

RODRIGO KAZUO MAKIYAMA

**ESTUDOS FUNCIONAIS DA rgs-CaM, UMA
CALMODULINA ENVOLVIDA NA SUPRESSÃO DE
SILENCIAMENTO POR RNA**

Botucatu-SP

2014

RODRIGO KAZUO MAKIYAMA

**ESTUDOS FUNCIONAIS DA rgs-CaM, UMA
CALMODULINA ENVOLVIDA NA SUPRESSÃO DE
SILENCIAMENTO POR RNA**

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

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Botucatu-SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Makiyama, Rodrigo Kazuo.

Estudos funcionais da rgs-CaM, uma calmodulina envolvida na supressão de silenciamento por RNA / Rodrigo Kazuo Makiyama. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ivan de Godoy Maia

Capes: 20203004

1. Imunidade vegetal. 2. Acido ribonucleico. 3. Expressão gênica. 4. Proteínas de ligação do calcio. 5. Calmodulina.

Palavras-chave: Expressão proteica; Imunidade inata em plantas; Supressão de silenciamento por RNA; rgs-CaM.

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Ivan de Godoy Maia pela orientação, conselho, paciência e, especialmente, pela confiança em mim depositada ao assumir a orientação;

Aos meus Pais que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado nas minhas conquistas, principalmente nos momentos difíceis. Muito obrigado;

Aos meus irmãos, Fernando e Marcelo, pelo apoio e conversas;

Aos colegas de trabalho, Alessandra Tenório, Alessandra Vasconcellos, Bruno, Fábio, Fabiola, Flávio, Juliana, Laura, Marcela, Marcio e aos demais colegas que passaram pelo laboratório, pela amizade, ajuda e conversas;

Aos grupos de pesquisa do prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes e da prof. Maria Isabel Nogueira Cano, pela ajuda nos experimentos e pela amizade;

Aos amigos de república, Gamba, Sabor, Limão, Dori, Bruno, Pança, Kuíka, Zé, Vinícius, pela amizade, companherismo e bons momentos vividos em Botucatu;

Aos funcionários do departamento de genética, pela assistência fornecida;

À Universidade Estadual Paulista e ao Instituto de Biociências de Botucatu, pela estrutura fornecida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro;

Enfim, muito obrigado a todos que contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

O silenciamento por RNA é um mecanismo conservado de resposta a moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) presente em todos eucariontes, que desempenha papéis fundamentais na regulação da expressão gênica, na resistência a vírus e no controle da transposição de elementos móveis. Sabe-se que proteínas de diferentes origens, viral ou endógena, são capazes de suprimir o silenciamento por RNA, mas o mecanismo de ação da maioria delas não é totalmente compreendido. Um desses supostos supressores endógenos é uma proteína do tipo calmodulina denominada rgs-CaM (regulator of gene silencing CaM) que foi identificada em plantas de tabaco. Calmodulinas são proteínas que desempenham papéis importantes na sinalização mediada por cálcio em células eucarióticas e regulam a atividade de inúmeras proteínas com diversas funções celulares. Recentemente, porém, foi demonstrado que a rgs-CaM está envolvida na resposta de contra-defesa da planta aos supressores virais. Deste modo, os dados disponíveis na literatura sobre a função da rgs-CaM permanecem contraditórios. Pensando nisso, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar funcionalmente a proteína rgs-CaM de tabaco. Para tal, diferentes abordagens foram utilizadas: estudo de interação com a proteína viral HC-Pro, localização subcelular desta interação, identificação de proteínas endógenas que interagem com a rgs-CaM, e análise funcional de plantas de tabaco transgênicas com superexpressão ou silenciadas para o gene que codifica a rgs-CaM. Análises estruturais da rgs-CaM expressa em *Escherichia coli* e análises *in silico* revelam uma proteína rica em hélices alfa, dotada de dois domínios globulares ligados por uma longa hélice α , e apresentando apenas 3 sítios de ligação para o íon cálcio. A presença desse íon ocasiona mudança na estrutura secundária da proteína. Deste modo, o fluxo e a ligação de Ca^{2+} pela rgs-CaM parece ser um ponto chave no mecanismo de ação desta proteína durante a interação com os vírus. Os resultados de interação *in vivo* empregando BiFC não evidenciaram uma interação entre a rgs-CaM e a proteína viral HC-Pro nas condições testadas, sugerindo uma provável degradação das proteínas interagentes como já descrito na literatura. Adicionalmente foi empreendida a busca por proteínas de tabaco, com e sem infecção viral, capazes de interagir com a rgs-CaM. Para tal, ensaios de interação *in vitro* (pulldown) foram realizados empregando a proteína rgs-CaM recombinante e, neste caso, duas proteínas interagentes puderam ser evidenciadas. Em paralelo, foram obtidas linhagens

transgênicas de tabaco para três construções, sendo duas para silenciamento e uma para superexpressão da rgs-CaM. A efetividade dos transgênicos foi verificada por ensaios de RT-PCR semiquantitativo que confirmaram a ausência ou incremento dos transcritos correspondentes ao transgene inserido. As plantas positivas foram então inoculadas com o vírus PepYMV e a cinética de acumulação viral foi analisada por ELISA indireto. De maneira geral, um incremento no acúmulo viral ao longo do período de avaliação (7, 14 e 21 dias pós-inoculação) foi observado, exceção feita ao tempo de 7 dpi onde um menor acúmulo viral foi observado nas plantas com superexpressão da rgs-CaM.

Palavras-chave: Supressão de silenciamento por RNA, rgs-CaM, imunidade inata em plantas, expressão proteica.

ABSTRACT

RNA silencing is a conserved mechanism activated by double-stranded RNA molecules (dsRNA) that is present in eukaryotes. It plays basic roles in the regulation of gene expression and in host resistance to viruses and transposons. It is known that proteins of different origins, viral or endogenous, are able to suppress RNA silencing, but the mechanism of action of most of them are not fully understood. One of these endogenous suppressor is a protein called rgs-CaM (regulator of gene silencing CaM), which is a calmodulin-like protein (CaM) identified in tobacco plants. Calmodulins are proteins that play important roles in calcium signaling in eukaryotic cells and able to regulate the activity of numerous proteins with diverse cellular functions. Recently, however, rgs-CaM was shown to be a protein involved in the plant response to counterattack viral suppressors. Thus the data available in the literature about rgs-CaM function still contradictory. Taking these into consideration, the objective of this work was to functionally characterize the tobacco rgs-CaM. For such, different approaches were used: study of its interaction with the viral HC-Pro protein, the subcellular localization of this interaction, identification of endogenous proteins that interact with rgs-CaM and functional analysis of transgenic tobacco plants overexpressing or silenced for rgs-CaM. Structural analysis of the rgs-CaM expressed in *Escherichia* and *in silico* analysis revealed a protein rich in alpha helix, possessing two globular domains connected by a long alpha helix, and three binding sites for calcium. The presence of calcium led to a change in rgs-CaM secondary structure, suggesting that the flux and binding of Ca^{2+} by rgs-CaM may be a key point for its function during virus-plant interaction. The results of *in vivo* interaction employing BiFC showed no interaction between rgs-CaM and HC-Pro in the tested conditions, suggesting a possible degradation of the interacting proteins as described in the literature. Additionally the search for tobacco proteins capable of interacting with rgs-CaM was undertaken. For such, *in vitro* interaction assays (pulldown) were performed using the recombinant rgs-CaM, and in this case, two interacting proteins could be detected. In parallel, we obtained tobacco transgenic lines for three constructs, two for silencing and one for overexpression the rgs-CaM. Transgene expression was verified by semiquantitative RT-PCR assays, which confirmed the absence or increase of the transcripts corresponding to the inserted

transgene. Transgenic plants were then inoculated with PepYMV and kinetics of viral accumulation was analyzed by ELISA. Overall, an increase in viral accumulation throughout the evaluation period (7, 14 and 21 days post-inoculation) was observed, with the exception of the plants overexpressing rgs-CaM at 7 dpi, which showed, when compared to the other plants investigated, lower levels of virus accumulation.

Keywords: RNA silencing suppression, rgs-CaM, plant innate immunity, protein expression.

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VII
SUMÁRIO.....	IX
I. INTRODUÇÃO.....	12
I.1 Silenciamento por RNA.....	12
I.2 Resposta evolutiva dos vírus ao Silenciamento por RNA	13
I.2.1 A proteína viral HC-Pro	14
I.3 Supressores endógenos de silenciamento por RNA	15
I.4 As Calmodulinas	17
I.5 A proteína rgs-CaM	19
II. OBJETIVO.....	23
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
III.1 Origem das proteínas rgs-CaM e HC-Pro	24
III.1.1 Indução da expressão da rgs-CaM em <i>Escherichia coli</i>	24
III.1.2 Testes de solubilidade da proteína recombinante.....	25
III.2 Preparo das proteínas de fusão para os ensaios <i>in vitro</i> de interação	26
III.2.1 Indução em larga escala das proteínas de fusão GST:rgs-CaM e MBP:HC-Pro	26
III.2.2 Purificação da proteína de fusão MBP:HC-Pro pelo método de cromatografia de afinidade usando resina de amilose.....	27
III.3 Ensaio <i>in vitro</i> de interação entre as proteínas de fusão GST:rgs-CaM e a MBP:HC-Pro.....	28
III.3.1 Procedimento para o Western blot	29
III.4 Teste de indução da proteína rgs-CaM fusionada a cauda de histidinas (rgs-CaM:His)	29
III.4.1 Mudança da cauda de histidinas da região N-terminal para região C-terminal da proteína rgs-CaM.	29
III.4.2 Teste de solubilidade da proteína de fusão rgs-CaM:His em condição não desnaturante	30
III.4.3 Purificação da proteína de fusão rgs-CaM:His em condições desnaturantes	30
III.4.3.1 Desnaturação da proteína rgs-CaM:His na presença de uréia e renaturação pelo processo de diálise	30
III.4.3.2 Desnaturação da proteína rgs-CaM:His na presença de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) e renaturação utilizando 2-METIL-2,4-PENTANODIOL (MPD)	31

III.4.3.3 Purificação da proteína rgs-CaM:His na presença de uréia ou SDS por cromatografia de afinidade	31
III.4.3.4 Purificação da proteína rgs-CaM:His através de troca iônica em HPLC	32
III.4.3.5 Purificação da proteína rgs-CaM:His através da cromatografia de exclusão por tamanho. 33	
III.5 Análise estrutural da proteína rgs-CaM	33
III. 5.1 Análise da estrutura secundária da proteína recombinante rgs-CaM:His por espectroscopia de Dicroísmo Circular.	33
III.5.2 Alinhamento da sequência de aminoácidos da rgs-CaM com proteínas apresentando homologia estrutural e modelagem teórica.	34
III.5.3 Calorimetria de titulação isotérmica – <i>Isothermal Titration Calorimetry</i> (ITC)	35
III.6 Identificação de proteínas virais e do hospedeiro que se associam à proteína rgs-CaM.....	36
III.6.1 Infecção viral de <i>Nicotiana tabacum</i>	36
III.6.2 Obtenção do extrato protéico de <i>Nicotiana tabacum</i> com e sem infecção viral	36
III.6.3 Ensaios <i>in vitro</i> de interação entre a rgs-CaM:His recombinante e proteínas de <i>Nicotiana tabacum</i> com e sem infecção viral.....	37
III.7 Estudos da interação rgs-CaM e HC-Pro empregando BiFC.....	38
III.7.1 Clonagem e construções utilizadas	38
III.7.2 Bombardeamento em células de cebola.....	39
III.7.3 Microscopia.....	40
III.8 Obtenção de plantas transgênicas de tabaco para estudos funcionais da rgs-CaM	40
III.8.1 Construção do cassete de expressão	40
III.8.1.1 Cassete para superexpressão da rgs-CaM	40
III.8.1.2 Silenciamento da rgs-CaM	41
III.8.1.3 Sequenciamento do plasmídeo recombinante.....	42
III.8.2 Transformação de tabaco via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
III.8.3 Caracterização molecular dos transformantes	44
III.8.3.1 RT-PCR semiquantitativo dos transformantes com silenciamento ou superexpressão da rgs-CaM.....	45
III.8.3.2 Infecção viral das plantas transgênicas de tabaco	45
III.8.3.3 Análise da acumulação viral pelo teste de ELISA indireto	46
IV. RESULTADOS.....	48
IV. 1 Expressão, purificação e caracterização da proteína rgs-CaM	48
IV.1.1 Subclonagem da rgs-CaM nos vetores pET-28a, pET15b e pGEX-5X-1	48
IV.1.2 Indução da expressão das proteínas rgs-CaM e HC:Pro recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	49
IV.1.3 Testes de solubilidade das proteínas de fusão GST:rgs-CaM e a MBP:HC-Pro	51
IV.1.4 Preparo das proteínas de fusão para os ensaios de interação <i>in vitro</i>	52
IV.1.5 Padronização dos ensaios de interação <i>in vitro</i> entre as proteínas de fusão GST:rgs-CaM e a MBP:HC-Pro	53
IV.1.6 Novos testes para expressão da proteína rgs-CaM:His	55
IV.1.7 Solubilização da proteína de fusão rgs-CaM:His em tampão não desnaturante	57
IV.1.8 Purificação da proteína rgs-CaM:His por cromatografia de afinidade em HPLC	58
IV.1.8.1 Purificação da proteína rgs-CaM:His desnaturada com uréia	58
IV.1.8.2 Purificação da proteína rgs-CaM:His tratada com SDS e MPD	59

IV.1.8.3 Obtenção da proteína rgs:CaM:His pura empregando troca iônica ou cromatografia de exclusão por tamanho em HPLC	60
IV.1.9 Análise estrutural da proteína	62
IV. 1.9.1 Análise de estrutura secundária da rgs-CaM por dicroísmo circular	62
IV. 1.9.2 Alinhamento da sequência de aminoácidos da rgs-CaM com sequências de calmodulinas estruturalmente homólogas	64
IV. 1.9.3 Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	66
IV. 1.9.4 Modelo teórico da rgs-CaM	68
IV.2 Identificação de proteínas que se associam à proteína rgs-CaM	69
IV.2.1 Confirmação de infecção viral da planta <i>Nicotiana tabacum</i>	69
IV.2.2 Ensaios <i>in vitro</i> de interação entre a rgs-CaM e proteínas de <i>Nicotiana tabacum</i>	70
IV.3 Análise de interação da rgs-CaM com a proteína viral HC-Pro por BiFC.....	72
IV.4 Análise funcional da rgs-CaM.....	73
IV.4.1 Amplificação da região codificadora e da região 5'-UTR da rgs-CaM por RT-PCR	73
IV.4.2 Obtenção dos cassetes para análise funcional em tabaco	74
IV.4.3 Sequenciamento dos cassetes de expressão	76
IV.4.4 Transformação de agrobactéria com os plasmídeos recombinantes	76
IV.4.5 Caracterização molecular dos transformantes	76
IV.4.5.1 Análise da expressão da rgs-CaM nas plantas transformadas empregando RT-PCR semiquantitativo.....	78
IV.4.5.2 Confirmação dos transgênicos na geração T1	80
IV.4.6 Análise de tabacos transgênicos inoculados com o <i>PepYMV</i>	82
V. DISCUSSÃO	87
VI. CONCLUSÕES	94
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

I. INTRODUÇÃO

I.1 Silenciamento por RNA

O termo “silenciamento por RNA” refere-se a um mecanismo de regulação da expressão gênica em nível transcricional e pós-transcricional, altamente conservado em eucariontes, que consiste na degradação sequência-específica de genes homólogos em resposta a moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA) (Sarmiento *et al.*, 2006; Ding & Voinnet, 2007; Nowotny & Yang, 2009; Padmanabhan *et al.*, 2009). Descoberto em diferentes organismos modelo, este fenômeno recebeu diferentes denominações dependendo do organismo onde foi encontrado: PTGS (post transcriptional gene silencing) em plantas; “quelling” em fungos, e RNAi (RNA interference) em animais e eucariontes inferiores. Entretanto, todos esses fenômenos passaram a ser chamados simplesmente de silenciamento por RNA (Kooter *et al.*, 1999; Li & Ding, 2001; Matzke *et al.*, 2001; Vaucheret *et al.*, 2001; Waterhouse *et al.*, 2001; Hannon, 2002; Plasterk, 2002; Volpe *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003). O silenciamento por RNA desempenha papéis fundamentais em diferentes processos biológicos essenciais como, por exemplo: resistência a vírus, controle da transposição de elementos móveis, regulação da expressão gênica, formação de heterocromatina e silenciamento do centrômero (Hannon, 2002; Provost *et al.*, 2002; Dawe, 2003; Matzke & Matzke, 2003; Ding & Voinnet, 2007; Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009).

De forma geral, esse sistema é um mecanismo de resposta contra vírus (Ding & Voinnet, 2007). A ativação dos mecanismos de resposta antiviral nestas células como resultado da presença de moléculas de dsRNA deve-se ao fato de tais moléculas serem, em sua maioria, de origem viral. Vírus RNA de plantas podem possuir material genético

constituído por dsRNA ou apresenta-la como intermediário no processo de replicação viral (Tadamura *et al.*, 2012). A molécula de dsRNA é processada por uma RNase do tipo III denominada de Dicer, clivando o dsRNA viral em pequenos RNAs de interferência (siRNAs), estes por conseguinte, silenciam a expressão do RNA viral (Miyoshi *et al.*; Lee *et al.*, 2004; Mlotshwa *et al.*, 2008). Entretanto, cada vez mais é relatado na literatura a presença de RNAs de fita dupla endógenos em eucariontes, conhecidos como microRNAs (miRNAs), que ativam o silenciamento e atuam na regulação de diversos genes endógenos (Kumar & Carmichael, 1998; Waterhouse *et al.*, 2001; Hannon, 2002). Os miRNAs, distinguem-se dos siRNAs pela sua biogênese, muito embora também regulem negativamente mRNAs alvos e compartilhem a via de silenciamento gênico (Bartel, 2004). Os siRNAs são processados a partir de dsRNAs, enquanto os miRNAs são processados a partir de transcritos endógenos que não codificam proteínas e possuem como alvo mRNAs endógenos.

I.2 Resposta evolutiva dos vírus ao Silenciamento por RNA

Apesar das plantas e demais eucariontes apresentarem o silenciamento por RNA como mecanismo de defesa contra os vírus, estes ainda se mostram capazes de evitá-lo ou até suprimi-lo. Evidências de que os vírus seriam capazes de suprimir essa resistência surgiram pelo estudo das interações de sinergismo viral entre os membros do gênero *Potyvirus* e outros vírus não filogeneticamente relacionados. Constatou-se que a proteína HC-Pro (codificada pelo genoma dos *Potyvirus*) era responsável pelo sinergismo viral, e que este por sua vez, resultaria provavelmente da supressão do mecanismo de defesa do hospedeiro contra o ataque viral (Pruss *et al.*, 1997). Estudos posteriores mostraram que a HC-Pro (helper component proteinase) era efetivamente

capaz de suprimir o silenciamento por RNA, fato este que forneceu mais uma comprovação da ligação entre o referido fenômeno e o mecanismo natural de defesa da planta contra vírus (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau & Carrington, 1998). Simultaneamente, estudos com a proteína 2b de *Cucumovirus* demonstraram que esta também era capaz de suprimir o silenciamento mediado por RNA (Brigneti *et al.*, 1998). Em 1999, Voinnet e colaboradores demonstraram de forma definitiva que a supressão do silenciamento por RNA é uma estratégia anti-defesa comumente utilizada pelos vírus vegetais com genoma composto por moléculas de DNA ou RNA, como *Geminivirus* (por meio da proteína AC2), *Sobemovirus* (através da proteína P1), *Tombusvirus* (pelo intermédio da proteína 19K) e outros (*Comovirus*, *Tobamovirus* e *Tobravirus*).

Cabe ressaltar que, do ponto de vista evolutivo, a pressão de seleção promovida pelo silenciamento antiviral forçou diversos vírus a desenvolver supressores de silenciamento independentes capazes de atuar em diversas etapas do silenciamento por RNA para suprimir o mecanismo antiviral. De maneira geral, a principal estratégia utilizada pelos vírus para contra-atacar o mecanismo de defesa do hospedeiro baseia-se no seqüestro das moléculas de dsRNA pelos supressores virais (Csorba *et al.*, 2009) evitando assim o carregamento das mesmas na maquinaria antiviral (Tadamura *et al.*, 2012).

1.2.1 A proteína viral HC-Pro

A proteína HC-Pro (Helper Component-Proteinase) é produzida por vírus vegetais do gênero *Potyvirus*, da família *Potyviridae*, que constitui o mais importante grupo de vírus fitopatogênicos (Riechmann *et al.*, 1992). O genoma destes vírus é

composto por uma molécula de RNA fita simples de polaridade positiva. A família *Potyviridae*, além do gênero *Potyvirus*, apresenta mais cinco gêneros: *Rymovirus*, *Bymovirus*, *Macluravirus*, *Ipomovirus* e *Tritimorivus* (Berger *et al.*, 1997). Coletivamente, os membros dessa família causam perdas superiores às causadas por todos os outros vírus de plantas em conjunto.

Uma proteína HC-Pro típica tem cerca de 460 aminoácidos, apresenta peso molecular de aproximadamente 52 kDa e pI teórico de 8,28. Apesar de se tratar de uma proteína relativamente pequena, ela acumula um número surpreendentemente grande de funções, sendo assim, a proteína que possui o maior número de funções descritas dentre aquelas produzidas pelos potyvírus (Maia *et al.*, 1996). A HC-Pro desempenha diversos papéis durante o ciclo de infecção viral: atua como proteinase (em *cis*); participa da transmissão por afídeos; atua como auxiliar da replicação viral e dos movimentos célula-a-célula e a longa distância. Adicionalmente é dotada de capacidade supressora determinando a inibição do sistema de defesa baseado no silenciamento por RNA (Carrington *et al.*, 1989; Cronin *et al.*, 1995; Kasschau & Carrington, 1995; Vance *et al.*, 1995; Maia *et al.*, 1996; Pruss *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1997; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000).

I.3 Supressores endógenos de silenciamento por RNA

Além dos inúmeros supressores de silenciamento gênico de origem viral, supressores de silenciamento endógenos também foram relatados em eucariontes. A supressão de silenciamento de origem endógena controla negativamente a presença de siRNAs e miRNAs, atuando de diversos modos. A geração e o controle dos siRNAs e miRNAs são processos essenciais para o desenvolvimento normal de plantas e animais

(Carrington & Ambros, 2003; Mallory & Vaucheret, 2006; Ramachandran & Chen, 2008).

O primeiro destes supressores foi identificado em *Nicotiana tabacum* e foi chamado rgs-CaM (*regulator of gene silencing CaM*) (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Quando expressa em níveis elevados em *Nicotiana benthamiana*, a rgs-CaM suprime o silenciamento gênico induzido pelo vírus X de batata (PVX) (Anandalakshmi *et al.*, 2000). O seu mecanismo de ação, porém, é ainda totalmente desconhecido. Uma proteína inibidora da atividade da RNaseL de *Arabidopsis* (denominada RLI2) também apresenta atividade supressora de silenciamento quando expressa em níveis elevados em plantas transgênicas de *N. benthamiana* (Sarmiento *et al.*, 2006).

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

no núcleo, enquanto que as XRN4 atuam exclusivamente no citoplasma promovendo a degradação de moléculas aberrantes de RNA (Gazzani *et al.*, 2004; Souret *et al.*, 2004; Gy *et al.*, 2007). Já a Fry1 atua como um modulador fino das atividades de XRN2, XRN3 e XRN4, proteínas responsáveis pela supressão do silenciamento (Gy *et al.*, 2007).

Curiosamente, observou-se que uma exonuclease conservada em *Caenorhabditis elegans* e *Schizosaccharomyces pombe*, denominada Eri-1, degrada especificamente siRNAs sendo capaz de reduzir a eficiência do silenciamento por RNA *in vivo* (Kennedy *et al.*, 2004; Iida *et al.*, 2006). Adicionalmente, uma família de exoribonucleases conhecidas como *SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE* (SDN), degradam moléculas de miRNA maduras em *Arabidopsis*, atuando especificamente em miRNAs de fita simples (Ramachandran & Chen, 2008).

I.4 As Calmodulinas

Segundo a classificação do SCOP (*Structural Classification of Protein*), as calmodulinas (CaMs) são proteínas que possuem domínios *calmodulin-like* que são capazes de realizar ligações com Ca^{2+} por meio de uma estrutura hélice-giro-hélice conhecida como *EF-hand* (Kretsinger, 1987). A estrutura típica de uma CaM é composta por dois domínios globulares ligados por uma longa hélice alfa flexível (Figura 1a). Cada domínio globular contém um par de *EF-hand* (Bouche *et al.*, 2005). Entretanto, algumas proteínas relacionadas às CaMs podem apresentar um número variável de *EF-hands*, girando entre 2 a 6 (McCormack *et al.*, 2003; Ranty *et al.*, 2006). As CaMs são reconhecidas como os mais importantes sensores celulares de Ca^{2+} , sendo

orquestradores de diversos eventos regulatórios, os quais são efetivados pela sua capacidade de interação com um grupo grande e diverso de proteínas celulares (De Koninck & Schulman, 1998; Bouche *et al.*, 2005; Huang & Liu, 2007). As calmodulinas não apresentam em si atividade enzimática. Elas são ativadas por íons Ca^{2+} que promovem modificações alostéricas (Figura 1b), o que as tornam aptas a se ligar com sua(s) proteína(s) alvo (De Koninck & Schulman, 1998; Bouche *et al.*, 2005; Huang & Liu, 2007).

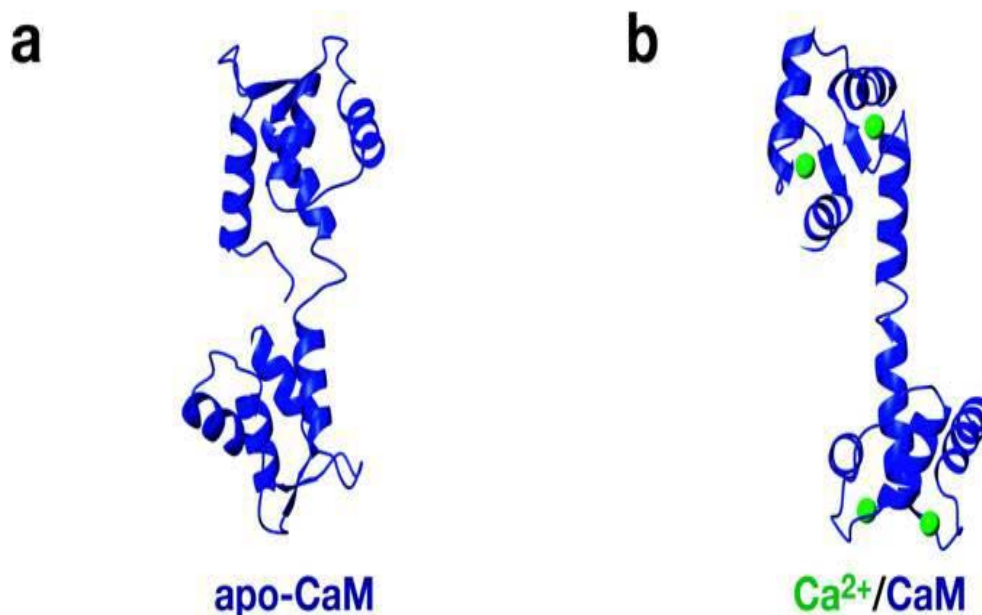


Figura 1. Representação da estrutura terciária de uma CaM e modificações alostéricas ativadas por íons Ca^{2+} . CaM está em azul e os íons Ca^{2+} estão em verde. Dados estruturais retirados do Banco de Dados de Proteína, código de acesso: a) apo-CaM (1CFD), b) Ca^{2+} / CaM (3CLN). A estrutura cristalográfica foi determinada por difração de raios-x. Adaptado de Bouche e colaboradores (2005).

