimerase da bactéria e subsequentemente a transcrição do gene da T7 RNA polimerase do fago T7 posteriormente a região promotora. 2. Plasmídeo pLysS ou pLysE: contém o gene que codifica para T7 lisozima, um inibidor natural da T7 RNA polimerase. 3. Vetor pET: promotor híbrido T7/*lac* e operador *lac* o qual está reprimido pela proteína repressora *lac* que em resposta ao IPTG libera o operador *lac* e possibilita a ligação da T7 RNA polimerase do fago T7 ao promotor T7 e subsequentemente a transcrição do gene alvo clonado posteriormente ao sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo (NOVAGEN, 2005).