Geralmente, as CaMs são encontradas no citosol, no entanto, podem ser encontradas no núcleo (Van Der Luit *et al.*, 1999), no peroxissomo (Yang & Poovaiah, 2002) e na matriz extracelular (Ma *et al.*, 1999). A necessidade de ocupar múltiplos locais subcelulares é compreensível, pois as proteínas alvo das CaMs estão distribuídas em diferentes compartimentos celulares. Assim, um grande número de proteínas celulares, das mais variadas funções e localizações, já foram identificadas como alvo das CaMs. Alguns exemplos incluem proteínas kinases, canais de Ca^{2+} , canais de K^{+} , proteínas F-box, proteínas com domínios de ligação a RNA, glutamato decarboxylase (GAD), e outras proteínas de função ainda não conhecida (Bouche *et al.*, 2005; Popescu *et al.*, 2007). Algumas dessas interações já foram caracterizadas a nível estrutural, e o que se observa é que as calmodulinas agem de formas muito diversas como: (a) liberação de autoinibição, (b) remodelação ativa de sítio ativo, (c) promoção de dimerização, (d) estabilização de complexos multiméricos, (e) inativação por ligação a sítio de ligante (Bouche *et al.*, 2005).

I.5 A proteína rgs-CaM

A rgs-CaM (*regulator of gene silencing CaM*), é uma proteína do tipo Calmodulina (CaM) que foi identificada em plantas de *Nicotiana tabacum* atuando como supressora de silenciamento por RNA (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Esta proteína, capaz de interagir com a HC-Pro, foi evidenciada pelo sistema duplo-híbrido de levedura (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Plantas transgênicas de *N. benthamiana* superexpressando a rgs-CaM apresentam alterações fenotípicas semelhantes às aquelas observadas em *N. benthamiana* transgênicas expressando HC-Pro (Anandalakshmi *et al.*, 2000). A interação da rgs-CaM com a proteína viral HC-Pro, e o fato de que sua expressão pode ser induzida pela HC-Pro, sugerem que a supressão do silenciamento

pela HC-Pro possa ser mediada pela rgs-CaM. Embora o mecanismo de atuação envolvido seja ainda desconhecido, acredita-se que ocorra a ativação de uma via endógena que regularia negativamente o sistema de silenciamento (Figura 2) (Anandalakshmi *et al.*, 2000).

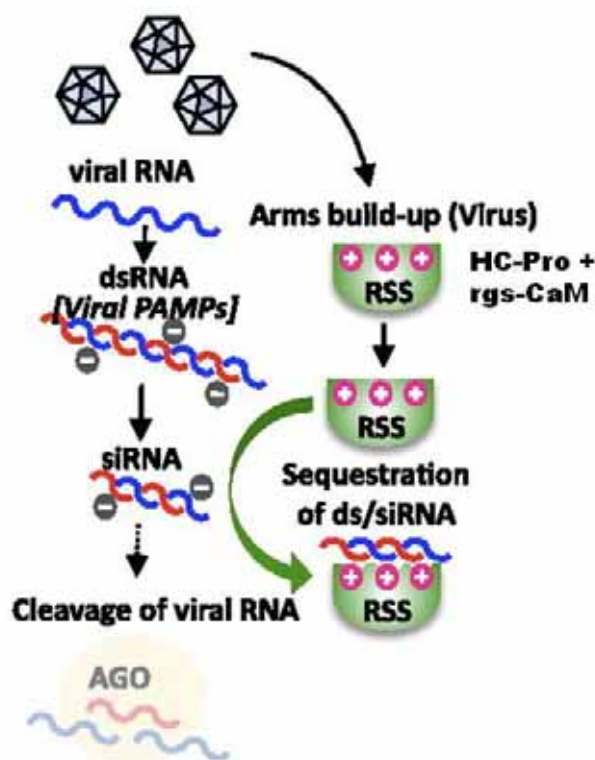


Figura 2. Modelo de contra-defesa viral ao silenciamento antiviral do hospedeiro.

A replicação viral promove a formação de dsRNA que induz o silenciamento antiviral pela geração de siRNAs contra o vírus (lado esquerdo da via). Para contra-atacar esta defesa do hospedeiro, a presença da proteína viral HC-Pro induziria a expressão da rgs-CaM e, uma interação entre elas, promoveria a supressão do silenciamento (Anandalakshmi *et al.*, 2000). O modo de ação seria baseado no sequestro das moléculas de siRNA e/ou de dsRNA de origem viral que induzem o silenciamento (lado direito da via). Desta maneira, o vírus teria condições de se replicar no hospedeiro. RSS – RNA silencing suppressor. Adaptado de Nakahara e colaboradores (2012).

Recentemente, porém, Nakahara e colaboradores (2012) relataram que a rgs-CaM é uma proteína envolvida na resposta de contra-defesa da planta aos supressores virais. Para tal, a rgs-CaM sequestraria e degradaria os supressores virais via autofagia com o auto-sacrifício, resultando em uma defesa, via silenciamento por RNA, mais potente contra a infecção viral (Figura 3). Além disso, a invasão viral de plantas geralmente é acompanhada por ferimento que induz a expressão da rgs-CaM como preparo do mecanismo antiviral do hospedeiro no estágio inicial da infecção (Tadamura *et al.*, 2012).

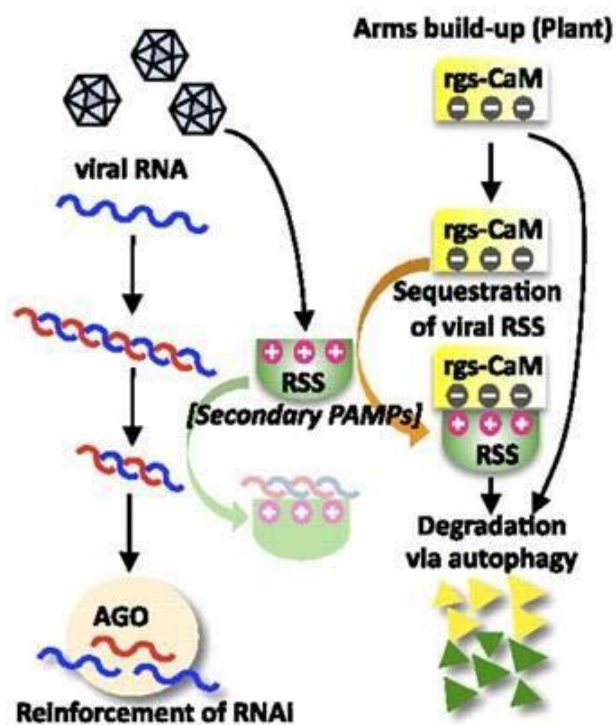


Figura 3. Modelo de resposta do hospedeiro contra os supressores virais. A proteína rgs-CaM, expressa pelo hospedeiro, possui afinidade pelas cargas positivas presentes nos domínios de ligação a siRNA/dsRNA dos supressores virais (RSS). Deste modo, a rgs-CaM impediria a ligação dos supressores virais aos siRNA/dsRNA necessária à supressão. Ao interagir com os supressores, a rgs-CaM é capaz de sequestrá-los e promover a degradação dos mesmos via autofagia. Como resultado, a via silenciamento por RNA permanece ativa e efetiva contra a infecção viral (Nakahara *et al.*, 2012). Adaptado de Nakahara e colaboradores (2012).

A rgs-CaM tem 190 aminoácidos, massa molecular de aproximadamente 21 kDa, um pI teórico de 4,74, e possui 3 domínios *EF-hands* (aminoácidos: 58-80, 94-116 e 167-190) (Anandalakshmi *et al.*, 2000). A região N-terminal de 50 aminoácidos é rica em resíduos básicos, e apresenta características típicas de uma região alvo de outras calmodulinas (Anandalakshmi *et al.*, 2000), o que indica a existência de uma possível auto-regulação.

A proteína rgs-CaM desperta uma ampla gama de interesse, pois é uma proteína endógena identificada em tabaco diretamente relacionada no processo de interação vírus planta durante o processo de infecção viral (Anandalakshmi *et al.*, 2000; Nakahara *et al.*, 2012; Tadamura *et al.*, 2012), porem os dados disponíveis na literatura ainda são contraditórios. Além disso, essa proteína pertence à classe das calmodulinas que participam de diversas vias metabólicas (De Koninck & Schulman, 1998; Bouche *et al.*, 2005; Huang & Liu, 2007). Apesar disso, até hoje pouco se fez para determinar suas atividades bioquímicas, e os ensaios visando desvendar o seu mecanismo de ação são insipientes. Desse modo, todo trabalho relacionado à descoberta de possíveis funções e características da rgs-CaM é de extrema importância para entender as diversas vias em que esta proteína possa estar envolvida.

II. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar funcionalmente a proteína rgs-CaM de tabaco e investigar a sua interação com a proteína HC-Pro.

Os objetivos específicos são:

1. Realizar a expressão heteróloga das proteínas rgs-CaM e HC-Pro em *Escherichia coli*, para purificação em larga escala e realização de testes de interação entre ambas.
2. Identificar proteínas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), com e sem infecção viral, capazes de interagir com a rgs-CaM.
3. Realizar testes de interação *in vivo* e de localização subcelular da interação rgs-CaM e HC-Pro.
4. Realizar o silenciamento da expressão da rgs-CaM em tabaco empregando a técnica de RNAi.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1 Origem das proteínas rgs-CaM e HC-Pro

Para obtenção da proteína HC-Pro recombinante foi empregado um cDNA que codifica a HC-Pro do *Potato virus Y* (PVY) que se encontrava clonado no vetor pMal-c2E (Maia & Bernardi, 1996). Esse vetor já se encontrava inserido em uma cepa BL-21 DE3 Rosetta de *Escherichia coli* apropriada para expressão. Para expressar a proteína recombinante foi utilizado protocolo que já se encontrava estabelecido no laboratório (Maia & Bernardi, 1996). Nesse caso, a proteína expressa foi fusionada à “Maltose Binding Protein” (MBP), gerando a fusão MBP:HC-Pro, estratégia que aumenta a estabilidade da proteína expressa e possibilita os ensaios de interação *in vitro*.

No caso da rgs-CaM de tabaco, um cDNA clonado no vetor pMal-c2E também se encontrava disponível no laboratório (Makiyama, 2009). Este cDNA foi amplificado por PCR usando-se oligonucleotídeos específicos acrescidos de sítios de restrição apropriados (*NdeI* e *XhoI* ou *EcoRI* e *XhoI*) para subclonagem nos vetores de expressão pET-28a e pET-15b (Novagen) ou no vetor pGEX-5X-1. A proteína rgs-CaM expressa pelos vetores pET-28a e pET-15b (denominada rgs-CaM:His) foi fusionada a uma cauda de resíduos de histidina (6xHis), e a proteína expressa no vetor pGEX-5X-1 (denominado de GST:rgs-CaM) foi fusionada à porção C-terminal da proteína Glutathione S-transferase (GST).

III.1.1 Indução da expressão da rgs-CaM em *Escherichia coli*

Os plasmídeos pET-28a, pET-15b e pGEX-5X-1 carregando a região codificadora da proteína rgs-CaM foram introduzidos nas cepas BL-21 (DE3), BL-21

DE3 pLysS, BL-21 DE3 Rosetta e pRIL codon plus de *E. coli* visando a sua expressão. Cada colônia transformada foi inoculada em 2 ml de meio LB (Luria-Bertani; composição: NaCl, triptona e extrato de levedura) contendo 100 µg/ml de canamicina e 50 µg/ml de cloranfenicol para as bactérias transformadas com pET-28a e pET15b, ou 100 µg/ml de ampicilina e 50 µg/ml de cloranfenicol para as bactérias transformadas com pGEX-5X-1. As bactérias foram então incubadas a temperatura de 37°C por 12 horas sob agitação de 200 rpm. Logo após, uma alíquota de 200 µl dessa pré-cultura foi adicionada a 10 ml de meio LB contendo os antibióticos citados, e crescida até alcançar a absorbância (600 nm) de ~0.7. Ao atingir a absorbância desejada, a uma parte do inoculo foi adicionado 1 mM de IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) para indução da expressão, sendo que a outra parte, à qual não foi adicionado IPTG no inoculo (não induzidas), foi usada como controle. Ambas foram incubadas a 28°C por 4 horas. As células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 100 µl de tampão de lise (62,5 mM Tris, 2% SDS, 10% glicerol e 5% β-mercaptoetanol). A lise das células nas amostras controle e induzida foi completada por aquecimento a uma temperatura de 95°C por 5 minutos, processo este também necessário para desnaturação das proteínas presentes no meio. Os resultados das induções foram observados em gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis) 12%. Os clones positivos foram estocados em glicerol e armazenados no freezer -80°C.

III.1.2 Testes de solubilidade da proteína recombinante

Para os ensaios de solubilidade da proteína de fusão GST:rgs-CaM, 10 ml de cultura bacteriana induzida foram centrifugados a 3.500 x g por 10 minutos. Em seguida, as bactérias foram ressuspensas em tampões de diferentes composições: 20

mM ou 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, alterando a concentração de NaCl ou KCl para cada tampão (100 mM ou 300 mM). Em alguns desses tampões foram adicionados ainda Tween 0,25%, MgCl_2 20 mM e EDTA 1 mM. Em todos os tampões foram adicionados Lisozima (1 mg/ml), para lise bacteriana, e inibidores de protease (TECEP 1 mM, PMSF 1 mM, Aprotinina 1 $\mu\text{g/ml}$, Pepstatina 1 $\mu\text{g/ml}$, Leupeptina 1 $\mu\text{g/ml}$), RNase A (1 $\mu\text{g/ml}$) e DNase I (10 u/ml). Após serem ressuspensas, as amostras permaneceram no gelo por 1 hora, sendo posteriormente centrifugadas a 16.000 x g por 30 minutos a 4°C. No fim do processo foram coletados o sobrenadante (fração solúvel) e o precipitado (fração insolúvel), sendo os mesmos analisados em gel SDS-PAGE 12%, para verificar se a proteína estava na fração solúvel.

III.2 Preparo das proteínas de fusão para os ensaios *in vitro* de interação

III.2.1 Indução em larga escala das proteínas de fusão GST:rgs-CaM e MBP:HC-Pro

Para os ensaios de interação as proteínas de fusão GST:rgs-CaM e MBP:HC-Pro foram expressas em larga escala. Para tal, os clones previamente selecionados por produzirem as proteínas de interesse foram inoculados em 10 ml de meio LB contendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina e 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol, e em seguida incubados por 12 horas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm. Em seguida, 10 ml desse pré-inóculo foram transferidos para 1 L de meio LB contendo os agentes de seleção, e incubados até alcançar uma absorbância (600 nm) de ~0.7 (crescimento de ~3 horas). A indução da expressão foi realizada conforme descrito anteriormente. Após 4 horas de indução, as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 50 ml de tampão

selecionado de acordo com teste de solubilidade descrito acima. Para a proteína de fusão rgs-CaM:GST foi utilizado o tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl e para a proteína de fusão MBP:HC-Pro foi utilizado o tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂. Ambos os tampões continham Lysozima (1 mg/ml), EDTA (1 mM) e inibidores de protease, além de RNase A (1 µg/ml) e DNase I (10 u/ml). As amostras foram incubadas por 1 hora no gelo, e em seguida centrifugadas a 16.000 x g por 30min a 4°C. A fração correspondendo ao sobrenadante foi coletada para os ensaios de interação. No caso da proteína de fusão MBP:HC-Pro, antes da realização dos ensaios de interação, esta foi submetida a purificação por cromatografia de afinidade afim de eliminar o máximo do extrato protéico bruto (item III.2.2).

III.2.2 Purificação da proteína de fusão MBP:HC-Pro pelo método de cromatografia de afinidade usando resina de amilose

Após a lise das células induzidas e centrifugação do extrato total, a proteína MBP:HC-Pro recombinante foi submetida a cromatografia de afinidade realizada em condições não desnaturantes em coluna cromatográfica de afinidade contendo amilose (New England), acoplada a um equipamento HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography) modelo AKTA Purifier 900 (GE Helthcare), seguindo as instruções descritas pelo fabricante. Para a purificação foram utilizados aproximadamente 50 ml de sobrenadante da fração solúvel do extrato total de células. A coluna foi montada manualmente retirando o álcool presente na resina e equilibrando-a com tampão A (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl e 20 mM MgCl₂). Logo após o preparo da coluna, a solução contendo a proteína de interesse foi injetada com fluxo 1 ml/min. Em seguida a

coluna foi lavada com tampão A com um volume correspondente a 5 vezes o volume de resina. Finalizada essa etapa, as proteínas foram eluídas com tampão B (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂ e 10 mM Maltose) e fracionadas em volumes de 1 ml. Logo após a purificação, as frações contendo a proteína recombinante foram analisadas em GEL-SDS-PAGE 12%.

III.3 Ensaios *in vitro* de interação entre as proteínas de fusão GST:rgs-CaM e a MBP:HC-Pro

No presente estudo a interação foi investigada *in vitro* utilizando a técnica de *pull down* (Einarson *et al.*, 2007). Para tal, a proteína de fusão GST:rgs-CaM, ou a proteína controle GST, foi inicialmente fixada em 100 µl de resina de Glutathione Sepharose (GE), adicionando um 1 ml do extrato protéico bruto solubilizado contendo a proteína GST:rgs-CaM (ou GST). Posteriormente, a amostra contendo a proteína de fusão MBP:HC-Pro, ou a proteína controle MBP, foi adicionada à resina contendo a proteína de fusão GST:rgs-CaM imobilizada (ou GST), seguida de um período de incubação por 4 horas a 4°C sob agitação suave e constante. Para os testes de *pull down* usando as proteínas MBP:HC-Pro ou MBP, previamente purificadas, foram utilizados aproximadamente 250 µg de proteína. Após incubação, a resina foi lavada com tampão A (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl e 20 mM MgCl₂) com um volume correspondente a 50 vezes o volume de resina empregado para a retirada do material não ligado. Em seguida, as proteínas remanescentes na matriz sólida foram analisadas em gel SDS-PAGE 12% e por Western blot utilizando anticorpos contra as proteínas MBP ou GST (Item III.3.1).

III.3.1 Procedimento para o Western blot

Após o fracionamento das proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada usando TTBS (25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 350 mM NaCl) contendo 0,05% de Tween e 5% de leite em pó) e incubação por 1 hora. Logo após, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos em tampão TTBS contendo 0,25% Tween. A membrana foi então transferida para tampão TTBS contendo 3% de leite em pó, 0,05% de Tween e o anticorpo monoclonal anti-GST (Sigma), ou anti-MBP (Sigma), ou ainda uma combinação dos dois anticorpos, diluídos em concentrações apropriadas (anti-MBP 0,01ug/ml e anti-GST 1:10000). Após incubação por 2 horas, o processo de lavagem foi repetido como descrito anteriormente, e a membrana incubada por 1 hora com tampão TTBS contendo 3% de leite em pó, 0,05% de Tween e o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a Peroxidase (Sigma), na diluição de 1:10.000. A membrana foi submetida ao processo de lavagem e relevada utilizando o kit *ECL Western blotting Analysis System* (GE), seguindo as instruções do fabricante.

III.4 Teste de indução da proteína rgs-CaM fusionada a cauda de histidinas (rgs-CaM:His)

III.4.1 Mudança da cauda de histidinas da região N-terminal para região C-terminal da proteína rgs-CaM.

Uma nova construção foi elaborada na tentativa de expressar a proteína rgs-CaM fusionada a cauda de histidinas em bactéria. Para tal foi utilizado o vetor pET-28b adicionando as histidinas na região C-terminal da rgs-CaM. Após a confirmação, por digestão e sequenciamento, da inserção da rgs-CaM no vetor pET-28b, o plasmídeo

recombinante foi introduzido nas cepas BL-21 (DE3), BL-21 DE3 pLysS, BL-21 DE3 Rosetta e pRIL codon plus de *E. coli* visando a expressão da proteína. A indução da expressão foi realizada conforme descrito no item III.1.1.

III.4.2 Teste de solubilidade da proteína de fusão rgs-CaM:His em condição não desnaturante

Os ensaios de solubilidade da proteína de fusão rgs-CaM:His, foram realizados conforme descrito no item III.1.2 , alterando apenas os tampões utilizados: a - Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM; b - Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, Tween 0,25%; c - Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM; d - Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 300 mM; e - Tris-HCl 50 mM pH 7.5, KCl 300mM, MgCl₂ 20 mM; f - Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 300 mM, MgCl₂ 20 mM; g - Tris-HCl 50 mM pH 7.5, KCl 100mM, MgCl₂ 20 mM; h - HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 100 mM; i - HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 300 mM. Todos os tampões foram adicionados de Lisozima (1 mg/ml), inibidores de protease (TECEP 1 mM, PMSF 1 mM, Aproptinina 1 µg/ml, Pepstatina 1 µg/ml, Leupeptina 1 µg/ml), RNase A (1 µg/ml) e DNase I (10 u/ml).

III.4.3 Purificação da proteína de fusão rgs-CaM:His em condições desnaturantes

III.4.3.1 Desnaturação da proteína rgs-CaM:His na presença de uréia e renaturação pelo processo de diálise

Os sedimentos de proteínas totais provenientes da expressão em bactéria foram ressuspensos em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH7,5, NaCl 50 mM) contendo

lisozima (1 mg/ml). As amostras foram então submetidas à sonicação (6X de 30s cada com intervalos de 30 segundos), e os extratos centrifugados a 13000 rpm durante 15 min a 4°C. Após a lavagem dos extratos, estes foram ressuspensos em tampão glicina 50 mM pH 7,5 adicionado de NaCl 20 mM e as proteínas desnaturadas na presença de 7 M de uréia (concentração final). Após a desnaturação, a proteína de fusão foi submetida ao processo de purificação (item III.4.3.3) sendo em seguida dialisada para a remoção progressiva da uréia visando a sua renaturação.

III.4.3.2 Desnaturação da proteína rgs-CaM:His na presença de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) e renaturação utilizando 2-METIL-2,4-PENTANODIOL (MPD)

O processo de desnaturação utilizando SDS seguiu os mesmos passos descritos na desnaturação com uréia. Nesse caso, porém, foram testadas 3 concentrações de SDS (0,1%, 1% e 2%) na desnaturação. Para a renaturação protéica foi utilizado o 2 M de 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), sendo as amostras mantidas 24 horas a 4°C sob agitação, antecedendo a etapa de purificação. No procedimento utilizando SDS 0,1%, o MPD foi acrescentado desde a etapa inicial de sonicação e lavagem dos extratos.

III.4.3.3 Purificação da proteína rgs-CaM:His na presença de uréia ou SDS por cromatografia de afinidade

As proteínas desnaturadas com uréia ou SDS foram purificadas em coluna cromatográfica de afinidade contendo níquel (Ni-NTA Qiagen), acoplada a um equipamento HPLC modelo AKTA Purifier 900 (GE Healthcare), seguindo as instruções descritas pelo fabricante. A coluna foi montada manualmente retirando o álcool presente

na resina e equilibrando-a com tampão A1 (glicina 50 mM pH7,5, NaCl 20 mM, 7 M Uréia) ou tampão A2 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, SDS 0,1%, 1% ou 2%, MPD 2 M), para amostras desnaturadas com uréia ou SDS, respectivamente. Logo após o preparo da coluna, a solução contendo a proteína de interesse foi injetada com fluxo 1 ml/min. Em seguida a coluna foi lavada com tampão usando um volume correspondente a 5 vezes o volume de resina. Finalizada essa etapa, as proteínas foram eluídas por meio de gradiente de imidazol em tampão B1 (glicina 50 mM pH7,5, NaCl 20 mM, 7 M Uréia, 250 mM imidazol) ou tampão B2 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, Imidazol 250 mM) correspondente as amostras com uréia ou SDS, respectivamente, e fracionadas em volumes de 1 ml. Logo após a purificação, as frações contendo a proteína de fusão foram analisadas em SDS-PAGE 12% e agrupadas para uma nova etapa de purificação como descrito nos itens III.4.3.4 (amostras desnaturadas com uréia) e III.4.3.5 (amostras desnaturadas com SDS).

III.4.3.4 Purificação da proteína rgs-CaM:His através de troca iônica em HPLC

A amostra da proteína rgs-CaM:His previamente purificada por cromatografia de afinidade (desnaturada com uréia) foi submetida à troca iônica utilizando a coluna Hitrap QFF catiônico acoplado a HPLC. A coluna foi equilibrada em tampão A1 sendo a amostra injetada a um fluxo de 0,5 ml/min. A coluna foi então lavada com 5 vezes o volume da coluna. A proteína foi eluída por meio de gradiente linear de NaCl (de 6 a 96 mM) em tampão B1. Logo após a purificação, as frações contendo a proteína recombinante foram agrupadas e dialisadas durante a noite em tampão glicina 50 mM

pH 7,5 adicionado de NaCl 20 mM eliminando assim a uréia visando a renaturação protéica.

III.4.3.5 Purificação da proteína rgs-CaM:His através da cromatografia de exclusão por tamanho

As frações contendo a proteína rgs-CaM:His obtidas por cromatografia de afinidade, previamente tratadas com SDS 1% e MPD 2M, foram carregadas em coluna Superdex 75 10/300 GL acoplada a HPLC. A coluna foi previamente equilibrada com tampão A3 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM e MPD 2M), e este mesmo tampão foi utilizado para eluição da amostra em fluxo de 0,5 ml/min em temperatura ambiente.

III.5 Análise estrutural da proteína rgs-CaM

III. 5.1 Análise da estrutura secundária da proteína recombinante rgs-CaM:His por espectroscopia de Dicroísmo Circular.

As medições em Dicroísmo Circular (CD) foram realizadas empregando concentrações de 0,4 mg/ml de proteína recombinante em tampão glicina 50 mM pH 7,5 adicionado de NaCl 20 mM, ou em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 adicionado de NaCl 100 mM. Em paralelo foram investigados os efeitos da adição de 5 mM CaCl_2 e de 5 mM de EGTA, respectivamente, sobre a estrutura da proteína. Os espectros de CD foram monitorados em um espectropolarímetro Jasco (J-815) com resolução de 0,5 nm, velocidade de escaneamento de 100 nm/min e largura de banda de 2 nm. Para tal foram empregadas cubetas com caminho óptico de 0,5 mm de comprimento. Um total de 20 acumulações para cada espectro UV entre 200 e 260 nm foi coletado a 20°C. Para

análise do espectro do CD foram utilizados os softwares: Spectra Manager™ II CD e Pro program package (Sreerama & Woody, 2000). Os dados de espectros de CD foram relatados como elipicidade molar residual média ($[\theta]$; deg.cm.mol⁻¹) onde as variáveis concentração da amostra e do número aminoácidos são normalizadas (Correa & Ramos, 2009). Essa transformação é dada pela equação:

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M}{C \times l \times n}$$

onde θ está em graus, M é a massa molecular da proteína em Daltons, C é a concentração da proteína em mg.ml⁻¹, n é o número de resíduos e l é o caminho óptico em cm (Correa & Ramos, 2009). Para deconvolução das curvas de CD foi utilizado o algoritmo CDSSTR (Sreerama & Woody, 2000) e o set7 de banco de dados de espectros de CD.

III.5.2 Alinhamento da sequência de aminoácidos da rgs-CaM com proteínas apresentando homologia estrutural e modelagem teórica.

Para a construção do alinhamento entre a molécula alvo (*target*) e a molécula molde (*template*) foi utilizado o programa on-line HHpred (<http://toolkit.lmb.uni-muenchen.de/hhpred>) (Söding *et al.*, 2005), baseado em métodos de *threading* e disponibilizado pelo servidor do Max-Planck Institute for Developmental Biology (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) e, posteriormente foi transferido para o programa Modeller v.9.10 (Marti-Renom *et al.*, 2000) para a construção dos modelos iniciais teóricos.

III.5.3 Calorimetria de titulação isotérmica – *Isothermal Titration Calorimetry* (ITC)

Os experimentos foram realizados com um sistema Microcal iTC200 (GE Healthcare). As soluções foram deaeradas por 10 minutos antes da realização dos experimentos. As condições padrões foram 25°C com agitação de 1000 rpm, utilizando-se tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) contendo 100 mM NaCl. Para a titulação de Ca^{2+} , foram acondicionados 200 μM de calmodulina à célula de referência (200 μL) enquanto uma solução contendo 10 mM Ca^{2+} foi usada para carregar a seringa do ITC e realizar a titulação com 20 injeções de 2 μL , com duração de 4 segundos, a cada 150 segundos. As injeções do titulante (Ca^{2+}) no tampão correspondente foram usadas para calcular o calor de diluição e mistura das soluções. Os valores da constante de afinidade (K_a) e entalpia (ΔH) foram usados para calcular a variação de energia livre (ΔG) e entropia (ΔS) de ligação usando as equações abaixo:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K_a$$

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

em que R é a constante dos gases, T é a temperatura em Kelvin e K_a constante de dissociação também obtida ($K_a = 1/K_d$),.

Os dados foram analisados através dos softwares Nitpic (Keller *et al.*, 2012) e Sedphat v.10.58d (Houtman *et al.*, 2007).

III.6 Identificação de proteínas virais e do hospedeiro que se associam à proteína rgs-CaM

III.6.1 Infecção viral de *Nicotiana tabacum*

Plantas selvagens de *Nicotiana tabacum* SR1 foram mecanicamente inoculadas com o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). As inoculações foram feitas em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0 com sulfito de sódio 0,01 M. A proporção seguida na preparação do inoculo foi de 1:5 (1 g de folha infectada para 5 ml do tampão). O inoculo foi friccionado sobre as folhas das plantas previamente pulverizadas com abrasivo (carbureto de silício –400 mesh). Para o controle negativo foram utilizadas plantas de tabaco selvagens tratadas apenas com tampão e abrasivo (controle MOCK). As plantas inoculadas foram mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro) sob temperatura controlada sendo observadas durante 10 dias. Para a confirmação da infecção viral, análises de RT-PCR foram realizadas empregando primers específicos para amplificação de parte da região codificadora da proteína capsidial do PepYMV descritos por Moura (2009) [PepNib (5' GWTSGYYGMMTTGGATGATG 3') e PepUTR (5' AGTAGTACAGGAAAAGCC 3')].

III.6.2 Obtenção do extrato protéico de *Nicotiana tabacum* com e sem infecção viral

O extrato total de proteínas de tabaco (infectado ou não com o PepYMV) foi obtido a partir de 3 g de folha. As folhas foram coletadas ao décimo dia após a inoculação viral e maceradas em presença de tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH

8,0; 200 mM NaCl; 1 mM DTT; 10% de Glicerol; 0.05% de TritonX-100; 0,1% de Aproptina 1mg/ml; 0,1% de Pepstatina 1mg/ml; 0,1% de Leupeptina 1mg/ml). Em seguida, a amostra foi centrifugada a 16.000 x g por 20 minutos a 4°C, e uma vez coletado, o sobrenadante foi utilizado nos ensaios de *pull down*. As folhas de plantas MOCK foram coletadas e tratadas da mesma maneira.

III.6.3 Ensaios *in vitro* de interação entre a rgs-CaM:His recombinante e proteínas de *Nicotiana tabacum* com e sem infecção viral

Para eliminar as proteínas capazes de se ligar de maneira inespecífica à resina de cobalto utilizada nos ensaios de *pull down*, os extratos protéicos totais provenientes tanto de plantas infectadas pelo vírus como de plantas MOCK foram previamente incubados com a referida resina devidamente equilibrada com o tampão G (50 mM Tris-HCl pH8,0; 200 mM NaCl; 1 mM DTT; 10% de Glicerol; 0.05% de Triton X-100; 0,1% de Aproptina 1mg/ml; 0,1% de Pepstatina 1mg/ml; 0,1% de Leupeptina 1mg/ml). Após uma incubação de 90 min a 4°C sob leve agitação, o sobrenadante foi coletado para ser então utilizado no ensaio de *pull down* propriamente dito empregando a proteína rgs-CaM recombinante. Para tal, a proteína recombinante rgs-CaM:His (isca) devidamente purificada e estruturada (concentração de 2,0 mg/ml) foi ligada à resina de cobalto equilibrada previamente com tampão A3 (50 mM Tris-HCl pH8,0; 100 mM NaCl; 2 M MPD), mesmo tampão em que a rgs-CaM:His foi purificada através da cromatografia de exclusão por tamanho (item III.4.3.5). Após um período de incubação de 90 min à 4°C sob leve agitação, o tampão foi retirado e a resina lavada com tampão A3 (30 vezes o volume da resina). Em seguida foram adicionados à resina, respectivamente, os sobrenadantes resultantes da etapa anterior e correspondentes aos extratos protéicos

totais obtidos de plantas MOCK ou inoculadas com PepYMV (presa). As amostras foram então incubadas por 2 horas à 4°C sob leve agitação. Em seguida o sobrenadante foi retirado e a resina lavada novamente com tampão A3 (40 vezes o volume da resina). A presença de possíveis proteínas interagentes foi analisada por SDS-PAGE 15%, sendo os géis corados com nitrato de prata utilizando o *Bio-Rad Silver Stain Plus kit* conforme recomendação do fabricante (Bio-Rad).

III.7 Estudos da interação rgs-CaM e HC-Pro empregando BiFC

III.7.1 Clonagem e construções utilizadas

A região codificadora da HC-Pro do *Potato virus Y* (PVY) e a região codificadora da rgs-CaM de *N. tabacum* foram amplificadas por PCR utilizando a enzima "*Pfu turbo*" (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. Os oligonucleotídeos específicos usados no PCR (Tabela 1) foram adicionados dos nucleotídeos CACC necessários para a clonagem dos produtos no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen). Os produtos da amplificação foram purificados em gel usando o kit *PCR Clean up Extraction* (Macherey – Nagel) e posteriormente clonados no vetor pENTR/D-TOPO (Invitrogen), segundo instruções do fabricante.

Os vetores de entrada contendo as regiões codificadoras da HC-Pro e da rgs-CaM foram individualmente recombinados usando o sistema Gateway® (Invitrogen), segundo informações do fabricante, com os seguintes plasmídeos de BiFC (*Biomolecular Fluorescence Complementation*; Bracha-Drori *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2004): nEYFP/pUGW2, cEYFP/ pUGW2, nEYFP/pUGW0 e cEYFP/pUGW0 (Nakagawa *et al.*, 2007). Nestes plasmídeos, os fragmentos proteicos de interesse são

fusionados à porção N-terminal (aminoácidos 1–174; NY) e/ou C-terminal (aminoácidos 175–239; CY) do repórter YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), estando a expressão da fusão sob controle de um promotor 35S. A fase de leitura dos fragmentos clonados foi confirmada por sequenciamento.

Objetivando verificar a interação das proteínas de interesse fusionadas a YFP, a tecnologia de BiFC foi empregada utilizando-se o método de transformação via bombardeamento em epiderme de cebola (*Allium cepa*) como descrito em Dielen e colaboradores (2011).

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da HC-Pro e da rgs-CaM visando os ensaios de BiFC. Os códons de iniciação e de parada estão sublinhados.

	Oligonucleotídeo 1 (5'-3')	Oligonucleotídeo 2 (5'-3')	Tamanho (pb)
rgs_CaM	CAC <u>C</u> atggaatcagtttctgtacctagtg	<u>TTA</u> acttgatcatcatagctttgaactc	573
HcPro	CAC <u>C</u> atgtcgaatgcagacaattttgg	<u>TTA</u> accaactctataatg	1368

III.7.2 Bombardeamento em células de cebola

A interação da HC-Pro com a rgs-CaM foi verificada *in vivo* como descrito por Dielen e colaboradores (2011). Como já relatado anteriormente foram testadas fusões N-terminal e C-terminal da YFP com as duas proteínas de interesse (denominadas YN-HC-Pro, rgs-CaM-YC, HC-Pro-YC e YN-rgs-CaM). Adicionalmente, as proteínas YN-HC-Pro e PAE1-YC (Dielen *et al.*, 2011) foram usadas como controle positivo de interação. Para a realização dos ensaios, cinco µg de plasmídeos na proporção 1 : 1 (rgs-CaM : HC-Pro) foram precipitados na presença de espermidina 0,1 M e CaCl₂ 2,5 M e

partículas de ouro de 1,6 µm. Após uma lavagem com etanol 70% seguida de outra lavagem com etanol absoluto, as partículas de ouro cobertas pelo DNA foram ressuspensas em etanol absoluto e adicionadas em "Macrocarrier" (Bio-Rad). As amostras foram feitas em triplicata e bombardeadas em epiderme de cebola (*Allium cepa*) sobre uma pressão de hélio de 1100 psi utilizando-se o equipamento "Helios Gen Gun" (Bio-Rad). Imagens de microscopia confocal foram registradas 18 e 20 horas após os bombardeamentos.

III.7.3 Microscopia

A fluorescência emitida pela YFP e proveniente da interação foi analisada em microscópio confocal (Leica TCS SP2) empregando o software *LCS Lite Leica* (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) usando uma excitação de 514 nm e emissão na faixa de 549 a 602 nm.

III.8 Obtenção de plantas transgênicas de tabaco para estudos funcionais da rgs-CaM

Visando estudos funcionais, o gene que codifica a rgs-CaM foi silenciado e superexpresso em plantas de tabaco.

III.8.1 Construção do cassete de expressão

III.8.1.1 Cassete para superexpressão da rgs-CaM

Para superexpressar a rgs-CaM, o vetor de entrada pENTR D-TOPO contendo a sua região codificadora (descrito no item III.7.1) foi recombinado com o vetor binário para superexpressão pK7WG2.0 empregando o kit *Gateway Enzyme: LR-Clonase* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A construção assim gerada foi

identificada como pK7WG2.0::rgs-CaM. Para a confirmação da inserção, as colônias recombinantes foram submetidas a PCR, e alguns clones positivos foram sequenciados.

III.8.1.2 Silenciamento da rgs-CaM

Para o silenciamento da rgs-CaM foram utilizadas duas estratégias. A primeira foi baseada na produção de RNA de fita dupla para acionar o silenciamento. Para tal, a região 5' não traduzida (UTR) da rgs-CaM foi amplificada usando oligonucleotídeos específicos: senso (5' CACCTTTCACACTTATTGTATTCTACTT 3') e reverso (5' TTCAACACTAGGTACAGAAAC 3'). Um fragmento de 140 bp foi gerado e clonado no vetor de entrada pENTR D-TOPO, sendo a sua inserção no vetor confirmada por PCR e sequenciamento. O fragmento foi então recombinado no vetor de silenciamento pK7GWIWG2(I), que apresenta 2 sítios de recombinação nos quais o fragmento clonado é inserido tanto na orientação senso como antisenso. Nesse caso, as regiões complementares estarão separadas por uma sequência de íntron permitindo a formação de um RNA de fita dupla (dsRNA) na forma de grampo quando expresso na planta. Essa construção foi denominada de pK7GWIWG2(I)::rgs-CaM.

Uma segunda estratégia baseada na produção de RNA antisenso foi empreendida a fim de evitar um silenciamento total da rgs-CaM. Para tal foi utilizado o vetor binário pBI121 (Clontech; Figura 4), no qual a região codificadora da rgs-CaM, foi clonada na orientação antisenso. Para a amplificação do referido cDNA foi usada a enzima *Pfu* DNA Polimerase (Fermentas) e os oligonucleotídeos específicos: senso (5' GGCGAATTCATGTGCATGGAATCAGTTTC 3'), com adição de um sítio para a enzima *Eco*RI (sublinhado); e reverso (5' CTAGTCTAGATTTAACTTGTCATCATAGCTTTGAA 3'), contendo o sítio para a enzima *Xba*I. O produto de amplificação foi purificado em gel e em seguida digerido

com a enzima *Xba*I. O vetor pBI121, por sua vez, foi submetido à digestão com a enzima *Sst*I e em seguida tratado com a enzima T4 DNA polimerase (Fermentas), seguindo as recomendações do fabricante, para tornar a extremidade cega. Após a formação da extremidade abrupta, o vetor foi digerido com a enzima *Xba*I, permitindo a clonagem invertida do produto amplificado resultando na construção denominada pBI121::rgs-CaM. Cabe ressaltar que não foi inserido um sítio de restrição *Sst*I na extremidade 5' da rgs-CaM, o que facilitaria a clonagem invertida, pois o fragmento correspondente apresenta em sua sequência um sítio para a respectiva enzima de restrição. Após a seleção, clones recombinantes foram checados por digestão e sequenciamento.

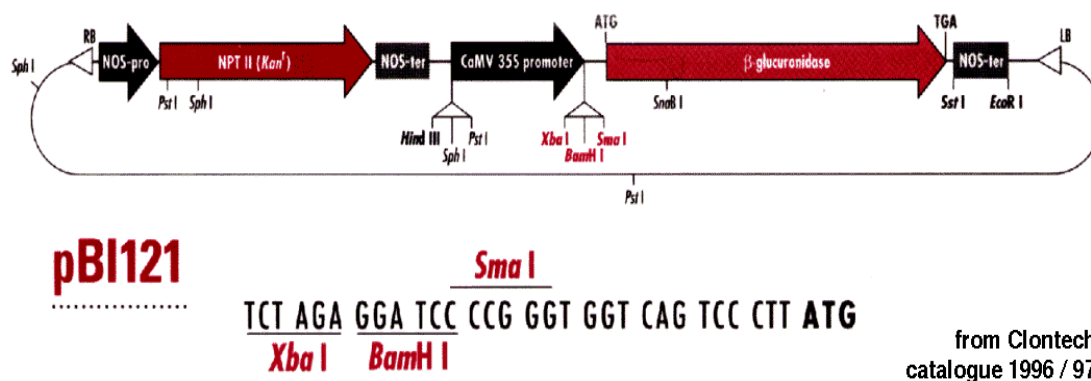


Figura 4. Representação esquemática do vetor pBI121 (Clontech) utilizado para clonagem da região codificadora da rgs-CaM no sentido antisenso.

III.8.1.3 Sequenciamento do plasmídeo recombinante

Na reação de sequenciamento foram utilizados 1 µl do plasmídeo recombinante (400 ng/µl), 1 µl de oligonucleotídeo específico, 2 µl de tampão de reação *Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems), 2 µl de

tampão de reação *Save Money* e 4 µl de água Milli-Q. O programa de PCR utilizado para o sequenciamento foi: 1 - 96°C por 1 minuto; 2 - 96°C por 10 segundos; 3 - 50°C por 5 segundos; 4 - 60°C por 4 minutos; 5 – repetir passos 2 a 4 por 35 vezes; 6 - 10°C . Após o termino de amplificação, os produtos foram precipitados com isopropanol e submetidos ao sequenciamento automático utilizando o equipamento 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As seqüências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas com as seqüências depositadas no banco de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando a ferramenta Blastn.

III.8.2 Transformação de tabaco via *Agrobacterium tumefaciens*

Após a confirmação da obtenção dos cassetes de expressão, estes foram inseridos em *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) conforme protocolo descrito por Lacorte & Romano (1998) para posterior transformação de tabaco. Para a transformação estável de plantas de tabaco (*N. tabacum* SR1) foi utilizado o protocolo descrito por Horsch et al. (1985). Para tal, discos foliares foram imersos por 15 minutos em 15 ml de meio LB contendo *A. tumefaciens* transformadas com os diferentes cassetes de expressão. Após esse período de incubação, os discos foram secos em papel filtro estéril para retirar o excesso de bactérias, sendo em seguida dispostos em placas de Petri contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), e mantidos em ambiente escuro a temperatura de 28°C por 48 horas. Posteriormente, os discos foram transferidos para placas de Petri contendo MS sólido adicionado de 100 µg/ml canamicina, 300 µg/ml de cefotaxima, 2 µg/ml de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,1 µg/ml de ácido naftalenoacético (ANA). As placas foram mantidas por aproximadamente 30 dias em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz até o surgimento de calos. Os calos foram cultivados até a formação de brotos que foram então transferidos para

frascos de vidro contendo meio MS em presença dos agentes de seleção e o hormônio ANA visando a indução de enraizamento. As plantas enraizadas, após período de aclimação em câmara de crescimento, foram transferidas para vasos e mantidas em casa de vegetação para a coleta de sementes.

III.8.3 Caracterização molecular dos transformantes

Para confirmação da inserção do cassete de expressão nas plantas transgênicas regeneradas (incluindo aquelas da geração T1) foi realizado PCR utilizando DNA genômico extraído de folha (Sambrook et al., 1989). Neste caso, DNA genômico extraído de tabaco selvagem (*N. tabacum* SR1; WT) foi usado como controle. Para o PCR confirmatório foram utilizados oligonucleotídeos específicos para cada cassete de expressão, sendo um deles (1) posicionado junto à região promotora (ou terminadora) do vetor e o segundo (2) complementar à região codificadora do gene alvo, como descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados no PCR confirmatório da inserção dos cassetes de expressão nas plantas transgênicas regeneradas.

Construção	Oligonucleotídeo 1	Oligonucleotídeo 2	bp*
pBI121: :rgs-CaM	35S 5' ACAATCCCACTATCCTTC 3'	5'GGCGAATTCATGTGC ATGGAATCAGTTTC 3'	750
pK7WG2.0: :rgs-CaM	35S 5' ACAATCCCACTATCCTTC 3'	5'CTAGTCTAGATTAAC TTG TCATCATAGCTTTGAAC 3'	750
pK7GWIWG2 (I,0::rgs-CaM (senso)	35S 5' ACAATCCCACTATCCTTC 3'	5'TTCAACACTAG GTACAGAAAC 3'	310
pK7GWIWG2 (I,0::rgs-CaM (antisenso)	T35S 5'TTCCTAAAACCAAAATCCA GTGACCTGCAGGCA 3'	5'TTCAACACTAGGT ACAGAAAC 3'	385

* tamanho do fragmento gerado em pares de bases

III.8.3.1 RT-PCR semiquantitativo dos transformantes com silenciamento ou superexpressão da *rgs-CaM*

Após a confirmação da inserção dos cassetes de expressão, as plantas regeneradas foram analisadas quanto ao silenciamento ou superexpressão do gene *rgs-CaM* empregando a técnica de RT-PCR semiquantitativo. Para tal, o RNA total de tabaco selvagem e de algumas linhagens transgênicas selecionadas, representando eventos independentes de transformação, foi extraído seguindo protocolo descrito (Sambrook & Russell, 2001). Para tal, cerca de 100 mg de tecido foliar macerado em nitrogênio líquido foram utilizados. O RNA total extraído foi usado como molde para sintetizar a primeira fita de cDNA empregando SuperScript III (Invitrogen) conforme as recomendações do fabricante.

O cDNA foi amplificado usando oligonucleotídeos específicos complementares à região codificadora da *rgs-CaM*, (5'CCGGAATTC**ATG**GGAATCAGTTTCTGT e 5'-CTAGTCTAGATT**AA**CTTGTCATCATAGCTTTGAAC – 3'), gerando um fragmento de aproximadamente 600 pares de bases (pb). Como controle interno foi utilizado o gene que codifica a β -tubulina de tabaco (número de acesso U91562), o qual foi amplificado usando os oligonucleotídeos: tubF – GCATATCGATCCACATTGGTCAG e tubR – GAGCTGCCTGTATGTTCCAGTCC, gerando um amplicon de 200 pb.

III.8.3.2 Infecção viral das plantas transgênicas de tabaco

Visando verificar o efeito do silenciamento ou da superexpressão da *rgs-CaM* na resposta da planta hospedeira à infecção viral, plantas transgênicas de tabaco da geração T1, previamente selecionadas por PCR confirmatório, foram mecanicamente inoculadas

com o PepYMV, como descrito no item III.6.1. No controle negativo, as plantas transgênicas e controle foram inoculadas somente com tampão e abrasivo (controle MOCK). As plantas inoculadas e controle foram mantidas em casa de vegetação. Para análise da infecção viral foram coletadas folhas sistemicamente infectadas aos 7, 14 e 21 dias pós-inoculação (dpi). A cinética de acumulação viral foi determinada por ELISA (Clark *et al.*, 1986) empregando um anti-soro específico (item III.8.3.3).

III.8.3.3 Análise da acumulação viral pelo teste de ELISA indireto

Para análise da cinética da acumulação viral nas plantas de tabaco inoculadas com o PepYMV foi utilizado um anti-soro universal anti-potyvirus (Agdia) e a técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indireto. Para tal, foram macerados 100 mg de folha por amostra em presença do tampão de extração *Indirect Sample Extraction 1X* (10 mM carbonato de sódio, 30 mM bicarbonato de sódio, 3 mM azida de sódio, 2% Polivinilpirrolidona – PVP, pH 9,6) na proporção 1:10. Adicionou-se então 100 µL desse macerado a cada cavidade da placa de poliestireno sendo a mesma incubada por 2 horas a 4°C. Posteriormente, a placa foi lavada por sete vezes com PBS-T 1X (130 mM cloreto de sódio, 8 mM fosfato de sódio dibásico, 1 mM fosfato de potássio monobásico, 3 mM cloreto de potássio, 0,05% Tween-20, pH 7,4). Em seguida adicionou-se o anti-soro primário diluído (1:200) em tampão ECI 1X (0,2% albumina bovina, 2% PVP, 3 mM azida de sódio, pH 7,4), sendo a placa incubada por 12 horas a 4°C, com posterior ciclo de sete lavagens em tampão PBS-T (1X). Após as lavagens, o anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina (anti-IgG de rato – Agdia) diluído (1:200) em tampão ECI (1X) foi adicionado, e incubou-se por mais 2 horas a 4°C. A

placa foi submetida novamente às lavagens com PBS-T 1X. Na revelação foi utilizado p-nitrofenilfosfato em pastilha de 5 mg diluídas em 5 mL de tampão específico.

Os dados obtidos por ELISA foram submetidos à teste de homogeneidade de variâncias (Levene) e, uma vez atendendo as pressuposições estatísticas, foram submetidos à análise de variância ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (Mischan & Pinho, 1996; Gomes & Garcia, 2002). Todas essas análises foram realizadas empregando o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System) versão 9.0.

IV. RESULTADOS

IV. 1 Expressão, purificação e caracterização da proteína rgs-CaM

IV.1.1 Subclonagem da rgs-CaM nos vetores pET-28a, pET15b e pGEX-5X-1

A região codificadora da rgs-CaM foi inserida nos vetores de expressão digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (caso dos vetores pET-28a e pET-15b) ou *EcoRI* e *XhoI* (caso do vetor pGEX-5X-1). Após a transformação em *E. coli*, os clones positivos foram confirmados por digestão do plasmídeos recombinantes com as respectivas enzimas de restrição. A presença do inserto correspondente à região codificadora da rgs-CaM foi confirmada nos três vetores em diferentes clones recombinantes (Figura 5).

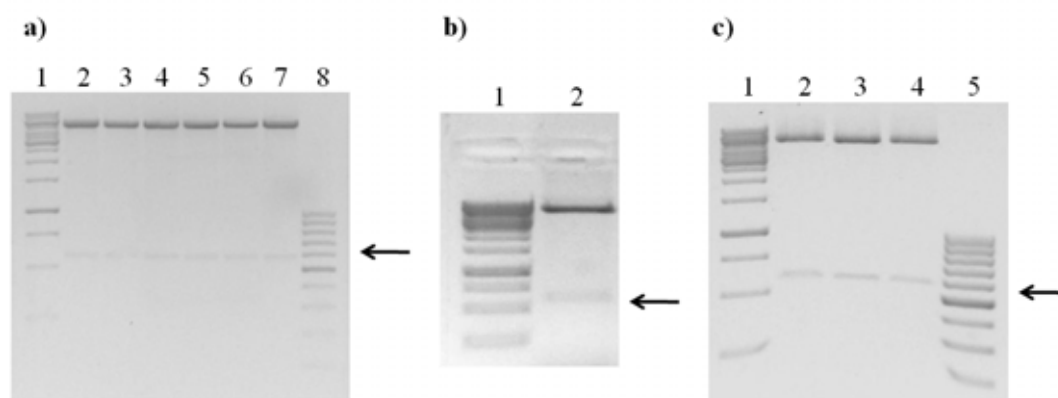


Figura 5. Análise dos produtos de ligação da rgs-CaM nos vetores pET-28a, pET-15b e pGEX-5X-1 por digestão com enzima de restrição. **a)** 1) e 8) Marcadores moleculares (Ladder GeneRuller 1 kb e 100 bp, respectivamente; Fermentas); 2), 3), 4), 5), 6), 7) Plasmídeo pET-28a (5369 bp) contendo o fragmento de interesse (600 bp; seta a direita) – cada número correspondente a um clone recombinante. **b)** 1) Marcador molecular (Ladder GeneRuller 1 kb; Fermentas), 2) Plasmídeo pET-15b (5708 bp) contendo o fragmento de interesse (600 bp; seta a direita). **c:** 1) e 5) Marcadores moleculares (Ladder GeneRuller 1 kb e 100 bp, respectivamente; Fermentas); 2), 3), 4) Plasmídeo pGEX-5X-1 (4900 bp) contendo o fragmento de interesse (600 bp; seta a direita) – cada número corresponde a um clone recombinante. Eletroforese em gel de agarose 1%.

IV.1.2 Indução da expressão das proteínas rgs-CaM e HC:Pro recombinantes em *Escherichia coli*

O fragmento da rgs-CaM clonado no vetor pGEX-5X-1 foi inserido em *E. coli* linhagem pRIL codon plus. A expressão da proteína de fusão GST:rgs-CaM foi então induzida pela adição de 1 mM de IPTG e incubação por 4 horas a 28°C. A proteína de fusão MBP:HC-Pro, por sua vez, foi expressa seguindo protocolo previamente descrito (Maia & Bernardi, 1996). Para analisar a expressão, alíquotas de 1 ml da cultura de bactérias induzida por IPTG foram centrifugadas, lisadas, e as proteínas desnaturadas em tampão de lise para análise em SDS-PAGE. Alíquotas de 1 ml da cultura de bactérias sem indução por IPTG (não induzidas) foram usadas como controle. O resultado obtido está representado na Figura 6.

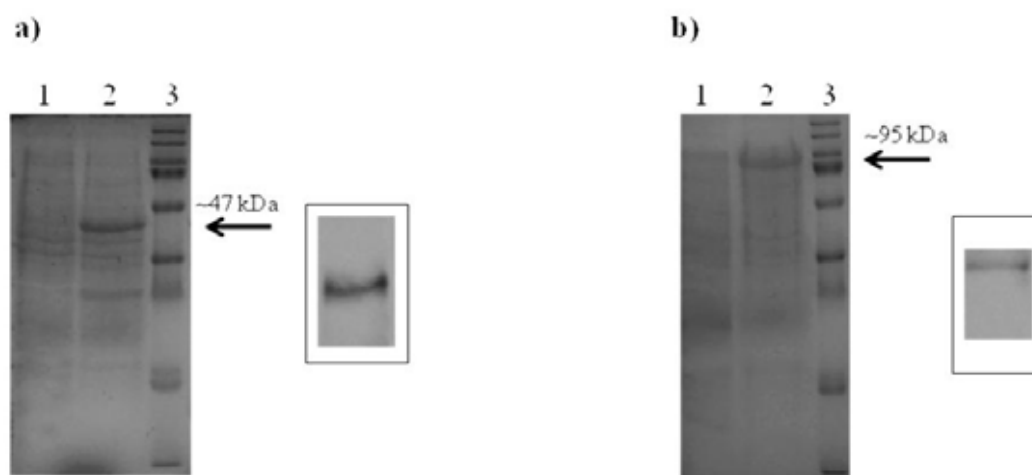


Figura 6. Análise da expressão das proteínas de fusão GST:rgs-CaM e MBP:HC-Pro. a) Indução da expressão da fusão GST:rgs-CaM em pRIL codon plus e b) Indução da expressão da fusão MBP:HC-Pro em BL-21 DE3 Rosetta: 1) Extrato protéico total de células não induzidas; 2) Extrato protéico total de células induzidas com IPTG; 3) Marcador de massa molecular (Fermentas). Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie. A posição da proteína de fusão é indicada por uma seta. A confirmação da expressão das proteínas de fusão por western blot utilizando os anticorpos anti-GST e Anti-MBP está representada do lado direito de cada gel.

Cabe ressaltar que o mesmo sucesso observado na expressão da proteína de fusão GST:rgs-CaM não foi obtido na expressão da proteína rgs-CaM recombinante utilizando os plasmídeos pET-28a e pET-15b. Neste caso, os plasmídeos recombinantes foram inseridos em *E. coli* linhagens BL-21 (DE3), BL-21 DE3 pLysS, BL-21 DE3 Rosetta e pRIL codon plus. Mesmo variando a temperatura (18, 28 e 37°C) e o tempo de indução (2, 4, 16 horas), não foi possível observar a expressão da proteína de fusão rgs-CaM:His (Figura 7). A não expressão foi confirmada por Western blot utilizando um anticorpo monoclonal contra a cauda de Histidina (resultados não apresentados).

Em função destes primeiros resultados, optou-se por se iniciar os testes de interação *in vitro* empregando as proteínas de fusão GST:rgs-CaM e MBP:HC-Pro.

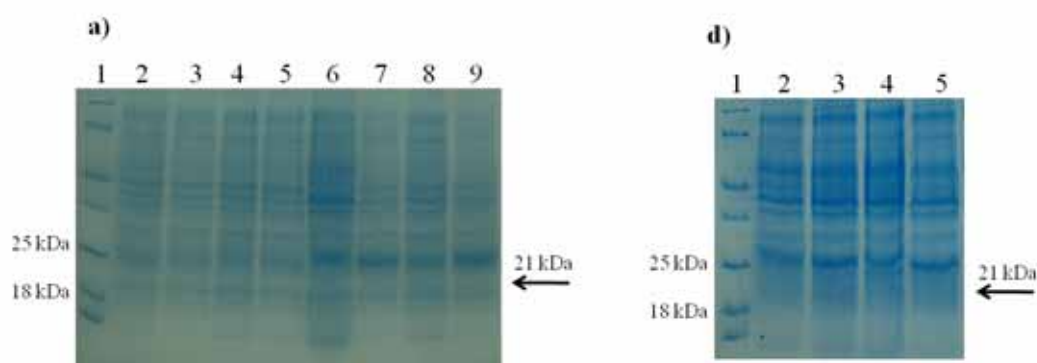


Figura 7. Testes de indução da expressão da proteína de fusão rgs-CaM:His. **a)** expressão usando pET-28a inserido em pRIL codon plus: 1) Marcador de massa molecular (Fermentas); 2) e 4), 6) e 8) – Extrato protéico total de células não induzidas dos clones 1, 2, 3, e 4, respectivamente. 3), 5) 7) e 9) – Extrato protéico total de células induzidas com IPTG dos clones 1, 2, 3 e 4; **d)** expressão usando pET-15b inserido em BL-21 DE3 Rosetta: 1) Marcador de massa molecular (Fermentas); 2) e 4) – Extrato protéico total de células não induzidas dos clones 1 e 2, respectivamente. 3) e 5) – Extrato protéico total de células induzidas com IPTG dos clones 1 e 2. Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie. A posição em que deveria ser visualizada a proteína recombinante está indicada com uma seta à direita de cada gel.

IV.1.3 Testes de solubilidade das proteínas de fusão GST:rgs-CaM e a MBP:HC-Pro

Os testes iniciais de solubilidade das proteínas de fusão demonstraram que as mesmas eram detectadas majoritariamente na fração insolúvel (Figura 8a, linha 4 e Figura 8b, linha 2). Na tentativa de se obter uma maior fração de proteína solúvel para os ensaios de interação, testes de solubilidade das proteínas de fusão em diferentes tampões foram realizados. As proteínas de fusão GST:rgs-CaM e MBP:HC-Pro permaneceram insolúveis em diferentes tampões, exceção feita aos tampões 50 mM Tris-HCl pH 8,0, NaCl 100 mM (Figura 8a) e 20 mM Tris-HCl pH 8,0, KCl 100 mM, MgCl₂ 20 mM, EDTA 250 µM, Tween 0,25% (Figura 8b), nos quais ambas permaneceram parcialmente solúveis. Tal fato viabilizou a posterior utilização nos ensaios de interação das proteínas alvo em suas formas nativas.

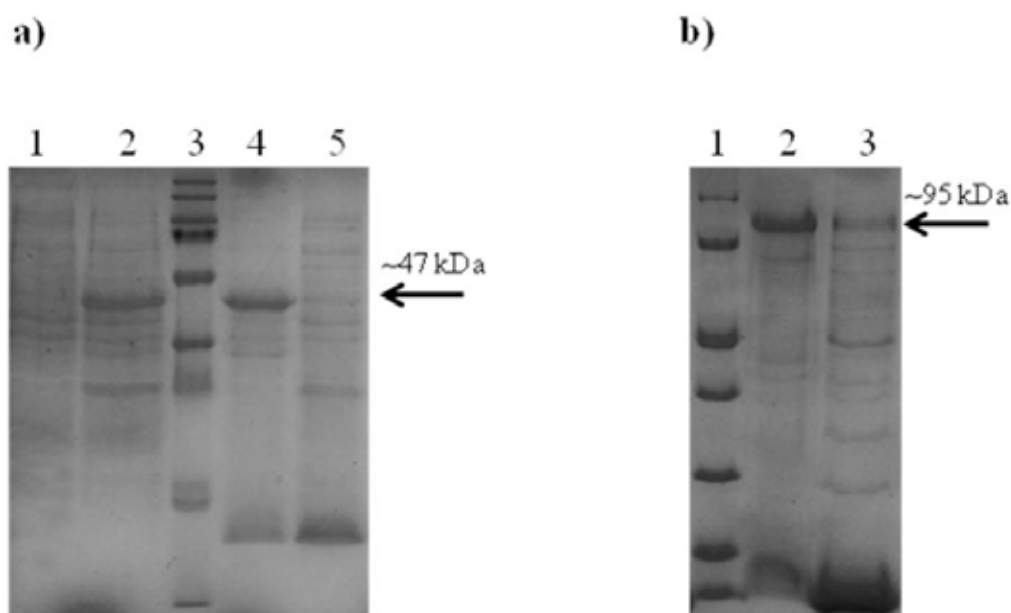


Figura 8. Testes de solubilidade das proteínas de fusão. a) teste de solubilidade da proteína de fusão rgs-CaM:GST: 1) Extrato protéico total de células não induzidas; 2) Extrato protéico total de células induzidas com IPTG; 3) Marcador de massa molecular (Fermentas); 4) fração insolúvel; 5) proteína parcialmente solúvel em 50 mM Tris-HCl pH 8,0, NaCl 100 mM; b) teste de solubilidade da proteína de fusão MBP:HC-Pro: 1) Marcador de massa molecular (Fermentas); 2) fração insolúvel; 3) proteína parcialmente solúvel em 20 mM Tris-HCl pH 8,0, KCl 100 mM, MgCl₂ 20 mM, EDTA 250 µM, Tween 0,25%. Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de comassie. A posição da proteína de fusão é indicada por uma seta à direita.

IV.1.4 Preparo das proteínas de fusão para os ensaios de interação *in vitro*

Com base nos resultados mencionados anteriormente, a proteína de fusão GST:rgs-CaM foi expressa em larga escala e então solubilizada no tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl (Figura 9a). No caso da proteína de fusão MBP:HC-Pro, além de ser expressa em larga escala e solubilizada em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0, KCl 100 mM, MgCl₂ 20 mM, EDTA 250 µM, Tween 0,25%, a proteína recombinante foi submetida a cromatografia de afinidade em resina de amilose para uma purificação prévia da amostra (Figura 9b).

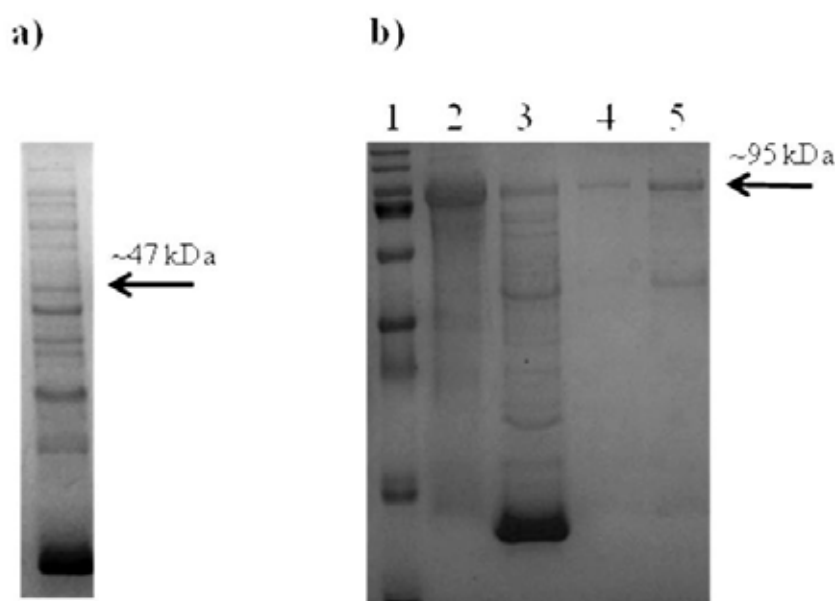


Figura 9. Análise das amostras preparadas para os ensaios de interação. **a)** Extrato protéico total de células induzidas com IPTG contendo a proteína de fusão GST:rgs-CaM solubilizada em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl. **b)** proteína de fusão MBP:HC-Pro expressa em larga escala, solubilizada e purificada: 1) Marcador de massa molecular (Fermentas); 2) fração insolúvel; 3) proteína solubilizada em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0, KCl 100 mM, MgCl₂ 20 mM, EDTA 250 µM, Tween 0,25%; 4) e 5) frações da etapa de purificação em coluna de afinidade. Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie. A posição da proteína de fusão é indicada por uma seta à direita.

IV.1.5 Padronização dos ensaios de interação *in vitro* entre as proteínas de fusão GST:rgs-CaM e a MBP:HC-Pro

Nos primeiros testes de interação empregando as proteínas recombinantes, a proteína de fusão GST:rgs-CaM (ou a proteína controle GST) foi imobilizada na resina de Glutathiona Sepharose e usada como isca. Em seguida a proteína alvo MBP:HC-Pro purificada (ou a proteína controle MBP não fusionada) foi adicionada à resina. Após a incubação, os complexos protéicos que permaneceram ligados foram analisados em gel SDS-PAGE e por western blot empregando os anticorpos anti-GST e anti-MBP. Nestas condições, observou-se uma interação inespecífica da proteína de fusão MBP:HC-Pro (~95 kDa) bem como do controle MBP (~44 kDa) com a resina de glutathiona (Figura 10; linhas 2 e 4). Essa interação inespecífica foi detectada até mesmo quando a coluna foi lavada com tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, NaCl 100 mM com um volume de 50 vezes o volume da resina (Figura 10).

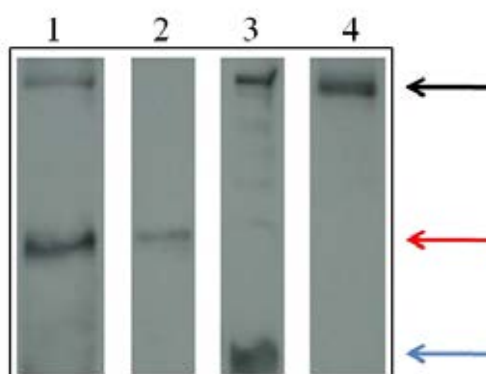


Figura 10. Análise da interação entre as proteínas de fusão GST:rgs-CaM e MBP:HC-Pro utilizando western blot. 1) adição da proteína de fusão MBP:HC-Pro à resina contendo GST:rgs-CaM imobilizada; 2) adição do controle MBP à resina contendo GST:rgs-CaM: imobilizada; 3) adição da MBP:HC-Pro à resina contendo GST imobilizada; 4) adição da proteína de fusão MBP:HC-Pro à resina de Glutathiona Sepharose; As proteínas foram detectadas empregando: 1) e 3) anticorpos monoclonais anti-GST e anti-MBP; 2) e 4) anticorpo monoclonal anti-MBP. As posições das proteínas de interesse estão indicadas por setas à direita: preta (MBP:HC-Pro), vermelha (GST:rgs-CaM ou MBP) e azul (GST).

A fim de eliminar as interações inespecíficas observadas foram adicionados 0,05% e 0,25% de Tween-20, respectivamente, ao tampão de lavagem. A lavagem da coluna foi realizada com um volume de 50 vezes o volume de resina, porém nestas condições nenhuma banda pode ser visualizada (Figura 11). Esse resultado indica todas as proteínas, incluindo a proteína de fusão GST:rgs-CaM e a proteína controle GST que se encontravam imobilizadas na resina de glutathione, foram desprendidas da resina na presença de Tween-20.

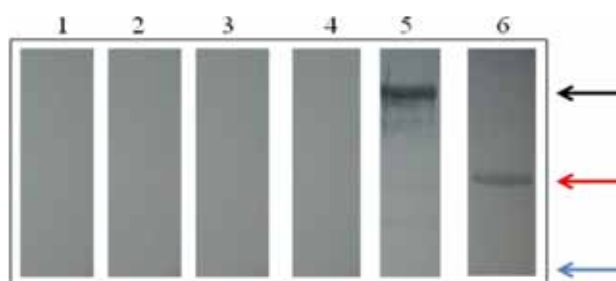


Figura 11. Análise da interação entre as proteínas de fusão GST:rgs-CaM e MBP:HC-Pro utilizando western blot, após lavagem da coluna com tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, NaCl 100 mM, contendo 0,05% Tween 1) adição da proteína de fusão MBP:HC-Pro à resina contendo GST:rgs-CaM imobilizada; 2) adição do controle MBP à resina contendo GST:rgs-CaM: imobilizada; 3) adição da MBP:HC-Pro à resina contendo GST imobilizada; 4) adição da proteína de fusão MBP:HC-Pro à resina Glutathione Sepharose; 5) e 6) proteínas MBP:HC-Pro e GST:rgs-CaM, respectivamente - controle positivo para o western blot. As proteínas foram detectadas empregando: 1) e 3) anticorpos monoclonais anti-GST e anti-MBP; 2), 4) e 5) anticorpo monoclonal anti-MBP; 6) anticorpo monoclonal anti-GST. As posições das proteínas de interesse estão indicadas por setas à direita: preta (MBP:HC-Pro), vermelha (GST:rgs-CaM ou MBP) e azul (GST).

Um segundo teste de interação foi realizado utilizando-se, desta vez, a proteína MBP:HC-Pro imobilizada na resina amilose como isca (ou a MBP), a qual foi incubada em presença da proteína GST:rgs-CaM. Os procedimentos de incubação, a composição do tampão utilizado (50 mM Tris-HCl pH 8,0, NaCl 100 mM), as etapas de lavagem, e a análise da interação, foram realizadas como descrito anteriormente. Os resultados obtidos foram semelhantes aos observados anteriormente, sendo detectada uma

interação inespecífica das proteínas GST:rgs-CaM (ou GST) e a coluna de amilose em todas as condições testadas (Figura 12).

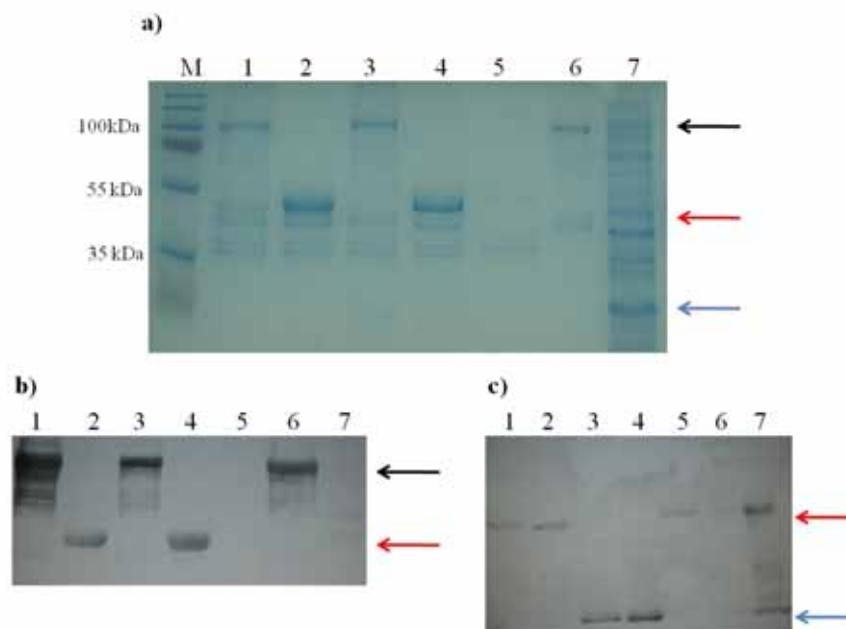


Figura 12. Análise da interação entre as proteínas de fusão GST:rgs-CaM e MBP:HC-Pro utilizando resina de amilose. **a)** teste de interação analisado por SDS-PAGE 12% corado com azul de comassie: M) Marcador de massa molecular (Fermentas); 1) adição da proteína de fusão GST:rgs-CaM à resina contendo MBP:HC-Pro imobilizada; 2) adição da GST:rgs-CaM à resina contendo MBP imobilizada; 3) adição da GST à resina contendo MBP:HC-Pro imobilizada; 4) adição da proteína controle GST à resina contendo a proteína MBP imobilizada; 5) adição da proteína de fusão GST:rgs-CaM à resina de amilose; 6) e 7) proteínas MBP:HC-Pro e GST:rgs-CaM, respectivamente - controle positivo para o western blot; **b)** e **c)** teste de interação analisado por western blot, sendo em **b)** empregado o anticorpo monoclonal anti-MBP e em **c)** o anticorpo monoclonal anti-GST. As condições 1), 2), 3), 4), 5), 6) e 7) de **b)** e **c)** correspondem as condições 1), 2), 3), 4), 5), 6) e 7) do item **a)**. As posições das proteínas são indicadas por setas à direita: preta (MBP:HC-Pro), vermelha (GST:rgs-CaM ou MBP) e azul (GST).

IV.1.6 Novos testes para expressão da proteína rgs-CaM:His

Diante da impossibilidade de uso das proteínas de fusão obtidas anteriormente nos ensaios de *pull down*, optou-se por utilizar a proteína rgs-CaM com cauda de histidinas. Essa estratégia foi adotada já que proteínas fusionadas à cauda de histidinas apresentam menor tendência a formar ligações inespecíficas, com baixa

imunogenicidade, além da cauda de histidinas ser de pequeno tamanho (0,84 kDa) (Chaga, 2001; Manjasetty *et al.*, 2008). Na maioria dos casos, devido ao seu pequeno tamanho, não interfere com as atividades bioquímicas da proteína fusionada (Sharma *et al.*, 1991; Passafiume *et al.*, 1998), ou com a maioria das aplicações posteriores (Chaga, 2001), aspectos que facilitariam a execução dos ensaios de interação *in vitro*. Entretanto, frente aos problemas encontrados inicialmente na expressão da proteína rgs-CaM fusionada a cauda de seis histidinas em sua porção N-terminal (Figura 7), decidiu-se por alterar a configuração da construção fusionando, desta vez, a cauda de histidina na porção C-terminal da rgs-CaM (rgs-CaM:His).

Nos testes de expressão realizados, a única cepa bacteriana que expressou a proteína rgs-CaM:His foi a BL21-DE3 pRIL codon plus (Figura 13a). Para confirmar a expressão da proteína de fusão foi realizado um western blot com anticorpo monoclonal anti-cauda de histidinas (Figura 13b), o qual confirmou a expressão da proteína rgs-CaM:His.

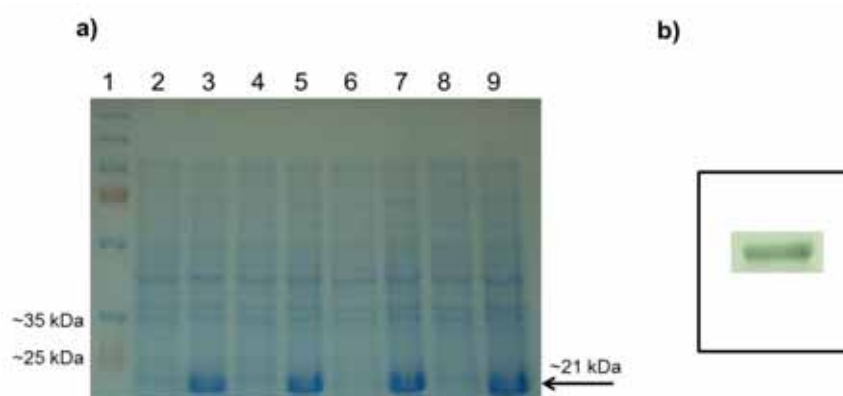


Figura 13. Indução da expressão da proteína rgs-CaM:His em BL-21-DE3 pRIL codon plus. **a):** 1) Marcador de massa molecular (PageRuler™ 10 – 250 kDa; Fermentas); 2), 4), 6) e 8) Extrato protéico total de células não induzidas dos clones 1, 2, 3, e 4, respectivamente. 3), 5) 7) e 9) Extrato protéico total de células induzidas com IPTG dos clones 1, 2, 3 e 4. Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie. A posição da proteína de fusão é indicada por uma seta. **b)** confirmação da expressão da proteína rgs-CaM:His por western blot utilizando o anticorpo monoclonal Anti-His.

IV.1.7 Solubilização da proteína de fusão rgs-CaM:His em tampão não desnaturante

Testes de solubilidade demonstraram que a proteína rgs-CaM contendo a cauda de histidinas em C-terminal encontrava-se insolúvel após expressão em bactéria. Sendo assim, testes de solubilização empregando diferentes tampões não desnaturantes foram realizados, mas estes não foram efetivos para tornar a proteína rgs-CaM:His solúvel. Em todas as condições testadas, a proteína foi sempre observada na fração insolúvel (Figura 14; linhas 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 18 e 20).

Diante do exposto, a alternativa adotada foi a de desnaturar a proteína rgs-CaM:His recombinante na presença de uréia e SDS, respectivamente, para posterior purificação em coluna de afinidade (item III.4.3.3).

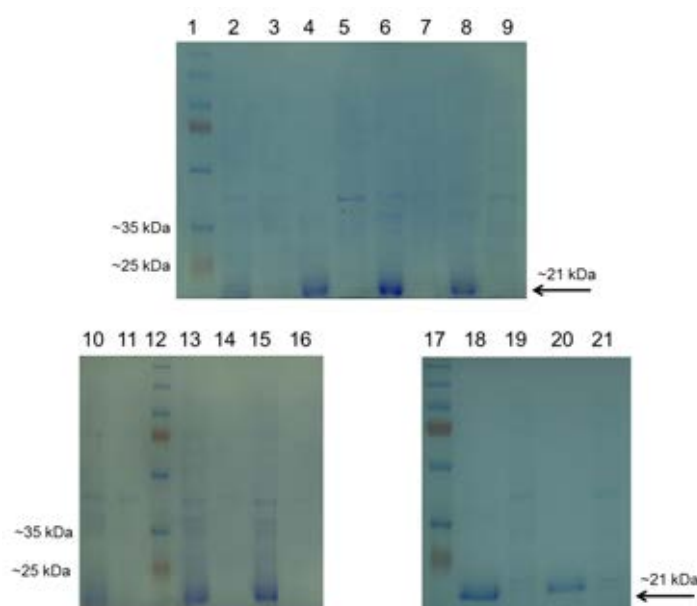


Figura 14. Testes de solubilidade da proteína rgs-CaM:His; 1), 12) e 17) Marcador de massa molecular (PageRuler™ 10 – 250 kDa; Fermentas); 2), 4), 6), 8), 10), 13), 15), 18) e 20) fração insolúvel proveniente dos testes com os tampões: a - Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM; b - Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, Tween 0,25%; c - Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM; d - Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 300 mM ; e - Tris-HCl 50 mM pH 7.5, KCl 100 mM, MgCl₂ 20 mM; f - Tris-HCl 50 mM pH 7.5, KCl 300mM, MgCl₂ 20mM; g - Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 300 mM, MgCl₂ 20 mM; h - HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 100 mM e i - HEPES 20 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, respectivamente; 3), 5), 7), 9), 11), 14), 16), 19) e 21) Fração solúvel proveniente dos testes com os tampões: a, b, c, d, e, f, g, h, e i, respectivamente. A posição da proteína de interesse está indicada por uma seta à direita.

IV.1.8 Purificação da proteína rgs-CaM:His por cromatografia de afinidade em HPLC

IV.1.8.1 Purificação da proteína rgs-CaM:His desnaturada com uréia

Uma vez que a proteína recombinante apresenta uma cauda de histidinas, a primeira etapa de purificação consistiu de uma cromatografia de afinidade em resina de níquel. Para tal, as amostras foram previamente desnaturadas com uréia 7 M como descrito no item III.4.3.3 e submetidas ao processo de purificação por afinidade. A análise das frações coletadas após a aplicação do gradiente de imidazol na coluna de níquel (Figura 15) evidenciou a presença de alguns peptídeos adicionais nas primeiras frações (seta vermelha na Figura 15). Estes podem corresponder a produtos de degradação da proteína recombinante, ou a proteínas de *E. coli* que foram co-purificadas. Embora a presença destes contaminantes nas demais frações não tenha sido detectada no gel (Figura 15), após a concentração das frações correspondentes, os mesmos contaminantes foram observados. A fim de eliminar estes contaminantes, a proteína passou por outra etapa de purificação utilizando troca iônica (item III.4.3.4).

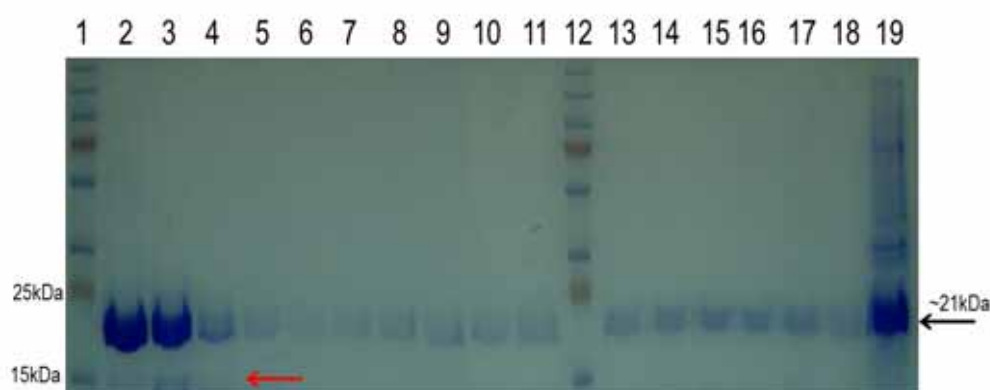


Figura 15. Purificação da proteína rgs-CaM:His desnaturada com uréia por cromatografia de afinidade; **1) e 12)** Marcador de massa molecular (PageRuler™ 10 – 250 kDa; Fermentas); **2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9, 10), 11), 13), 14), 15), 16), 17) e 18)** frações provenientes da eluição da proteína recombinante usando gradiente de Imidazol (aumento de 5 mM a cada ml) em tampão B. As amostras verificadas em gel correspondem às concentrações de 15 mM, 30 mM, 45 mM, 60 mM, 75 mM, 90 mM, 105 mM, 120 mM, 135 mM, 150 mM, 165 mM, 180 mM, 195 mM, 210 mM, 225 mM e 240 mM, respectivamente; **19)** *flow-through* após passagem da amostra pela resina; a seta vermelha indica a presença das proteínas contaminantes remanescentes da purificação. A posição da proteína de interesse está indicada por uma seta à direita. Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Comassie.

IV.1.8.2 Purificação da proteína rgs-CaM:His tratada com SDS e MPD

Além do uso de uréia, um segundo protocolo de desnaturação empregando diferentes concentrações de SDS (0,1%, 1% e 2%) e renaturação em presença de MPD 2 M foi testado. A purificação da proteína rgs-CaM:His tratada com SDS e MPD foi realizada em coluna de afinidade contendo níquel como descrito anteriormente. Após análise em gel, a presença de contaminantes após a eluição da proteína alvo da coluna também pode ser evidenciada (Figura 16; linhas 6, 13 e 19). Objetivando eliminar tais contaminantes, um passo adicional de purificação foi adotado usando cromatografia de exclusão por tamanho (Item III.4.3.5). Nesse caso, optou-se por usar a proteína tratada com SDS 1% (Figura 16; linhas 8-13).

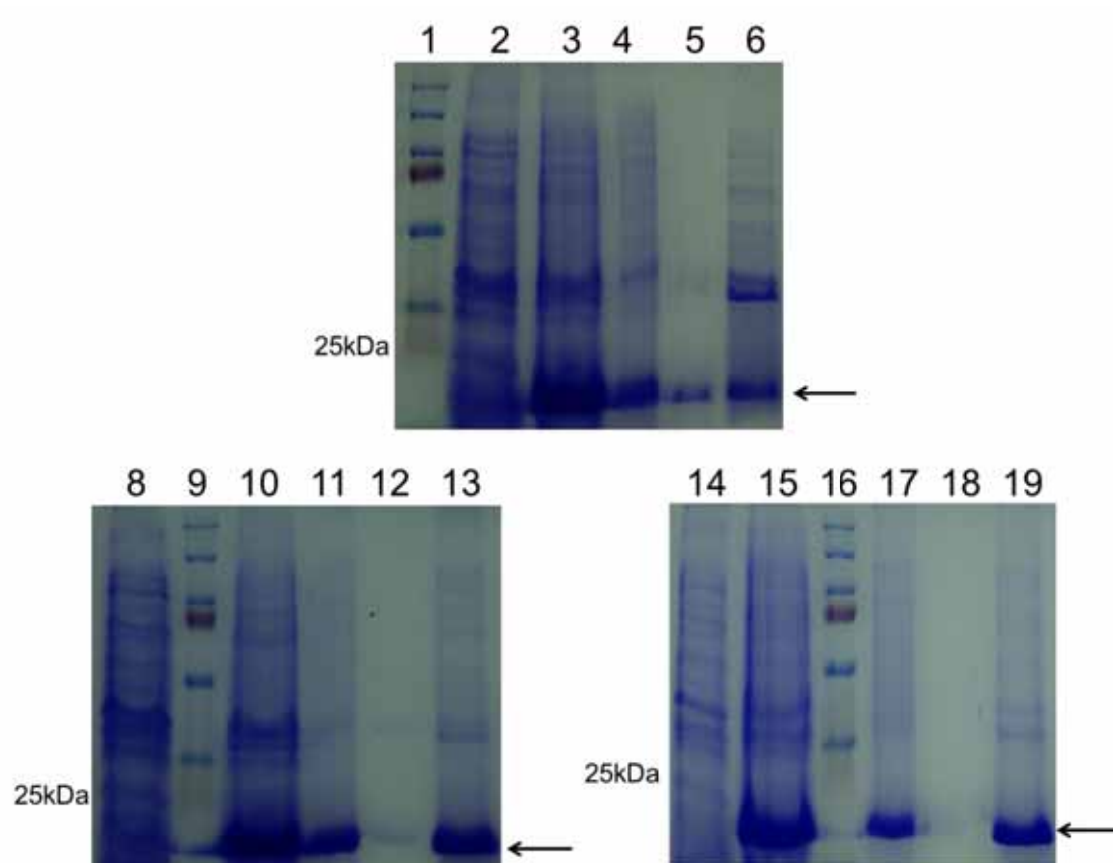


Figura 16. Solubilização com SDS e purificação da proteína rgs-CaM:His usando cromatografia de afinidade. 1)-6), 8)-13), 14)-19) - testes de solubilização usando 3 concentrações de SDS: 0,1%, 1% e 2%, respectivamente. 1), 9), 16) Marcador de massa molecular (PageRuler™ 10 – 250 kDa; Fermentas); 2), 8), 14) extrato protéico total de células não induzidas; 3), 10), 15) Extrato protéico total de células induzidas com IPTG; 4), 11), 17) *flow-through* após passagem da amostra pela coluna de níquel; 5); 12); 18) última etapa da lavagem da coluna; 6), 13), 19) proteína rgs-CaM:His após eluição. Gel SDS-PAGE 12% corado com azul de Comassie. A posição da proteína alvo está indicada por uma seta.

IV.1.8.3 Obtenção da proteína rgs:CaM:His pura empregando troca iônica ou cromatografia de exclusão por tamanho em HPLC

Para eliminar as proteínas contaminantes detectadas após a purificação da proteína recombinante rgs-CaM:His em resina de níquel (etapa anterior), procedeu-se uma cromatografia de troca iônica, para amostras tratadas com uréia, e cromatografia de

exclusão por tamanho, para amostras tratadas com SDS 1% e MPD 2 M. As frações obtidas após purificação foram agrupadas (no caso da proteína desnaturada com uréia submetidas à diálise) e em seguida analisadas em gel SDS-PAGE 15%. Como pode ser constatado na Figura 17, ambos os processos de purificação adotados foram eficientes em eliminar os contaminantes co-purificados na etapa de purificação por afinidade. Portanto, somente após essa segunda etapa de purificação foi possível obter a proteína recombinante rgs-CaM:His pura (Figura 17a e 17b; linhas 2 e 6, respectivamente).

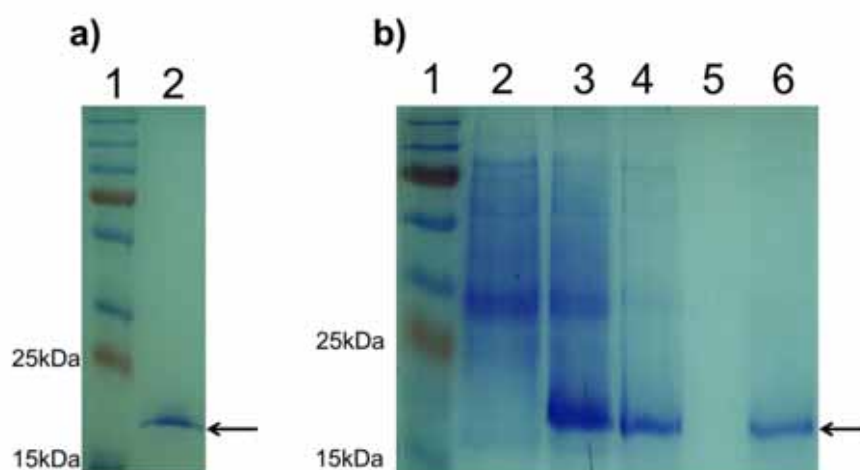


Figura 17. Purificação da proteína rgs-CaM:His. **a)** purificação das amostras protéicas tratadas com uréia empregando troca iônica: 1) Marcador de massa molecular (PageRuler™ 10 – 250 kDa; Fermentas); 2) rgs-CaM:His após purificação por troca iônica e diálise. **b)** purificação empregando cromatografia de exclusão por tamanho das amostras tratadas com SDS 1% e MPD 2 M: 1) Marcador de peso molecular; 2) extrato protéico total de células não induzidas; 3), extrato protéico total de células induzidas com IPTG; 4) amostra previamente purificada por cromatografia por afinidade; 5) última etapa de lavagem da coluna de Níquel; 6) rgs-CaM:His após cromatografia de exclusão. Gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Comassie. A posição da proteína rgs-CaM:His está indicada por uma seta.

IV.1.9 Análise estrutural da proteína

IV. 1.9.1 Análise de estrutura secundária da rgs-CaM por dicroísmo circular

A proteína rgs-CaM:His desnaturada nas duas condições mencionadas e devidamente purificada foi submetida a análise por dicroísmo circular para determinar a sua integridade estrutural. O espectro coletado para a proteína desnaturada com uréia diferiu dos espectros tipicamente observados para uma proteína estruturada, evidenciando que a proteína não readquiriu sua conformação após a diálise (Figura 18a). No caso da proteína desnaturada com SDS 1% e renaturada em presença de MPD 2 M, observou-se um espectro típico de proteína estruturada (Figura 18b), com picos negativos a 209 e 222 nm, apresentando-se como uma proteína rica em hélices alfa, sendo esta uma característica de proteínas do tipo calmodulina.

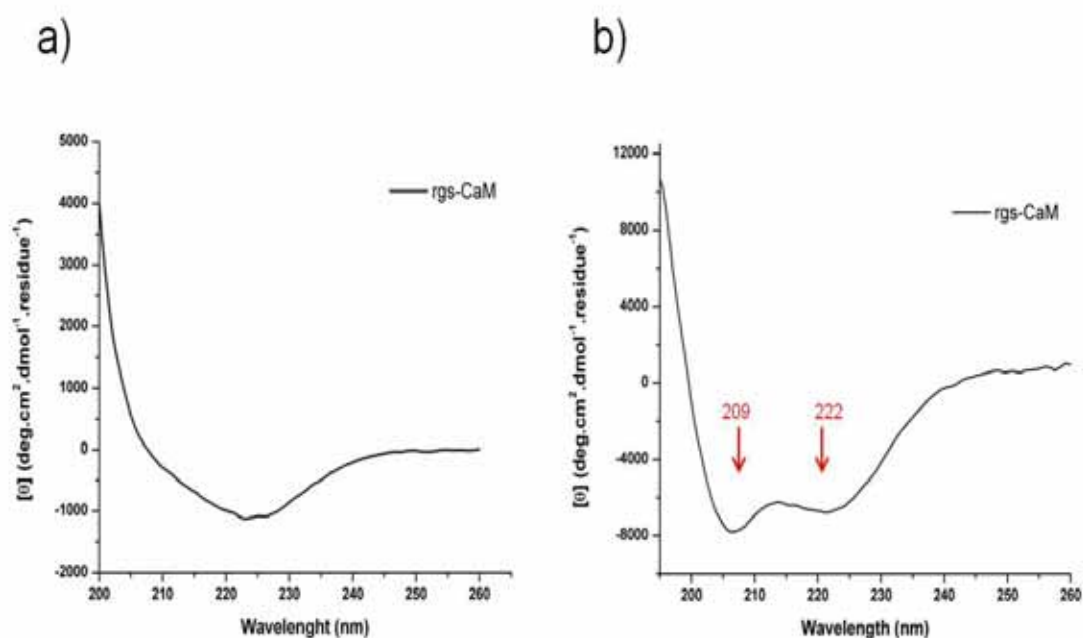


Figura 18. Espectro de dicroísmo circular da proteína rgs-CaM:His. **a)** espectro da rgs-CaM:His desnaturada com uréia 7M e renaturada através de diálise. **b)** espectro da rgs-CaM:His desnaturada por tratamento com SDS 1% e renaturada em presença de MPD 2 M. Os picos negativos a 209 e 222 nm estão indicados por setas vermelhas.

Além da confirmação da integridade estrutural, a proteína rgs-CaM:His foi submetida a análise por dicroísmo circular em três condições distintas, a primeira em presença de 5 mM de CaCl_2 , a segunda em presença de 5 mM do agente quelante EGTA, e a última condição na ausência destes (Figura 19a). Reforçando os resultados anteriores, os espectros coletados são típicos de uma proteína estruturada e rica em hélice alfa. Mudanças sutis no espectro são observadas quando a proteína encontra-se na presença de cálcio ou na ausência deste. Essas mesmas condições foram repetidas e a proteína foi analisada usando gel PAGE 15% em condição semi-desnaturante (Figura 19b). Observa-se que a proteína rgs-CaM:His apresenta uma maior mobilidade quando na presença do Ca^{2+} , provavelmente devido a uma mudança estrutural da proteína, corroborando assim os dados obtidos por dicroísmo circular (Figura 19a).

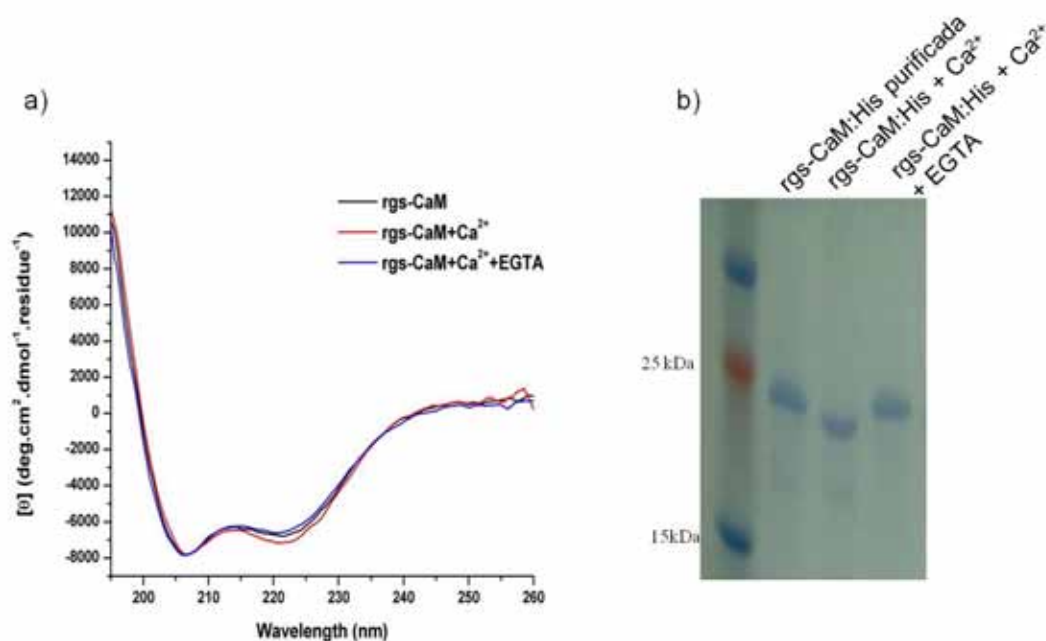


Figura 19. Perfis da proteína rgs-CaM:His na presença ou ausência de íon cálcio.

a) Espectro de dicroísmo circular da proteína rgs-CaM:His com adição de 5 mM CaCl_2 ou adição do agente quelante EGTA. **b)** amostras da proteína rgs-CaM:His tratadas com CaCl_2 ou EGTA foram submetidas a gel PAGE 15% em condição semi-desnaturante corado com azul de Comassie. Um aumento da mobilidade da proteína em presença de Ca^{2+} pode ser observado.

A deconvolução das curvas de CD utilizando o algoritmo CDSSTR-Set (Tabela 3), mostra uma proteína com 38% de hélice alfa sendo que na presença do íon cálcio este valor sobe para 40%. A adição do agente quelante EGTA em amostras previamente tratadas com CaCl_2 , ocasiona uma redução para 37% (ver Tabela 3).

Tabela 3 – Deconvolução das curvas de CD utilizando o algoritmo CDSSTR-Set

Proteínas testadas	Hélice alfa	Folhas betas	Turns	Elementos desordenados
rgs-CaM	38,0%	21,0%	13,0%	28,0%
rgs-CaM + Ca^{2+}	40,0%	20,0%	13,0%	27,0%
rgs-CaM + Ca^{2+} EGTA	37,0%	20,0%	15,0%	28,0%

IV. 1.9.2 Alinhamento da sequencia de aminoácidos da rgs-CaM com sequencias de calmodulinas estruturalmente homólogas

Análises de bioinformática realizadas no servidor on line HHpred (<http://toolkit.lmb.uni-muenchen.de/hhpred>) (Söding *et al.*, 2005) revelaram que a rgs-CaM possui homologia estrutural com as estruturas cristalográficas de calmodulinas de *Kluyveromyces lactis* (PDB ID 4DS7), *Paramecium tetraurelia* (PDB ID 1EXR) e humana (PDB ID 3OX6). As três estruturas cristalográficas mostram a presença de dois domínios globulares ligados por uma longa hélice alfa. Em cada domínio globular há duas *EF-hands*, região de ligação com o íon Ca^{2+} , sendo estes formados por três resíduos de ácido aspártico e um de ácido glutâmico, na disposição DXDXDXXXXXE (Rao *et al.*, 1992; Wilson & Brunger, 2000) (Figura 20). Ocasionalmente, algum resíduo de ácido aspártico pode ser substituído por um de asparagina sem impacto algum na coordenação do Ca^{2+} , pois ambos conservam na extremidade de sua cadeia lateral um átomo de oxigênio (OD1) que coordena esse íon.

O alinhamento da sequência primária da rgs-CaM com a sequência primária dessas outras três proteínas, mostra que na rgs-CaM apenas dois desses sítios, sítios A e D (localizados na porção N e C-terminal, respectivamente) estão plenamente conservados (Figura 20). Já o sítio B da rgs-Ca_M, possui uma mutação do resíduo de ácido glutâmico por um de ácido aspártico enquanto que o sítio C não apresenta conservação de nenhum dos resíduos que compõe o sítio de ligação ao Ca²⁺. Essas mutações observadas pelo alinhamento da sequência primária se refletem na capacidade da rgs-CaM de ligar Ca²⁺.

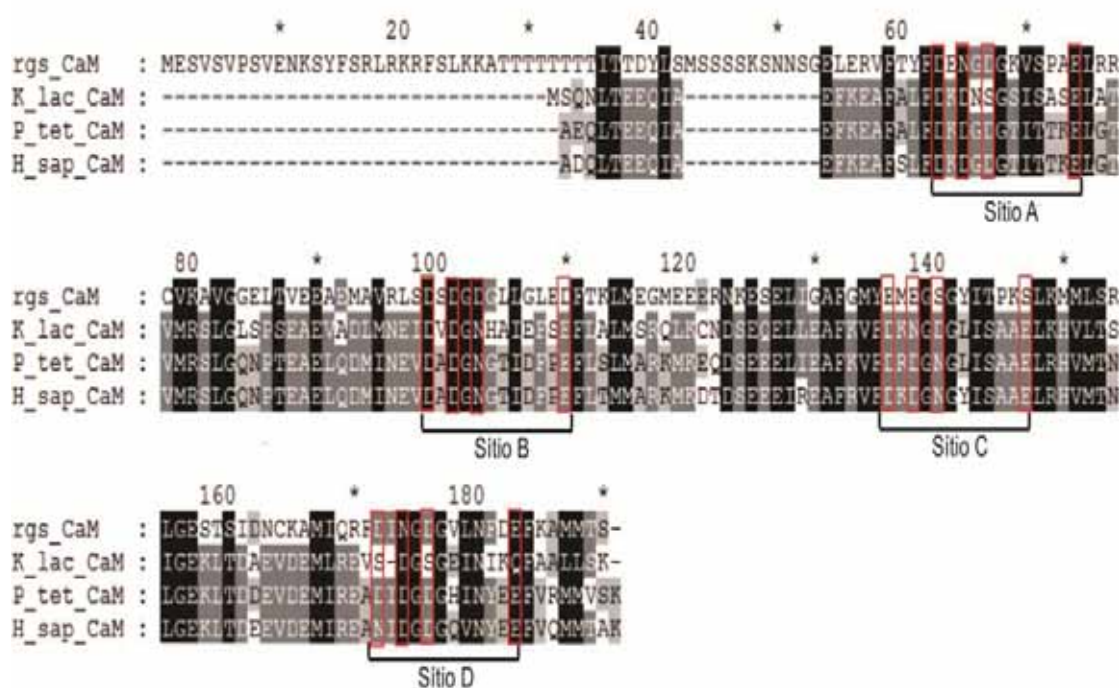


Figura 20: Alinhamento da sequência primária de aminoácidos da rgs-CaM com sequências de calmodulinas que apresentam homologia estrutural com ela segundo o servidor on line HHpred (<http://toolkit.lmb.uni-muenchen.de/hhpred>) (Söding *et al.*, 2005). K_lac_CaM: Calmodulina de *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1140 (PDB ID 4DS7); P_tet_CaM: Calmodulina de *Paramecium tetraurelia* (PDB ID 1EXR); H_sap_CaM: Calmodulina humana (PDB ID 3OX6).

IV. 1.9.3 Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Os dados de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram coletados automaticamente e salvos pelo software Origin (Microcal, Estados Unidos). A correção dos calores de injeção e de diluição dos íons cálcio foram corrigidos pela subtração da linha de base (branco) anteriormente à análise.

A análise dos dados de ITC foi realizada através dos softwares NITPIC (Keller et al., 2012) e Sedphat (Houtman et al., 2007) e não pelo software Origin (OriginLab, Northampton, USA), pois os primeiros possibilitam um melhor ajuste dos dados devido aos modelos estatísticos utilizados. O software Origin seria mais adequado para termogramas que apresentam linhas de base com pouco ruído, concomitantemente ao calor total por injeção muito grande ($>50 \mu\text{J}$) (Keller et al., 2012), condições que não foram encontradas em nossos resultados. Um termograma representativo das titulações é apresentado na Figura 21. A razão molar de íons cálcio/calmodulina foi de 10, que é consistente com os resultados relatados por Gilli e colaboradores (1998).

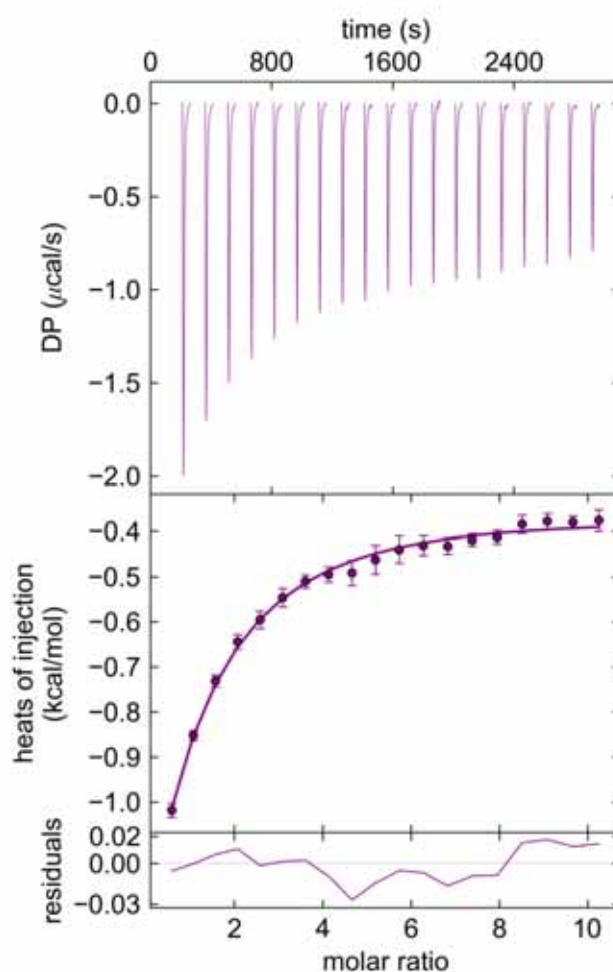


Figura 21. Termograma (painel superior) representativo da titulação íons cálcio (20 mM) em rgs-CaM (200 μM) e ajuste dos dados da titulação (painel inferior).

A análise do termograma mostra uma proteína com baixa afinidade aos íons cálcio. O ajuste dos dados indicou que a rgs-CaM apresenta 3 sítios de ligação ao cálcio, uma vez que esta condição apresentou melhor ajuste (menor valor de RMSD) dos dados quando comparado ao ajuste para 4 sítios (Tabela 4), sendo que um destes 3 sítios apresenta uma afinidade muito baixa a esse íon. Esta análise corrobora os resultados obtidos no alinhamento de aminoácidos (Figura 20), no qual 2 sítios de ligação ao Ca^{2+} conservados foram detectados, enquanto que os outros dois sítios observados

apresentam, respectivamente, uma mutação (sítio B) ou a não conservação dos resíduos que coordenam a ligação ao Ca^{2+} (sítio C). Assim, pode-se inferir que: i) o sítio C não está presente na rgs-CaM; ii) o sítio de menor afinidade ao Ca^{2+} é o sítio B e; iii) os sítios conservados A e D são os sítios que apresentam maior afinidade ao Ca^{2+} .

Tabela 4. Ajuste dos dados de calorimetria de titulação isotérmica pelos softwares Nitpic e Sedphat utilizando-se modelos de ligação de 3 ou 4 sítios.

	3 Sítios	4 Sítios
RMSD*	163.8	200.3
K_1 (M^{-1})	2.34×10^3	4.06×10^3
ΔH_1 (cal/mol)	-3650	-2549
ΔS_1 (cal/mol/deg)	3.17	7.96
K_2 (M^{-1})	101	444
ΔH_2 (cal/mol)	-6174	-3891
ΔS_2 (cal/mol/deg)	-11.5	-0.935
K_3 (M^{-1})	1.84×10^3	575
ΔH_3 (cal/mol)	-2385	-842.6
ΔS_3 (cal/mol/deg)	6.94	9.80
K_4 (M^{-1})		380
ΔH_4 (cal/mol)		-7022
ΔS_4 (cal/mol/deg)		-11.7

RMSD: root mean square deviation.

IV. 1.9.4 Modelo teórico da rgs-CaM

O modelo teórico inicial da rgs-CaM (Figura 22) confirma a sua estrutura terciária que possui, do mesmo modo das suas homólogas, dois domínios globulares, contendo as *EF-hands*, ligados por uma longa hélice alfa. Esse modelo inicial também mostra a localização espacial dos três sítios de ligação ao Ca^{2+} .

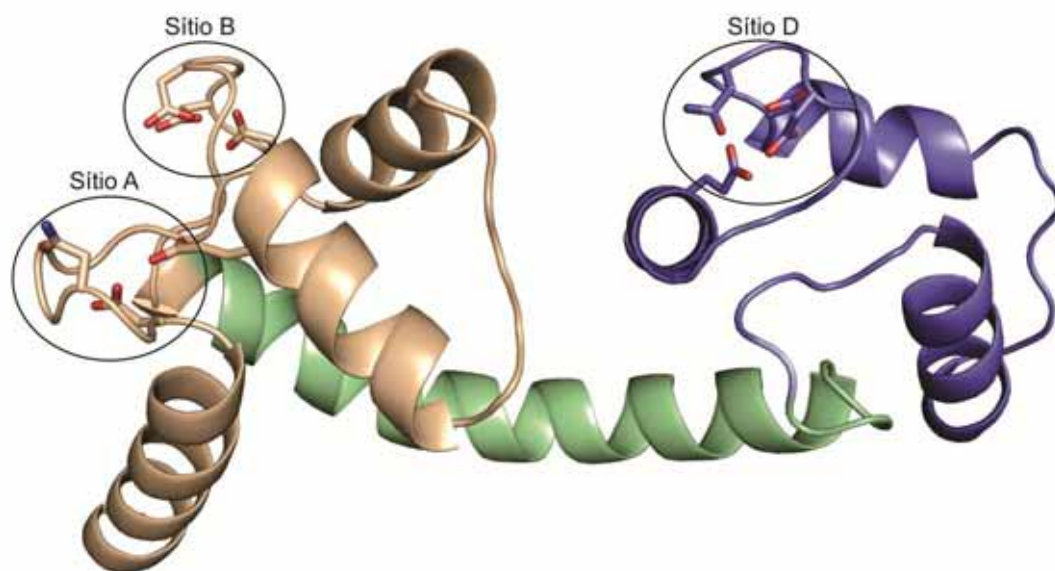


Figura 22: Representação em *cartoon* do modelo teórico inicial da rgs-CaM formada por dois domínios globulares (em azul e marrom claro), contendo as *EF-hands*, ligados por uma longa hélice alfa (em verde). Os três sítios de ligação ao Ca^{2+} conservados estão destacados.

IV.2 Identificação de proteínas que se associam à proteína rgs-CaM

IV.2.1 Confirmação de infecção viral da planta *Nicotiana tabacum*

De posse da proteína rgs-CaM:His estruturada, deu-se início aos ensaios de infecção viral das plantas de tabaco selvagem visando os ensaios de *pull down* objetivando identificar proteínas da hospedeira capazes de se associar à proteína rgs-CaM.

A infecção viral nas plantas inoculadas foi confirmada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para o PepYMV, resultando em um fragmento de 960 bp. A presença do vírus é observada em 6 das 9 plantas inoculadas (Figura 23; linhas 12 a

20). Por outro lado, a amplificação do fragmento não é visualizada nas plantas inoculadas com tampão e abrasivo (MOCK; linhas 3 a 11). Os extratos protéicos derivados de tais plantas foram usados nos ensaios de *pull down*.

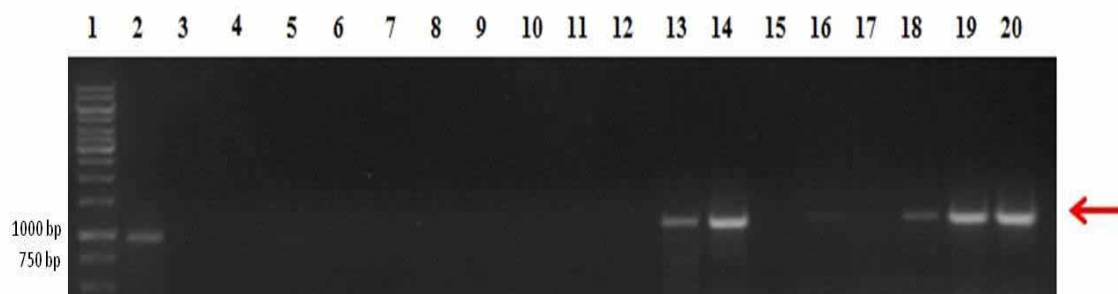


Figura 23: Verificação da presença do PepYMV em plantas de tabaco inoculadas. 1- Marcador (Ladder GeneRuller 1kb; Fermentas); 2- Controle positivo; 3 a 11 – plantas submetidas ao tratamento MOCK; 12 a 20– plantas inoculadas com PepYMV. A posição do fragmento que confirma a presença do vírus está indicada pela seta vermelha à direita. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

IV.2.2 Ensaios *in vitro* de interação entre a rgs-CaM e proteínas de *Nicotiana tabacum*

Extratos protéicos totais de tabaco inoculados ou não foram obtidos e usados nos ensaios de *pull down* empregando a proteína rgs-CaM:His imobilizada em resina de cobalto como isca. Os resultados preliminares revelaram a presença de duas proteínas de tabaco interagentes com a rgs-CaM (isca), nas condições com ou sem a presença do vírus (Figura 24 linhas 2, 3 e 4; posição indicada por uma seta vermelha). Estas proteínas não são encontradas nos dois controles empregados (Figura 24: linhas 5 a 8). O primeiro deles corresponde à passagem do extrato total em resina sem a proteína isca imobilizada, indicando que as duas proteínas candidatas não se ligam inespecificamente à resina (Figura 24 – linhas 5 e 6). O segundo controle corresponde a passagem pela resina da proteína rgs-CaM:His purificada. Neste caso, a presença de bandas correspondentes às duas proteínas candidatas não é observada (Figura 24 – linhas 7 e 8),

indicando que as mesmas não são remanescentes da bactéria (advindas de co-purificação com a rgs-CaM). Com base nestes resultados é possível inferir que as duas proteínas ligantes derivam da planta hospedeira sendo capazes de interagir especificamente com a rgs-CaM. Cabe ressaltar que a presença de outras bandas no ensaio de interação entre a rgs-CaM e o extrato proteico de tabaco foi observada, porém essas mesmas também se encontram presentes nos controles, podendo ser resultado de interações inespecíficas.

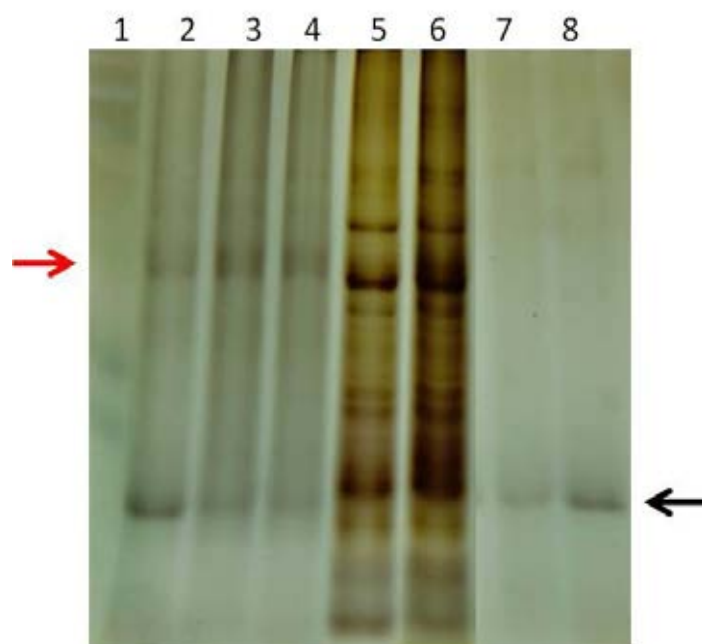


Figura 24. Ensaio de *pull down* empregando a rgs-CaM:His e extratos proteicos totais de tabaco inoculados ou não pelo PepYMV. 1 -Marcador de massa molecular; 2 -Perfil das proteínas eluídas do *pull down* usando rgs-CaM:His e extrato MOCK; 3 e 4 -Perfil das proteínas eluídas do *pull down* usando rgs-CaM:His e extrato de planta infectada; 5 -Perfil das proteínas eluídas do *pull down* usando extrato MOCK em resina sem a rgs-CaM:His; 6 -Perfil das proteínas eluídas do *pull down* usando extrato de planta infectada em resina sem a rgs-CaM:His; 7 e 8 - Amostras usando rgs-CaM:His purificada. A seta vermelha indica a posição das proteínas que apresentaram possível interação com a rgs-CaM:His. A seta preta indica a posição da proteína rgs-CaM:His. Gel SDS-PAGE 15% submetido à coloração por prata.

IV.3 Análise de interação da rgs-CaM com a proteína viral HC-Pro por BiFC

A interação das proteínas rgs-CaM e HC-Pro foi testada *in vivo* empregando a técnica de BiFC. Para tal, diferentes construções fusionando a rgs-CaM e a HC-Pro com a proteína YFP foram obtidas, bombardeadas em células de epiderme de cebola e posteriormente analisadas em microscopia confocal. Os resultados obtidos não evidenciaram a existência de interação entre as proteínas investigadas nas condições testadas (Figura 25). Embora na Figura 25 esteja representado o resultado obtido usando a combinação YN-HC-Pro e rgs-CaM-YC, outras combinações foram testadas, mas em nenhum caso foi evidenciada a interação. A única fluorescência observada (painel a) corresponde à interação entre a HC-Pro e a proteína PAE1 investigada previamente por Dielen e colaboradores (2011).

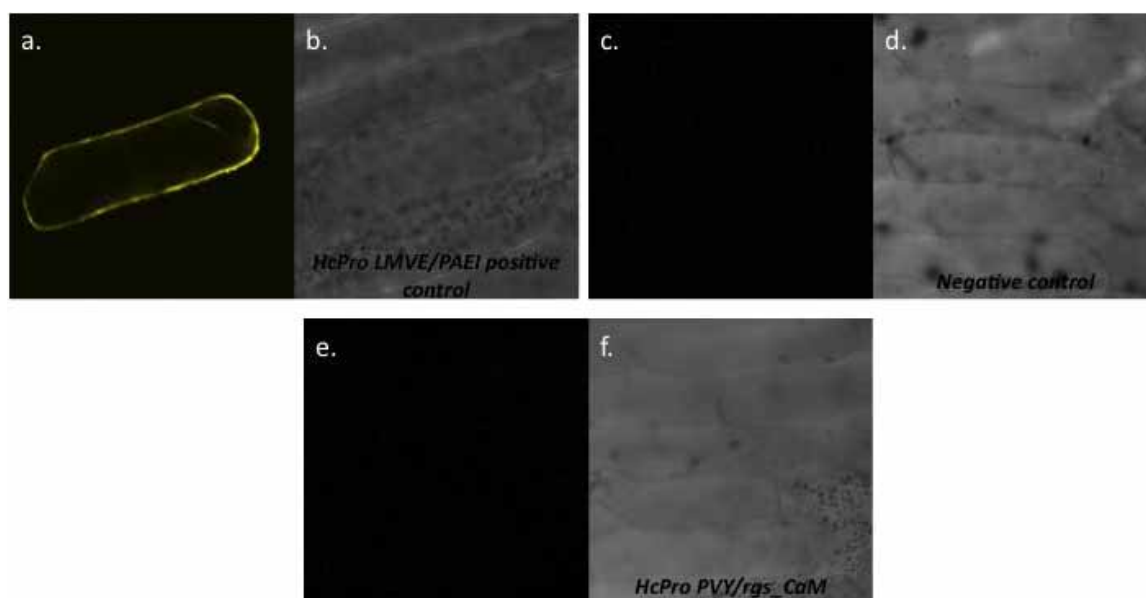


Figura 25. Ensaios de BiFC para demonstrar a interação entre a HC-Pro e a rgs-CaM *in vivo*. (a) Controle positivo de interação usando a YN-HC-Pro e a proteína PAE1-YC (Dielen *et al.*, 2011); (c) Controle negativo (YN-HC-Pro sozinha); (e) Teste de interação entre a YN-HC-Pro com a rgs-CaM-YC. (a, c, e) imagens obtidas utilizando o filtro para a fluorescência amarela – YFP; (b, d, f) imagens de campo claro mostrando as células analisadas. Todas as imagens foram obtidas em microscópio confocal (Leica TCS SP2) com excitação de 514 nm e emissão na faixa de 549 a 602 nm.

IV.4 Análise funcional da rgs-CaM

Visando estudos funcionais, o gene que codifica a rgs-CaM foi silenciado e superexpresso em plantas de tabaco.

IV.4.1 Amplificação da região codificadora e da região 5'-UTR da rgs-CaM por RT-PCR

A região 5'-UTR bem como a região codificadora (ORF) da rgs-CaM foram amplificadas por RT-PCR visando a construção dos cassetes de silenciamento e superexpressão, respectivamente. Após a amplificação, os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, e os fragmentos com o tamanho esperado foram purificados (Figura 26).

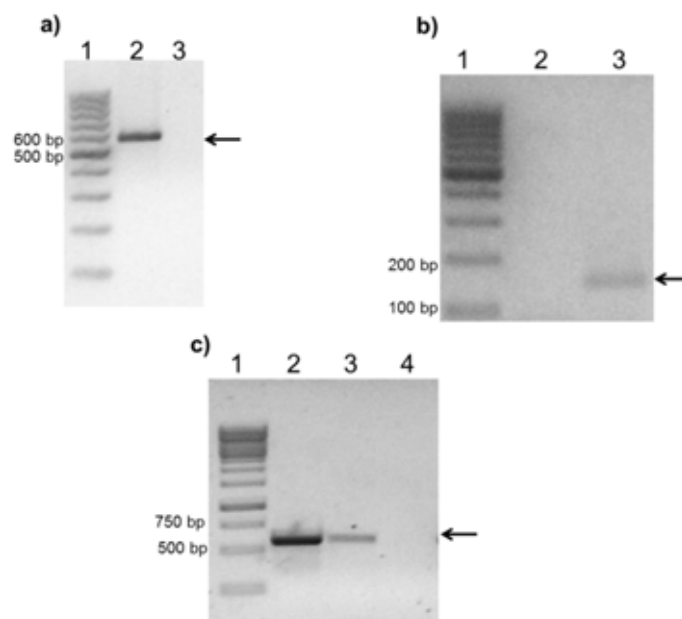


Figura 26. Produtos de amplificação obtidos para posterior inserção nos vetores pK7WG2,0 (a), pk7GWIWG2(I) (b) e pBI121 (c). a): 1) Marcador (Ladder GeneRuller 100bp; Fermentas); 2) fragmento correspondente à ORF da rgs-CaM (600 bp); 3) controle negativo de amplificação. b): 1) Marcador; 2) controle negativo de amplificação; 3) fragmento de interesse correspondente à 5'-UTR (140 bp). c): 1) Marcador (Ladder GeneRuller 1kb; Fermentas); 2) e 3) fragmento correspondente à ORF da rgs-CaM para inserção em pBI121 (600 bp); 4) controle negativo de amplificação. As posições dos fragmentos estão indicadas por seta à direita.

IV.4.2 Obtenção dos cassetes para análise funcional em tabaco

Foram obtidas três construções em vetores binários. Uma (pK7WG2,0::rgs-CaM) para a superexpressão, na qual a região codificadora da rgs-CaM encontra-se sob controle de um promotor 35S. A segunda [pk7GWIWG2(I)::5'UTRrgs-CaM] para silenciamento baseado no acúmulo de dsRNA, e a terceira (pBI121::rgs-CaM) para silenciamento baseado na expressão de RNA antisenso.

Após a transformação em *E. coli*, os clones positivos foram confirmados de diferentes maneiras. No caso da construção pBI121::rgs-CaM, os plasmídeos recombinantes foram digeridos com as enzimas de restrição *Xba*I e *Sst*I (Figura 27b), de maneira a liberar um fragmento de 354 bp (Figura 27a, linha 5), que seria o tamanho esperado para a inserção da região codificadora em sentido antisenso. As construções pk7GWIWG2(I)::5'UTRrgs-CaM e pK7WG2,0::rgs-CaM, por sua vez, foram confirmadas por PCR de colônia (Figuras 27c e 27d, respectivamente), usando os mesmos oligonucleotídeos empregados na amplificação do cDNA. A presença do inserto foi confirmada nos 3 vetores (Figura 27).

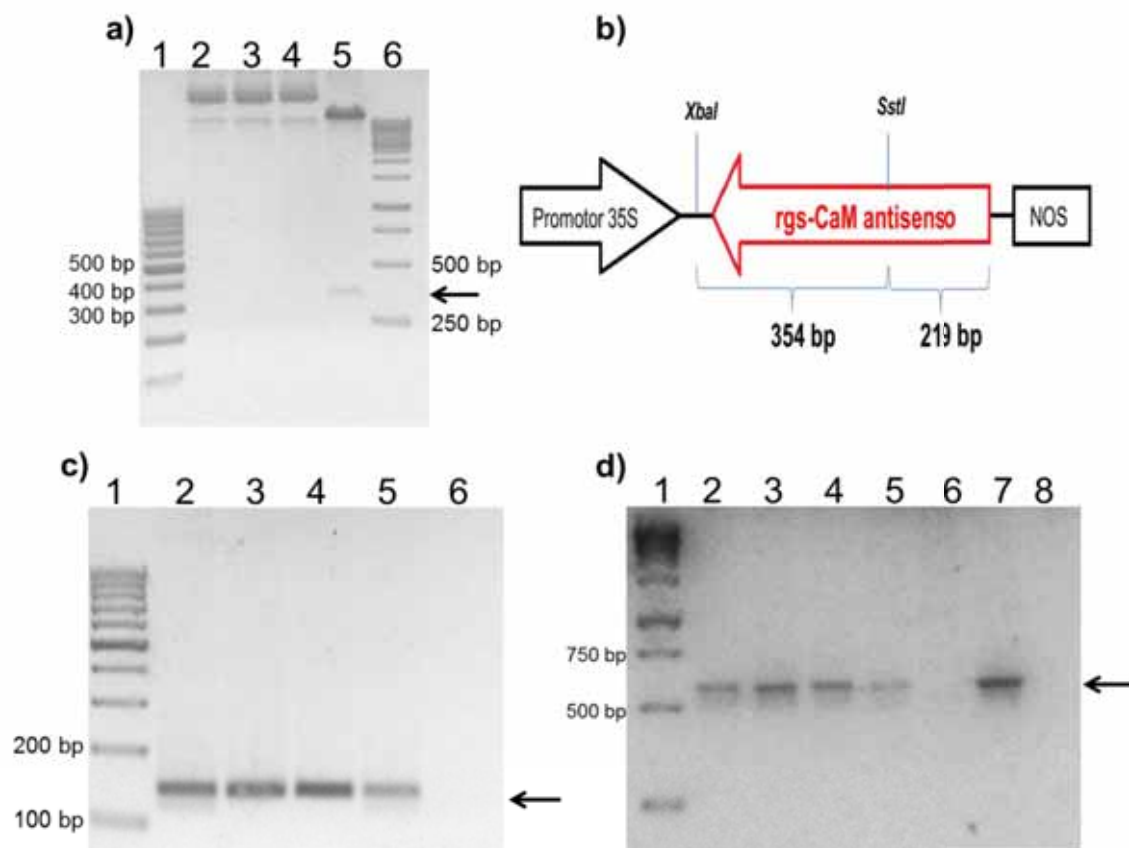


Figura 27. Confirmação da inserção dos fragmentos de interesse nos vetores para superexpressão e silenciamento. a) construção pBI121::rgs-CaM: 1) e 6) Marcadores (Ladder GeneRuller 100 bp e 1 kb, respectivamente; Fermentas); 2), 3), 4), 5) plasmídeo pBI121 (~13 kb) contendo ou não o fragmento de interesse (354 bp, seta à direita) – cada número correspondente a um clone recombinante. b) representação esquemática da construção pBI121::rgs-CaM, mostrando os sítios utilizados na análise de restrição. c) construção pK7GWIWG2(I)::rgs-CaM: 1) Marcador (Ladder GeneRuller 100 bp, Fermentas); 2), 3), 4) e 5) amplificação do fragmento de interesse (140 bp, seta à direita) – cada número correspondente a um clone recombinante; 6) controle negativo, utilizando vetor vazio como molde na PCR. d) construção pK7WG2.0::rgs-CaM: 1) Marcador molecular (Ladder GeneRuller 1 kb, Fermentas); 2), 3), 4), 5), 7) amplificação do fragmento de interesse (~600 bp, seta à direita) – cada número correspondente a um clone recombinante analisado, ; 8) controle negativo de amplificação. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

IV.4.3 Sequenciamento dos cassetes de expressão

Clones positivos das construções pK7WG2,0::rgs-CaM, pK7GWIWG2(I)::rgs-CaM e pBI121::rgs-CaM, tiveram os seus cassetes sequenciados. As sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas com sequências depositadas no banco de dados do NCBI, sendo observada total identidade (100%) com a sequência de nucleotídeos da rgs-CaM depositada no banco (acesso AF329729) nos 3 casos. Além disso, a correta inserção do fragmento de interesse nas três construções foi confirmada.

IV.4.4 Transformação de agrobactéria com os plasmídeos recombinantes

Para a transformação estável de plantas de tabaco (*N. tabacum* SR1) foram utilizadas agrobactérias previamente transformadas com as construções pK7WG2,0::rgs-CaM, pk7GWIWG2(I)::5'UTRrgs-CaM e pBI121::rgs-CaM, sendo estas transformações confirmadas por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos às respectivas construções. Após obter agrobactérias transformadas, estas foram usadas no processo de transformação de discos de folha de tabaco (item III.8.2).

IV.4.5 Caracterização molecular dos transformantes

Foram regeneradas 20 plantas transformantes para os eventos de transformação usando as construções pK7WG2,0::rgs-CaM e pBI121::rgs-CaM, e 12 plantas transformantes para os eventos usando a construção pk7GWIWG2(I)::5'UTRrgs-CaM. Para confirmar a inserção dos cassetes de interesse nas linhagens transgênicas regeneradas foi realizada uma PCR usando oligonucleotídeos específicos (Tabela 2) e DNA genômico extraído de folha como molde. DNA genômico extraído de tabaco selvagem (WT) foi usado como molde no controle negativo (Figura 28a - linha 2; 28b - linhas 26 e 27; 28c - linha 22). Após análise dos produtos de amplificação em gel de agarose, a integração do cassete foi confirmada em 17 (Figura 28a), 12 (Figura 28b) e

12 (Figura 28c) do total de plantas transformadas com as construções pBI121::rgs-CaM, pk7GWIWG2(I)::5'UTRrgs-CaM e pK7WG2,0::rgs-CaM, respectivamente. Em todos os casos, a amplificação de um fragmento de tamanho esperado só foi observada nas plantas efetivamente transformadas.

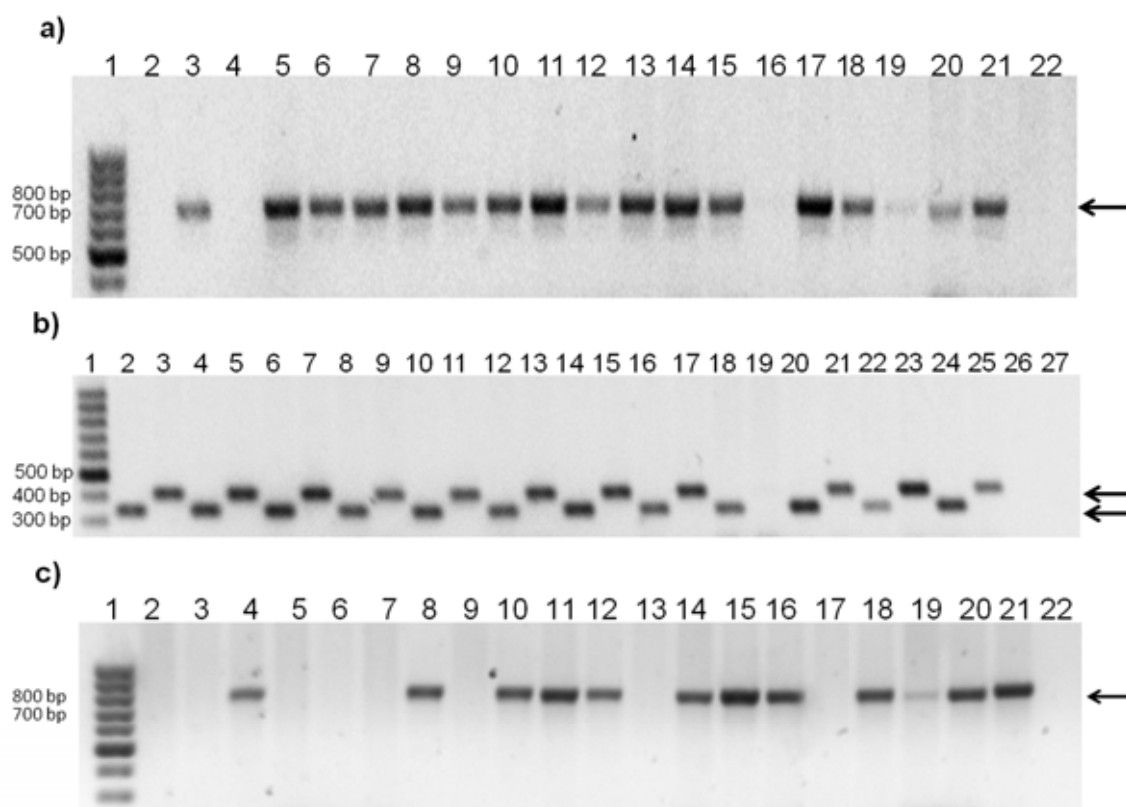


Figura 28. PCR confirmatório de inserção dos cassetes de interesse nas plantas transgênicas regeneradas. a) 1) Marcador (Ladder GeneRuller 100 bp, Fermentas); 2) tabaco selvagem utilizado como controle negativo; 3) a 22) plantas transformadas com a construção pBI121::rgs-CaM. **b)** 1) Marcador (Ladder GeneRuller 100 bp, Fermentas); 2) a 25) plantas transformadas com a construção pk7GWIWG2(I)::5'UTRrgs-CaM. Os números pares representam confirmação de inserção da região 5'UTR no sentido senso (310 bp), e os números ímpares no sentido antisenso (385 bp) (ver descrição dos oligonucleotídeos usados na Tabela 2) 26) e 27) tabaco selvagem utilizado como controle negativo. **c)** 1) Marcador (Ladder GeneRuller 100 bp, Fermentas); 2) a 21) plantas transformadas com a construção pK7WG2,0::rgs-CaM; 22) tabaco selvagem utilizado como controle negativo. A posição do produto de amplificação esperado é indicada por uma seta à direita. Gel agarose 1% corado com brometo de etídeo.

IV.4.5.1 Análise da expressão da rgs-CaM nas plantas transformadas empregando RT-PCR semiquantitativo

Foram analisadas 4, 7 e 13 transformantes do total de plantas transformadas com as construções pk7GWIWG2(I)::5'UTRrgs-CaM (silenciamento), pK7WG2,0::rgs-CaM (superexpressão) e pBI121::rgs-CaM (antisense), respectivamente. A Figura 29 mostra os resultados das reações de PCR (35 ciclos) para amplificação da rgs-CaM e do gene constitutivo *β -tubulina*, utilizando inicialmente 1 μ g de RNA total na reação de transcrição reversa. Cabe ressaltar que foram testadas diferentes quantidades de RNA e ciclagens na PCR, visando uma melhor quantificação. Tabacos transformados com a construção para superexpressão (Figura 29a – linhas 1 a 7), quando comparados com tabaco selvagem (WT) (Figura 29a – linha WT), mostraram um aumento na acumulação de transcritos correspondentes a rgs-CaM, principalmente as linhagens 11, 17 e 20 (Figura 29a – linhas 1, 5 e 7, respectivamente), e exceção feita à linhagem 19 (Figura 29a – linha 6).

Por outro lado, a total ausência de transcritos correspondentes a rgs-CaM pode ser observada nos tabacos transformados com o cassete de silenciamento baseado na acumulação de RNA de dupla fita (linhagens 1, 3, 5, 11 e 12; Figura 29b – linhas 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente). Já para as plantas transformadas com o cassete de silenciamento baseado na produção de RNA anti-senso foi observado um aumento na acumulação de um transcrito de 600 bp que provavelmente correspondente à transcrição do transgene na orientação anti-senso, destacando-se neste caso, as linhagens 12, 15 e 19 (Figura 29c – linhas 8, 9 e 13, respectivamente).

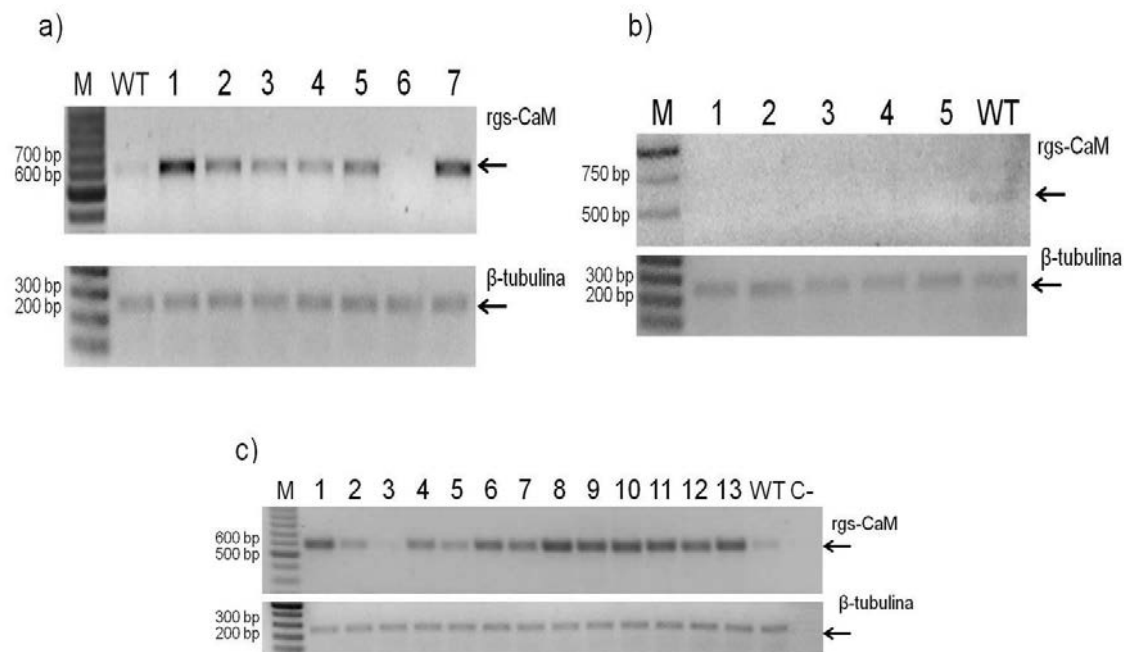


Figura 29. Análise por RT-PCR semiquantitativo da expressão da rgs-CaM nas plantas transformadas com os diferentes cassetes de expressão. a) plantas de tabaco transformadas com o cassete para superexpressão (pK7WG2,0::rgs-CaM): M) Marcador (Ladder GeneRuller 100bp; Fermentas); 1) a 7) plantas correspondentes aos transformantes 11, 13, 14, 15,17,19 e 20, respectivamente. **b)** plantas de tabaco transformadas com o cassete para o silenciamento baseado na expressão de dsRNA [pk7GWIWG2(I)::5'UTRrgs-CaM]: M) Marcador (Ladder GeneRuller 1kb; Fermentas); 1) a 5) plantas correspondentes aos transformantes 1, 3, 5, 11 e 12, respectivamente. **c)** plantas de tabaco transformadas com o cassete para o silenciamento baseado na produção de RNA anti-senso (pBI121::rgs-CaM): M) Marcador (Ladder GeneRuller 100bp; Fermentas); 1) a 13) plantas correspondentes aos transformantes 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 15, 16, 17, 18 e 19, respectivamente. WT) tabaco não transformado expressando níveis basais da rgs-CaM. C-) controle negativo de amplificação. O gene constitutivo que codifica a β-tubulina de tabaco (banda de 200 bp) foi utilizado como controle interno. As posições dos fragmentos estão indicadas por seta à direita. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

IV.4.5.2 Confirmação dos transgênicos na geração T1

Para os ensaios de infecção viral foram selecionadas plantas de geração T1 de 3 linhagens de cada construção em teste (pK7WG2,0::rgs-CaM; pk7GWIWG2(I)::5'UTRrgs-CaM; pBI121::rgs-CaM). Antes da inoculação viral, as plantas das linhagens selecionadas foram submetidas a PCR confirmatório, como descrito no item III.8.3, utilizando oligonucleotídeos específicos para cada cassete (item III.8.3 - tabela 2). Como pode ser observado na Figura 30 (painéis a, b e c), um produto específico e de tamanho esperado pode ser observado nas diferentes plantas testadas confirmando a presença do cassete inserido. Como controle negativo foi usado DNA genômico extraído de tabaco selvagem (WT). As plantas testadas positivas foram submetidas à inoculação com o PepYMV visando verificar o efeito da superexpressão ou silenciamento da rgs-CaM na acumulação viral.

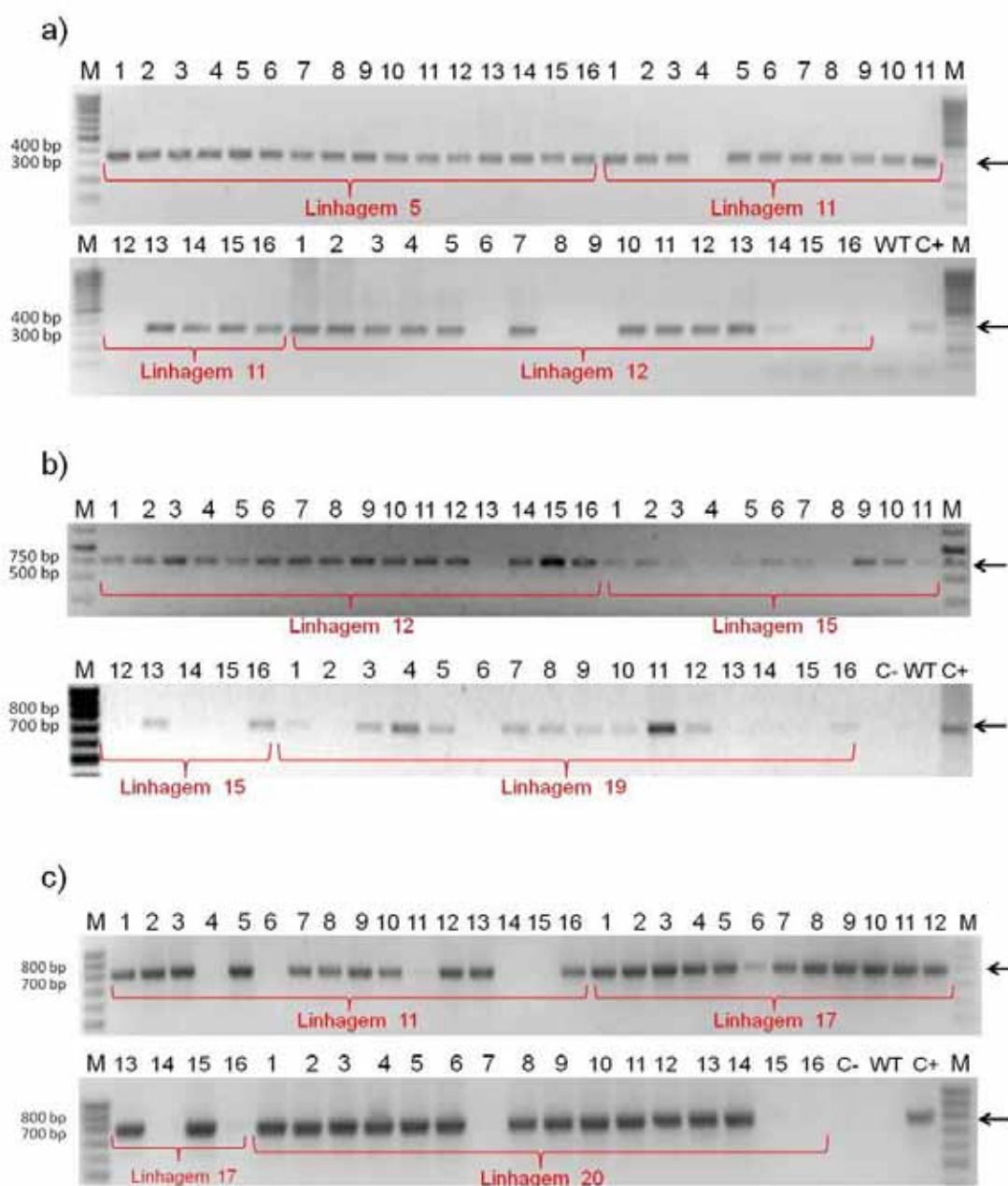


Figura 30. PCR confirmatório da presença do cassete de interesse em plantas de linhagens transgênicas da geração T1. **a)** plantas de tabaco transformadas com o cassete para superexpressão (pK7WG2,0::rgs-CaM) - linhagens 5, 11 e 12; **b)** plantas de tabaco transformadas com o cassete para silenciamento [pk7GWIWG2(I)::5'UTRrgs-CaM] - linhagens 12, 15 e 19; **c)** plantas de tabaco transformadas com o cassete para silenciamento via anti-senso, (pBI121::rgs-CaM) - linhagens 11, 17 e 20. M) Marcador (Ladder GeneRuller 100bp ou 1kb; Fermentas). Os números representam cada planta em sua respectiva linhagem, sendo testadas 16 plantas por linhagem. WT) tabaco não transformado utilizado como controle negativo. C-) e C+) controle negativo e positivo de amplificação, respectivamente. As posições dos fragmentos estão indicadas por seta à direita. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

IV.4.6 Análise de tabacos transgênicos inoculados com o *PepYMV*

As plantas de tabaco da geração T1 acima descritas foram mecanicamente inoculadas com o potyvírus *PepYMV* e mantidas em casa de vegetação (Figura 31). Foram inoculadas 4 plantas por linhagem (3 linhagens testadas) para cada construção investigada.



Figura 31. Cultivo das plantas de tabaco transformadas com as construções *pK7WG2,0::rgs-CaM*, *pk7GWIWG2(I),0::5'UTRrgs-CaM* e *pBI121::rgs-CaM*, inoculadas ou não com o *PepYMV*.

Os sintomas visuais causados pela infecção sistêmica surgiram no 7 dpi, intensificando-se ao 14 dpi. Folhas mosqueadas sem áreas de necrose foram observadas (Figura 32) em todas as plantas inoculadas, sendo estas transgênicas ou não (WT). Por outro lado não foram observados sintomas nas plantas inoculadas com tampão e abrasivo (MOCK). Adicionalmente, nenhuma diferença na intensidade dos sintomas entre plantas silenciadas e com superexpressão da *rgs-CaM* pode ser visualmente constatada.

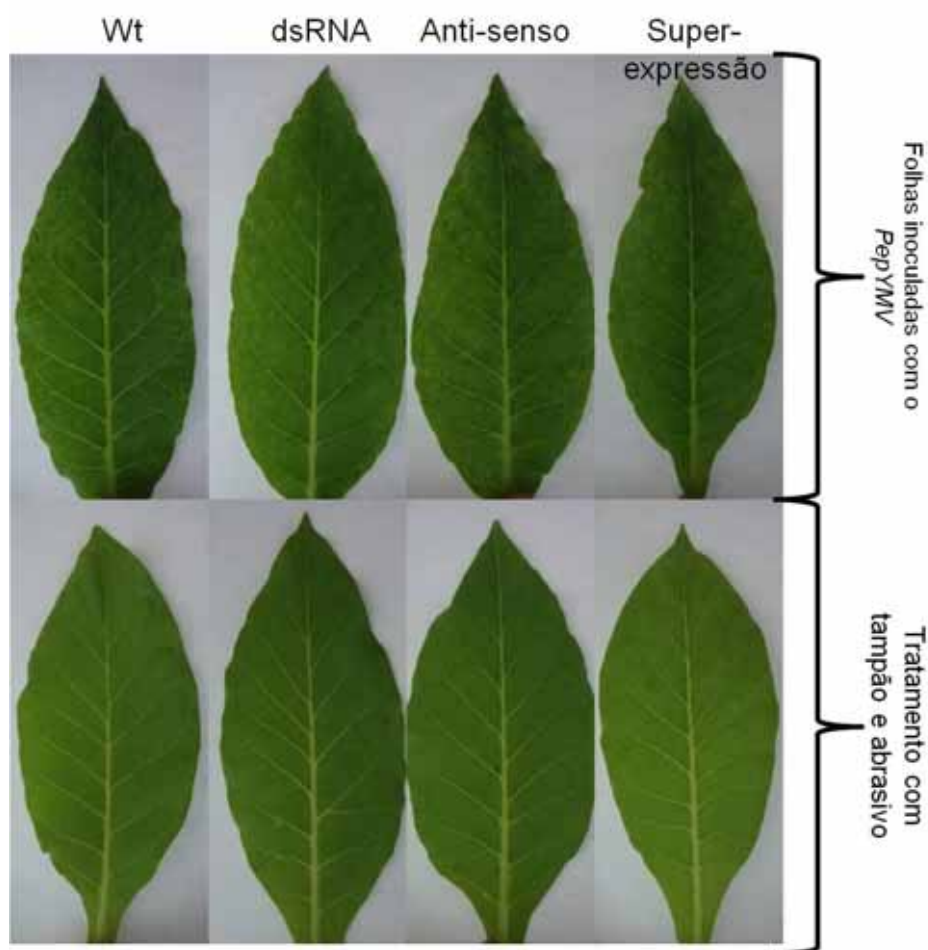


Figura 32. Sintomas observados em folhas de tabaco transgênico com superexpressão ou silenciamento (via dsRNA ou anti-senso) da rgs-CaM. As plantas foram inoculadas com PepYMV (painel superior) ou somente com tampão e abrasivo (controle MOCK; painel inferior). WT – refere-se ao controle não transformado. As fotos foram tiradas aos 14 dpi.

A acumulação viral nas plantas inoculadas em diferentes tempos pós-inoculação foi investigada empregando ELISA indireto. Para tal, um anti-soro universal contra membros do gênero Potyvirus (Agdia) foi utilizado (Item III.8.3.3). De maneira geral, os valores de absorbância obtidos revelaram um incrementono acúmulo de vírus entre 07 e 21 dpi tanto nas plantas selvagens como nas linhagens transgênicas superxpressando e silenciando a rgs-CaM via RNA anti-senso (Figura 33). A única exceção refere-se às plantas transgênicas nas quais a rgs-CaM foi silecianda via dsRNA

(5'-UTR), onde observa-se pouca variação nos valores de absorbância refletindo variação mínima no acúmulo viral ao longo do tempo (Figuras 33).

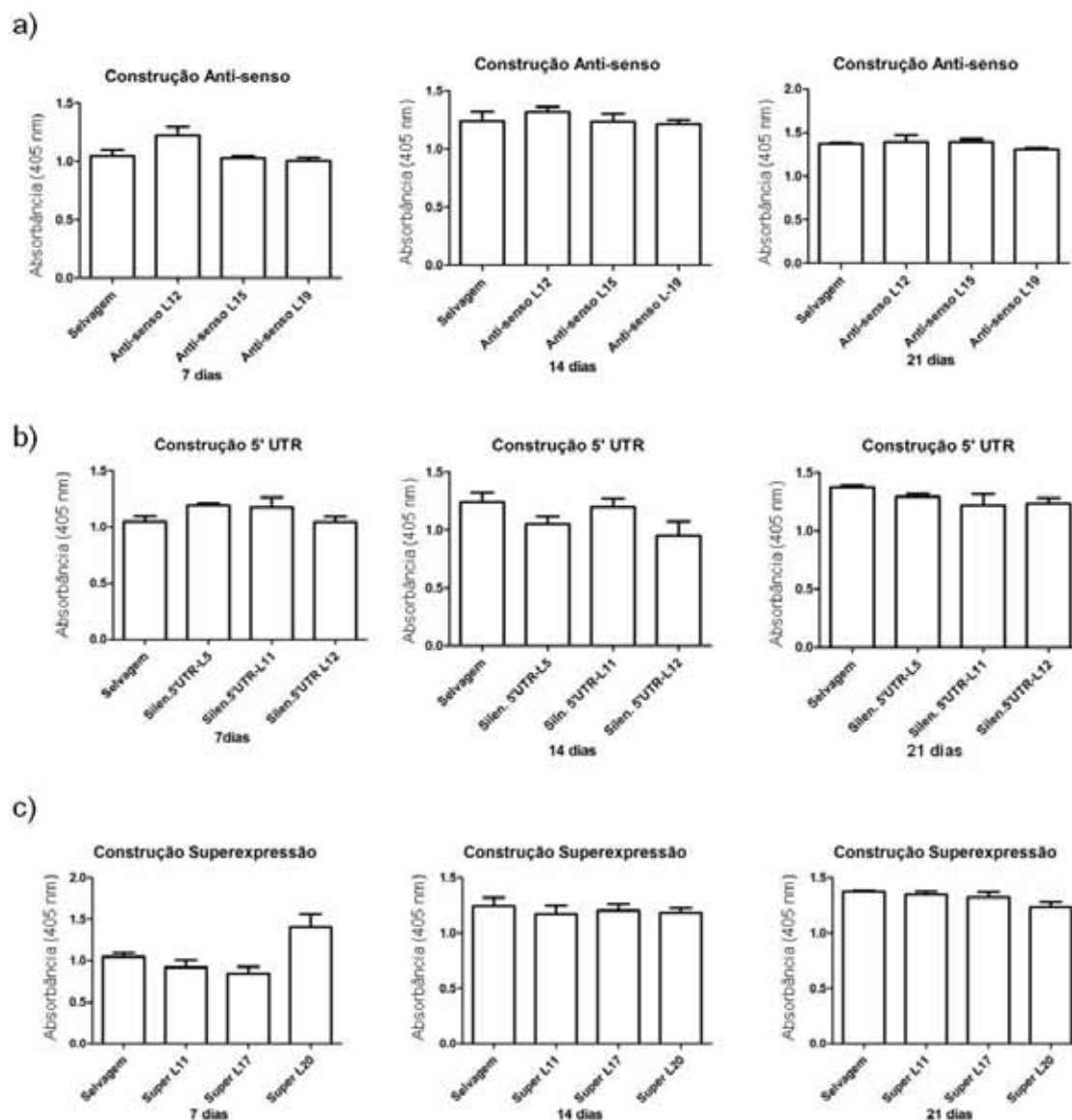


Figura 33. Detecção do PepYMV nos tabacos transgênicos aos 7, 14 e 21 dpi. a) plantas de tabaco transformadas com o cassete pBI121::rgs-CaM (anti-senso) - linhagens 12, 15 e 19; **b)** plantas de tabaco transformadas com o cassete pk7GWIWG2(I),0::5'UTRrgs-CaM (5'UTR) - linhagens 5, 11 e 15; **c)** plantas de tabaco transformadas com o cassete pK7WG2,0::rgs-CaM (superexpressão) - linhagens 11, 17 e 20. Plantas de tabaco selvagem também foram inoculadas e avaliadas em paralelo. Os valores de absorbância foram determinados em ensaio de ELISA indireto analisado em leitor de ELISA a 405 nm.

Para análise estatística foram utilizadas as linhagens 11, 15 e 17 para tabacos transgênicos silenciando via dsRNA, silenciando via RNA anti-senso e superexpressando a rgs-CaM, respectivamente e, tabaco selvagem como controle. Cada linhagem, continha 4 plantas com 3 repetições de leitura da absorbância, sendo estes resultados analisados estatisticamente como descrito no item III.8.3.3. Os valores médios de absorbância estão representados na Figura 34. Quando comparados os valores médios de absorbância entre as linhagens de tabacos transgênicos e selvagens aos 7 dpi, observa-se um menor acúmulo viral em plantas superexpressando a rgs-CaM em relação as outras plantas analisadas, sendo estas diferenças consideradas estatisticamente significativas em análise empregando teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Estas diferenças estatísticas entre os tabacos transgênicos e selvagens por período estão representadas por letras maiúsculas *A* ou *B*. De modo geral, um incremento no acúmulo viral ao longo do período foi observado, exceção feita ao transgênico silenciando via dsRNA onde manteve-se o acúmulo viral. Já estas diferenças consideradas estatisticamente significativas, ou não, são representadas pelas letras minúsculas *a*, *b* ou *c*.

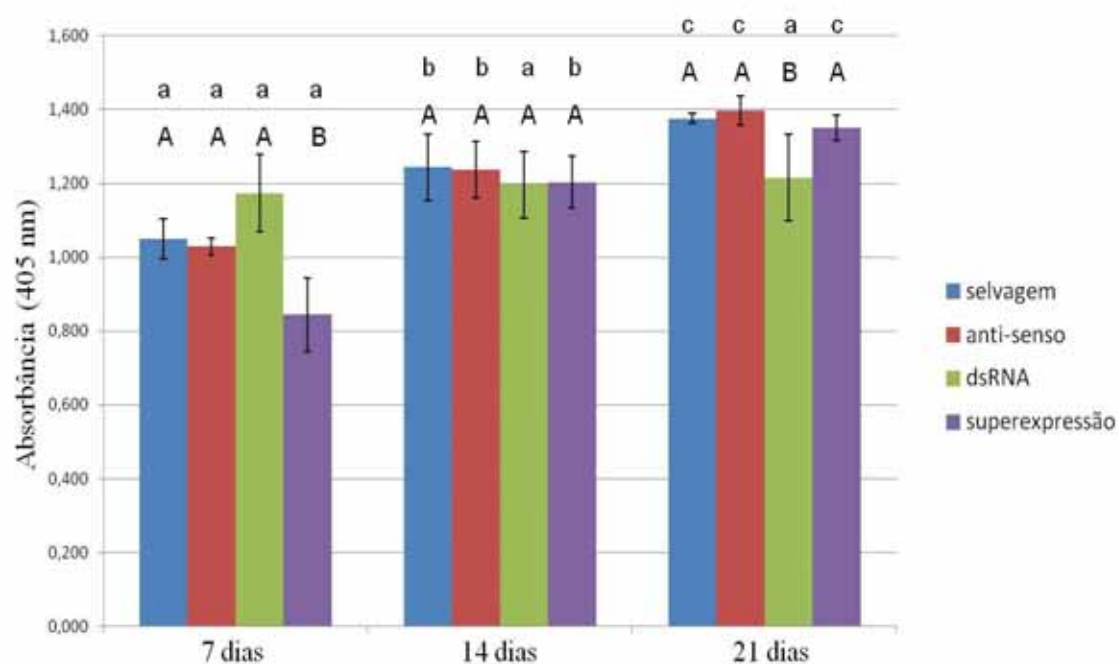


Figura 34. Detecção do acumulo viral nas plantas de tabaco transgênicas inoculadas com *PepYMV* após 7, 14 e 21 dias. Os valores médios de absorbância do controle (selvagem) e das linhagens 15, 11, e 17 para os transgênicos silenciando via RNA anti-senso, silenciando via dsRNA e superexpressando, respectivamente, são apresentados. As análises estatísticas são representadas com letras maiúsculas A ou B, referindo-se as diferenças entre os transgênicos e selvagens analisados por período e, letras minúsculas a, b ou c representam se houve ou não acumulo viral em decorrer do período.

V. DISCUSSÃO

No presente trabalho, a expressão da proteína rgs-CaM em *E. coli* pRIL codon plus foi empreendida utilizando-se o pGEX-5x-1. As condições ideais de indução da expressão da proteína recombinante foram: adição de 1 mM de IPTG, temperatura de 28°C com período de incubação de 4 horas. A princípio, ensaios adicionais empregando outros plasmídeos (pET-28a e pET-15b) bem como outras cepas de bactérias não foram satisfatórios, mesmo variando a temperatura e o tempo de incubação. Sendo assim, os experimentos de interação com a HC-Pro e proteínas do hospedeiro foram realizados utilizando a proteína de fusão GST:rgs-CaM, expressa empregando o plasmídeo pGEX-5x-1.

A correta inserção da região codificadora da rgs-CaM no vetor de expressão foi confirmada por digestão com enzimas de restrição e seqüenciamento. Observou-se no seqüenciamento total similaridade (100%) com a sequência de nucleotídeos da rgs-CaM de tabaco depositada no banco de dados do NCBI. O sucesso na indução da expressão da proteína de fusão foi confirmado por Western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-GST, sendo detectada uma proteína com massa molecular de ~ 47 kDa que é o esperado para a proteína de fusão GST:rgs-CaM.

Testes de solubilidade foram realizados a fim de encontrar o tampão não desnaturante ideal visando os testes de interação *in vitro* pela técnica de *pull down*. Entretanto, em todos os tampões testados a proteína de fusão GST:rgs-CaM esteve presente na fração insolúvel, exceção feita ao tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, NaCl 100 mM, no qual foi obtida uma pequena fração de proteína de fusão parcialmente solúvel. Resultados semelhantes já eram conhecidos para a proteína de fusão MBP:HC-

Pro (Maia & Bernardi, 1996), demonstrando que ambas as proteínas são de difícil solubilidade.

Após a confirmação de solubilidade das proteínas de fusão, estas foram expressas em larga escala e solubilizadas. No caso da proteína de fusão MBP:HC-Pro, esta foi submetida a uma purificação prévia em coluna de afinidade, porém foi observada a presença de algumas proteínas contaminantes. Por outro lado, a quantidade de proteína MBP:HC-Pro solúvel obtida foi suficiente para a realização dos ensaios de *pull down*.

Os ensaios de interação entre as proteínas de fusão MBP:HC-Pro e GST:rgs-CaM apontaram para a ocorrência de interações inespecíficas das proteínas alvo com as resinas utilizadas. Esse fato impediu a continuidade dos ensaios de *pull down* como previsto. Em função disso, optou-se pela utilização da proteína rgs-CaM:His expressa no plasmídeo pET-28b (Novagen), porém, dificuldades foram encontradas para se obter a referida proteína na forma solúvel. Um recurso para solubilizá-la baseou-se no uso de uréia como agente desnaturante, mas esse processo foi irreversível não permitindo a obtenção de proteína devidamente estruturada após a renaturação conforme indicado pelo espectro de dicroísmo. Outro agente desnaturante bastante utilizado é o SDS, que mesmo em baixa concentração, é suficiente para desnaturar proteínas (Reynolds *et al.*, 1967; Nielsen *et al.*, 2007). A utilização de SDS em baixas concentrações é um processo menos agressivo do que o uso da uréia, e quando acompanhada da utilização de MPD durante a renaturação protéica, tem demonstrado alta eficiência na obtenção de proteínas estruturadas (Michaux *et al.*, 2008). No caso da proteína rgs-CaM:His, essa abordagem culminou na obtenção de proteína pura e devidamente estruturada (Figura 18b), o que viabilizou a realização de novos experimentos de interação *in vitro* entre a proteína rgs-CaM e a proteína viral HC-Pro.

Além dos ensaios de interação mencionados, a disponibilidade da rgs-CaM pura e estruturada permitiu a realização de experimentos adicionais visando caracterizar estruturalmente esta proteína. De modo geral, CaMs apresentam 4 sítios de ligação ao cálcio e afinidade variando de moderada à alta (Gilli *et al.*, 1998; Bouche *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2012). Por outro lado, experimentos de ITC mostram que a rgs-CaM apresenta baixa afinidade ao Ca^{2+} , possuindo apenas 3 sítios de ligação ao Ca^{2+} , sendo que um deles apresenta uma afinidade muito baixa a esse íon. Os dados obtidos no ITC eram esperados, uma vez que a análise prévia de alinhamento utilizando o programa HHpred, mostra que a rgs-CaM apresenta apenas 2 sítios de ligação ao Ca^{2+} devidamente conservados ao invés de 4, sendo a presença de um terceiro de baixa afinidade também detectada. Essa hipótese foi corroborada pelo modelo estrutural teórico obtido no nosso estudo. Substituições de aminoácidos foram relatadas também em *EF-hands* de outras proteínas relacionadas às calmodulinas (Lee *et al.*, 2000). Curiosamente, algumas CaMs, são capazes de desempenhar suas funções mesmo não ligando-se ao íon cálcio, seja por apresentar mutações nas *EF-hands* ou pela indisponibilidade desse íon, (Geiser *et al.*, 1991; Leppla, 1984), embora, nesse segundo caso, com redução na eficiência da proteína (Leppla, 1984). CaMs medeiam uma variedade de funções do Ca^{2+} , porém a concentração desse íon no citosol raramente atinge um nível esperado para saturar todos os sítios de ligação ao Ca^{2+} nas CaMs (Klee, 1988). A ligação de CaMs aos alvos aumenta a afinidade dos sítios de ligação ao Ca^{2+} livres em determinadas CaMs (Wang *et al.*, 1980; Burger *et al.*, 1983; Olwin *et al.*, 1984). Apesar da baixa afinidade da rgs-CaM pelo cálcio (ver Tabela 4), esta é suficiente para ocasionar mudanças estruturais na proteína. Estas mudanças foram constatadas tanto nas análises de CD quanto nas análises em gel semi-desnaturante em presença ou ausência de cálcio. Cabe ressaltar que a maior mobilidade em gel das

calmodulinas quando ligadas ao Ca^{2+} é bem relatada na literatura (Garrigos *et al.*, 1991; Vanderbeld & Snedden, 2007). Com base nestes resultados podemos inferir que o íon Ca^{2+} apresenta um ponto chave no mecanismo de ação desta proteína durante a interação com os vírus, uma vez que ocasiona mudanças na estrutura da proteína. Além disso, baseado nos relatos encontrados na literatura e com resultados de afinidade obtidos em nosso estudo, podemos sugerir que a interação da rgs-CaM com a proteína viral HC-Pro pode ocorrer mesmo em baixa concentração e afinidade ao Ca^{2+} e, com a interação destas proteínas, aumentaria a afinidade de ligação da rgs-CaM com este íon, assim aumentando a eficiência do mecanismo. Em relação ao número de *EF-hands*, proteínas relacionadas às calmodulinas podem apresentar entre 2 a 6 *EF-hands* (McCormack *et al.*, 2003; Ranty *et al.*, 2006), a rgs-CaM apresenta 3 *EF-hands*, será que esta proteína levaria vantagens a outras CaMs do hospedeiro que requerem até 6 íons Ca^{2+} e, sendo assim um mecanismo de rápida ação? Uma questão interessante que necessita de maiores estudos.

A interação entre a HC-Pro e a rgs-CaM foi evidenciada pela primeira vez empregando o sistema de duplo híbrido de levedura (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Assim como a HC-Pro, a rgs-CaM foi caracterizada como um supressor de silenciamento, sendo a primeira proteína celular identificada como um supressor endógeno de silenciamento gênico pós-transcricional (Anandalakshmi *et al.*, 2000). A fim de melhor caracterizar essa interação, duas abordagens foram empregadas no presente estudo: realização de ensaios de interação *in vitro* empregando as proteínas rgs-CaM e HC-Pro expressas em bactérias, e em paralelo, ensaios de interação *in vivo* utilizando a metodologia BiFC. Nesse segundo caso, os resultados não evidenciaram a existência de uma interação entre as proteínas investigadas em células de epiderme cebola. Recentemente, porém, Nakahara e colaboradores (2012) relataram que a rgs-

CaM é capaz de se ligar com diversos supressores virais promovendo a degradação dos mesmos via autofagia associada ao seu auto-sacrifício. Agindo deste modo, a rgs-CaM bloquearia a atividade anti-RNAi dos supressores virais. Este dado parece corroborar nossos resultados empregando BIFC (ver Figura 25), uma vez que a interação pode não ter sido observada *in vivo*, provavelmente, devido à degradação das proteínas interagentes. Cabe ressaltar que no trabalho de Nakahara e colaboradores (2012), a interação da rgs-CaM com supressores virais foi observada em protoplastos (células BY-2), 16 h após a transfecção, empregando ressonância de plasma de superfície (SPR).

Por outro lado, a presença de duas proteínas do hospedeiro capazes de interagir com a rgs-CaM foi evidenciada em ensaios de interação por *pull down*. A identificação e posterior caracterização de tais proteínas representam abordagens promissoras para entender ou esclarecer a real função da rgs-CaM na interação vírus-planta, especialmente porque os dados disponíveis na literatura ainda são contraditórios. Neste contexto, Anandalakshmi e colaboradores (2000) descreveram que a rgs-CaM atua como um supressor de silenciamento quando superexpressa em plantas de tabaco. Recentemente, porém, Nakahara e colaboradores (2012) relataram que a rgs-CaM é uma proteína envolvida na resposta de contra-defesa da planta aos supressores virais. Diante do exposto, identificar outras proteínas do hospedeiro envolvidas com a rgs-CaM poderia auxiliar a desvendar o seu mecanismo de ação.

Visando estudos funcionais da proteína foi confirmada a obtenção de plantas transgênicas de tabaco capazes de superexpressar e silenciar a rgs-CaM. Adicionalmente, transformantes das três construções em teste foram avaliados por RT-PCR semiquantitativo quanto a eficiência para superexpressar ou silenciar a expressão da rgs-CaM, sendo 3 linhagens para cada construção (superexpressando, silenciando via

dsRNA ou por fita de RNA anti-senso) selecionadas visando os ensaios de inoculação viral.

Após a confirmação e seleção das referidas plantas transgênicas, a geração T1 foi inoculada com o PepYMV e uma cinética de acumulação viral nas plantas inoculadas foi determinada. O principal objetivo neste caso era testar os efeitos da superexpressão e do silenciamento da rgs-CaM na infecção viral de maneira a evidenciar um possível papel desta proteína na defesa da planta hospedeira. Os resultados obtidos revelaram diferenças significativas na acumulação viral entre amostras derivadas das plantas transgênicas silenciadas ou com superexpressão da rgs-CaM e de plantas selvagens. Nakahara e colaboradores (2012) observaram que plantas de tabaco capazes de superexpressar a rgs-CaM eram mais tolerantes ao *Cucumber mosaic virus* (CMV), enquanto que em plantas em que a rgs-CaM foi silenciada essa susceptibilidade foi aumentada. Essas diferenças foram observadas nas folhas inoculadas com o vírus aos 2 dpi sendo mais evidentes nas folhas sistemicamente infectadas aos 4 dpi. Nesse estudo foi utilizada uma cepa agressiva do CMV e a cinética de acumulação viral não foi estendida para tempos maiores. Nas nossas análises, a acumulação viral foi determinada aos 7, 14 e 21 dpi em folhas sistemicamente infectadas com uma cepa pouco agressiva do PepYMV. O fato de uma menor acumulação viral ter sido constatada no tempo de 7 dpi nas plantas com superexpressão da rgs-CaM corrobora os dados de Nakahara e colaboradores (2012), porém este efeito não é mantido aos 14 e 21 dpi. Curiosamente, a rgs-CaM é superexpressa imediatamente a um ferimento em folhas de tabaco, sendo a infecção viral geralmente acompanhada por ferimento (Tadamura *et al.*, 2012). Diante disso, estes dados sugerem que a rgs-CaM atua na fase inicial do estabelecimento da infecção viral sendo a sua disponibilidade vital nesta fase. Um outro ponto importante a ser considerado para

explicar as diferenças observadas está relacionado ao nível de expressão da rgs-CaM nas plantas geradas por Nakahara e colaboradores (2012) em relação as plantas geradas no nosso estudo.

VI. CONCLUSÕES

- A proteína rgs-CaM de tabaco foi expressa com êxito em *E. coli* na forma de uma proteína de fusão com a proteína GST e uma outra fusão com cauda de histidinas;
- A rgs-CaM apresenta afinidade com o íon Ca^{2+} com apenas 3 sítios de ligação, sendo um com baixa afinidade.
- Os dados de alinhamento, ITC e modelagem, permitem concluir que: i) o sítio C não está presente na rgs-CaM; ii) o sítio de menor afinidade ao Ca^{2+} é o sítio B e; iii) os sítios conservados A e D são os sítios que apresentam maior afinidade ao Ca^{2+} .
- O modelo teórico inicial da rgs-CaM confirma a sua estrutura terciária, que do mesmo modo das suas homólogas, possui dois domínios globulares, contendo as *EF-hands*, ligados por uma longa hélice alfa. Esse modelo inicial também mostra a localização espacial dos três sítios de ligação ao Ca^{2+} ;
- Experimentos de espectroscopia revelam que a rgs-CaM recombinante apresenta alta predominância de hélices alfa, espectro típico de proteínas do tipo calmodulina, sendo que a adição de 5 mM CaCl_2 e 5 mM de EGTA, respectivamente, promovem alterações na estrutura secundária da proteína rgs-CaM. Deste modo, o fluxo do Ca^{2+} e ligação com a proteína rgs-CaM pode ser um ponto chave no mecanismo de ação desta proteína durante a interação vírus planta;
- Ensaios de interação *in vivo* utilizando a metodologia BiFC não evidenciaram a interação entre a rgs-CaM e a HC-Pro. Por outro lado, a presença de duas proteínas do

hospedeiro capazes de interagir com a rgs-CaM foi evidenciada em ensaios de interação por *pull down*;

- Quando inoculadas com uma cepa do PepYMV, plantas transgênicas silenciadas ou com superexpressão da rgs-CaM apresentaram diferenças significativas na acumulação viral aos 7 dpi, sendo que as plantas com superexpressão apresentam um menor acúmulo viral.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANDALAKSHMI, R.; PRUSS, G. J.; GE, X.; MARATHE, R.; MALLORY, A. C.; SMITH, T. H.; VANCE, V. B. A viral suppressor of gene silencing in plants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, p.13079-13084, 1998.

ANANDALAKSHMI, R.; MARATHE, R.; GE, X.; HERR, J. M., JR.; MAU, C.; MALLORY, A.; PRUSS, G.; BOWMAN, L.; VANCE, V. B. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, v.290, p.142-144, 2000.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v.116, p.281-297, 2004.

BERGER, P. H.; WYATT, S. D.; SHIEL, P. J.; SILBERNAGEL, M. J.; DRUFFEL, K.; MINK, G. I. Phylogenetic analysis of the Potyviridae with emphasis on legume-infecting potyviruses. **Arch Virol**, v.142, p.1979-1999, 1997.

BOUCHE, N.; YELLIN, A.; SNEDDEN, W. A.; FROMM, H. Plant-specific calmodulin-binding proteins. **Annu Rev Plant Biol**, v.56, p.435-466, 2005.

BRACHA-DRORI, K.; SHICHRUR, K.; KATZ, A.; OLIVA, M.; ANGELOVICI, R.; YALOVSKY, S.; OHAD, N. Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. **Plant J**, v.40, p.419-427, 2004.

BRIGNETI, G.; VOINET, O.; LI, W. X.; JI, L. H.; DING, S. W.; BAULCOMBE, D. C. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **EMBO J**, v.17, p.6739-6746, 1998.

BURGER, D.; STEIN, E. A.; COX, J. A. Free energy coupling in the interactions between Ca^{2+} , calmodulin, and phosphorylase kinase. **J Biol Chem**, v.258, p.14733-14739, 1983.

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

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

CHAGA, G. S. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. **J Biochem Biophys Methods**, v.49, p.313-334, 2001.

CLARK, M. F.; LISTER, R. M.; BAR-JOSEPH, M. ELISA techniques. **Methods in Enzymology**, v.118, p.742-766, 1986.

CORREA, D.H.A.; RAMOS, C.H.I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry**, v. 3, p. 164-173, 2009.

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

CSORBA, T.; PANTALEO, V.; BURGYAN, J. RNA silencing: an antiviral mechanism. **Adv Virus Res**, v.75, p.35-71, 2009.

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

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

DIELEN, A. S.; SASSAKI, F. T.; WALTER, J.; MICHON, T.; MENARD, G.; PAGNY, G.; KRAUSE-SAKATE, R.; MAIA IDE, G.; BADAOU, S.; LE GALL, O.; CANDRESSE, T.; GERMAN-RETANA, S. The 20S proteasome alpha5 subunit of *Arabidopsis thaliana* carries an RNase activity and interacts in planta with the lettuce mosaic potyvirus HcPro protein. **Mol Plant Pathol**, v.12, p.137-150, 2011.

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

EINARSON, M. B.; PUGACHEVA, E. N.; ORLINICK, J. R. Identification of Protein-Protein Interactions with Glutathione-S-Transferase (GST) Fusion Proteins. **CSH Protoc**, v.2007, p.pdb top11, 2007.

GARRIGOS, M.; DESCHAMPS, S.; VIEL, A.; LUND, S.; CHAMPEIL, P.; MOLLER, J. V.; LE MAIRE, M. Detection of Ca²⁺-binding proteins by electrophoretic migration in the presence of Ca²⁺ combined with Ca²⁺ overlay of protein blots. **Anal Biochem**, v.194, p.82-88, 1991.

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.

GEISER, J. R.; VAN TUINEN, D.; BROCKERHOFF, S. E.; NEFF, M. M.; DAVIS, T. N. Can calmodulin function without binding calcium? **Cell**, v.65, p.949-959, 1991.

GILLI, R.; LAFITTE, D.; LOPEZ, C.; KILHOFFER, M.C.; MAKAROV, A.; BRIAND, C.; HAIECH, J. Thermodynamic analysis of calcium and magnesium binding to calmodulin. **Biochemistry**, v. 37, p. 5450-5456, 1998.

GOMES, F. P.; GARCIA, C. H. Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais: Exposição com Exemplos e Orientações para Uso de Aplicativos. Piracicaba: **FEALQ**, p. 309 , 2002.

GY, I.; GASCIOLLI, V.; LAURESSERGUES, D.; MOREL, J. B.; GOMBERT, J.; PROUX, F.; PROUX, C.; VAUCHERET, H.; MALLORY, A. C. *Arabidopsis* FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. **Plant Cell**, v.19, p.3451-3461, 2007.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v.418, p.244-251, 2002.

HORSCH, R. B.; FRY, J. E.; HOFFMANN, N. L.; EICHHOLTZ, D.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v.227, p.1229-1231, 1985.

HOUTMAN, J.C.D.; BROWN, P.H.; BOWDEN, B.; YAMAGUCHI, H.; APPELLA, E.; SAMELSON, L.E.; SCHUCK, P. Studying multisite binary and ternary protein interactions by

global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: Application to adaptor protein complexes in cell signaling. **Protein Science**, v. 16, p. 30-42, 2007.

HUANG, B. C.; LIU, R. Comparison of mRNA-display-based selections using synthetic peptide and natural protein libraries. **Biochemistry**, v.46, p.10102-10112, 2007.

IIDA, T.; KAWAGUCHI, R.; NAKAYAMA, J. Conserved ribonuclease, Eri1, negatively regulates heterochromatin assembly in fission yeast. **Curr Biol**, v.16, p.1459-1464, 2006.

IKURA, M.; AMES, J. B. Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, p.1159-1164, 2006.

KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C. Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. **Virology**, v.209, p.268-273, 1995.

KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. **Cell**, v.95, p.461-470, 1998.

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

KELLER, S.; VARGAR, C.; ZHAO, H.; PISZCZEK, G.; BRAUTIGAM, C. A.; SCHUCK, P. High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 5066-5073, 2012.

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

KLEE CB . Interaction of calmodulin with Ca^{2+} and target proteins. **In Calmodulin**, vol.5, p.35-56, 1988.

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

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

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

LACORTE, C.; ROMANO, E. Capítulo 6: Transferência de vetores para *Agrobacterium*. Em: BRASILEIRO, A.C.M. & CARNEIRO, V.T.C. Manual de Transformação Genética de Plantas. **EMBRAPA** – Brasília, DF, 1998.

LEE, S.H.; JOHNSON, J.D.; WALSH, M.P.; VAN LIEROP, J.E.; SUTHERLAND, C.; XU, A.; SNEDDEN, W.A.; KOSK-KOSICKA, D.; FROMM, H.; NARAYANAN, N.; CHO, M.J. Differential regulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free Ca^{2+} concentration. **Biochem J**, v.350, p.299-306, 2000.

LEE, Y. S.; NAKAHARA, K.; PHAM, J. W.; KIM, K.; HE, Z.; SONTHEIMER, E. J.; CARTHEW, R. W. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. **Cell**, v.117, p.69-81, 2004.

LEPPLA, S. H. *Bacillus anthracis* calmodulin-dependent adenylate cyclase: chemical and enzymatic properties and interactions with eucaryotic cells. **Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res**, v.17, p.189–198, 1984.

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

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

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

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

MAKIYAMA, R. K. Clonagem, expressão e purificação da proteína rgs-CaM, uma calmodulina supressora de silenciamento por RNA. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas em Genética). Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu (SP) - IBB, 2009.

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

MANJASETTY, B. A.; TURNBULL, A. P.; PANJIKAR, S.; BUSSOW, K.; CHANCE, M. R. Automated technologies and novel techniques to accelerate protein crystallography for structural genomics. **Proteomics**, v.8, p.612-625, 2008.

MARTI-RENO, M.A.; STUART, A.C.; FISER, A.; SALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* v.29, p. 291-325, 2000.

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

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

MCCORMACK, E.; BRAAM, J. Calmodulins and related potential calcium sensors of Arabidopsis. **New Phytol**, v.159, p.585-598, 2003.

MICHAUX, C.; POMROY, N. C.; PRIVE, G. G. Refolding SDS-denatured proteins by the addition of amphipathic cosolvents. **J Mol Biol**, v.375, p.1477-1488, 2008.

MISCHAN, M. M.; PINHO, S.Z. Experimentação agrônômica: dados não balanceados. Botucatu: **FUNDIBIO**, p. 456, 1996.

MIYOSHI, K.; MIYOSHI, T.; SIOMI, H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. **Mol Genet Genomics**, v.284, p.95-103.

MLOTSHWA, S.; PRUSS, G. J.; VANCE, V. Small RNAs in viral infection and host defense. **Trends Plant Sci**, v.13, p.375-382, 2008.

MOURA, M. F. Variabilidade de Potyvirus infectando *Capsicum spp.* no estado de São Paulo. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia – Proteção de Plantas). Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu (SP) – FCA, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiol. Plant**, v.15, p.473-497, 1962.

NAKAGAWA, T.; SUZUKI, T.; MURATA, S.; NAKAMURA, S.; HINO, T.; MAEO, K.; TABATA, R.; KAWAI, T.; TANAKA, K.; NIWA, Y.; WATANABE, Y.; NAKAMURA, K.; KIMURA, T.; ISHIGURO, S. Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.71, p.2095-2100, 2007.

NAKAHARA, K. S.; MASUTA, C.; YAMADA, S.; SHIMURA, H.; KASHIHARA, Y.; WADA, T. S.; MEGURO, A.; GOTO, K.; TADAMURA, K.; SUEDA, K.; SEKIGUCHI, T.; SHAO, J.; ITCHODA, N.; MATSUMURA, T.; IGARASHI, M.; ITO, K.; CARTHEW, R. W.; UYEDA, I. Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.109, p.10113-10118, 2012.

NIELSEN, M. M.; ANDERSEN, K. K.; WESTH, P.; OTZEN, D. E. Unfolding of beta-sheet proteins in SDS. **Biophys J**, v.92, p.3674-3685, 2007.

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

OLWIN, B. B.; EDELMAN, A.M.; KREBS, E.G.; STORM, D. R. Quantitation of energy coupling between Ca^{2+} , calmodulin, skeletal muscle myosin light chain kinase, and kinase substrates. **J Biol Chem**, v.259, p.10949-10955, 1984.

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.

PASSAFIUME, M.; VULLIEZ-LE NORMAND, B.; RIOTTOT, M. M.; BENTLEY, G. A. Sequence analysis of a monoclonal antibody specific for the preS2 region of hepatitis B surface antigen, and the cloning, expression and characterisation of its single-chain Fv construction. **FEBS Lett**, v.441, p.407-412, 1998.

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

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

PRIDY, T. S.; MIDDAGH, C. R.; CARLSON, G. M. Electrostatic changes in phosphorylase kinase induced by its obligatory allosteric activator Ca^{2+} . **Protein Sci**, v.16, p.517-527, 2007.

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

- PRUSS, G.; GE, X.; SHI, X. M.; CARRINGTON, J. C.; BOWMAN VANCE, V. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. **Plant Cell**, v.9, p.859-868, 1997.
- RAMACHANDRAN, V.; CHEN, X. Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. **Science**, v.321, p.1490-1492, 2008.
- RANTY, B.; ALDON, D.; GALAUD, J.P. Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: multifaceted relays to decode calcium signals. **Plant Signal Behav**, v. 1, p. 96-104, 2006.
- RAO S. T.; WU, S.; SATYSHUR, K.A.; LING, K.Y.; KUNG, C.; SUNDARALINGAM, M. Structure of *Paramecium tetraurelia* calmodulin at 1.8 Å resolution. **Protein Sci**, v.2, p. 436-447, 1993.
- REYNOLDS, J. A.; HERBERT, S.; POLET, H.; STEINHARDT, J. The binding of divers detergent anions to bovine serum albumin. **Biochemistry**, v.6, p.937-947, 1967.
- RIECHMANN, J. L.; LAIN, S.; GARCIA, J. A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. **J Gen Virol**, v.73 (Pt 1), p.1-16, 1992.
- ROJAS, M. R.; ZERBINI, F. M.; ALLISON, R. F.; GILBERTSON, R. L.; LUCAS, W. J. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. **Virology**, v.237, p.283-295, 1997.
- RUIZ-FERRER, V.; VOINET, O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. **Annu Rev Plant Biol**, v.60, p.485-510, 2009.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 1989.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning laboratory manual ed. 3. **Cold Spring Harbor Press**. Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- SARMIENTO, C.; NIGUL, L.; KAZANTSEVA, J.; BUSCHMANN, M.; TRUVE, E. AtRLI2 is an endogenous suppressor of RNA silencing. **Plant Mol Biol**, v.61, p.153-163, 2006.
- SHARMA, S. K.; EVANS, D. B.; VOSTERS, A. F.; MCQUADE, T. J.; TARPLEY, W. G. Metal affinity chromatography of recombinant HIV-1 reverse transcriptase containing a human renin cleavable metal binding domain. **Biotechnol Appl Biochem**, v.14, p.69-81, 1991.
- SHI, X. M.; MILLER, H.; VERCHOT, J.; CARRINGTON, J. C.; VANCE, V. B. Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. **Virology**, v.231, p.35-42, 1997.
- SÖDING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A.N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Res**, v. 33, p. 244-248, 2005.
- SOURET, F. F.; KASTENMAYER, J. P.; GREEN, P. J. AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. **Mol Cell**, v.15, p.173-183, 2004.
- SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. **Anal. Biochem**, v. 287, p. 252-260, 2000.

- TADAMURA, K.; NAKAHARA, K. S.; MASUTA, C.; UYEDA, I. Wound-induced rgs-CaM gets ready for counterresponse to an early stage of viral infection. **Plant Signal Behav**, v.7, p.1548-1551, 2012.
- 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.
- URCUQUI-INCHIMA, S.; MAIA, I. G.; ARRUDA, P.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. **Virology**, v.268, p.104-111, 2000.
- VANDEBELD, B.; SNEDDEN, W. A. Developmental and stimulus-induced expression patterns of Arabidopsis calmodulin-like genes CML37, CML38 and CML39. **Plant Mol Biol**, v.64, p.683-697, 2007.
- VAN DER LUIT, A. H.; OLIVARI, C.; HALEY, A.; KNIGHT, M. R.; TREWAVAS, A. J. Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. **Plant Physiol**, v.121, p.705-714, 1999.
- VANCE, V. B.; BERGER, P. H.; CARRINGTON, J. C.; HUNT, A. G.; SHI, X. M. 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. **Virology**, v.206, p.583-590, 1995.
- VAUCHERET, H.; BECLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **J Cell Sci**, v.114, p.3083-3091, 2001.
- VOINNET, O.; PINTO, Y. M.; BAULCOMBE, D. C. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, p.14147-14152, 1999.
- VOLPE, T. A.; KIDNER, C.; HALL, I. M.; TENG, G.; GREWAL, S. I.; MARTIENSSSEN, R. A. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. **Science**, v.297, p.1833-1837, 2002.
- WALTER, M.; CHABAN, C.; SCHUTZE, K.; BATISTIC, O.; WECKERMANN, K.; NAKE, C.; BLAZEVIC, D.; GREFFEN, C.; SCHUMACHER, K.; OECKING, C.; HARTE, K.; KUDLA, J. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. **Plant J**, v.40, p.428-438, 2004.
- WANG, J.H.; SHARMA, R.K.; HUANG, C.Y.; CHAU, V.; CHOCK, P.B. On the mechanism of activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase by calmodulin. **Ann NY Acad Sci**, v.356, p.190-204, 1980.
- WATERHOUSE, P. M.; WANG, M. B.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. **Nature**, v.411, p.834-842, 2001.
- WILSON, M. A.; BRUNGER, A.T. The 1.0 Å Crystal Structure of Ca²⁺-bound Calmodulin: an Analysis of Disorder and Implications for Functionally Relevant Plasticity. **J Mol Biol**, v. 301, p.1237-1256, 2000.
- WU, G.; GAO, Z.; A.; DONG, YU, S. Calcium-induced changes in calmodulin structural dynamics and thermodynamics. **Int J Biol Macromol**, v. 50, p. 1011-1017, 2012.

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