



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

VIVIANE ISABEL SERPA

**INIBIÇÃO POR ÓXIDO NÍTRICO DA LIGAÇÃO AO DNA DE UM DOMÍNIO
MYB R2R3 DE *Arabidopsis thaliana***

FLORIANÓPOLIS

2008

VIVIANE ISABEL SERPA

**INIBIÇÃO POR ÓXIDO NÍTRICO DA LIGAÇÃO AO DNA DE UM DOMÍNIO
MYB R2R3 DE *Arabidopsis thaliana***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADORES: PROF. Dr. HERNÁN TEREZI

Dr. JAVIER VERNAL

FLORIANÓPOLIS

2008

*Aos meus pais, por terem
dado asas à minha
imaginação...*

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Dr. Hernán Terenzi, por ter me orientado, possibilitado a realização desse trabalho e me dado todo o apoio necessário.
- Ao Dr. Javier Vernal, por ter sido meu orientador na bancada e meu 'terapeuta' nos momentos de dúvidas. Pelas brincadeiras e amizade que tornaram o trabalho mais fácil e divertido.
- Aos meus pais, Gentil e Fátima e à minha irmã, Liliane, por todo apoio emocional que é necessário para que um estudante termine um mestrado. E, claro, pelo apoio financeiro sem qualquer tipo de cobrança. Como sempre, apoiando e confiando nas minhas decisões, custe o que custar.
- Às companheiras de trabalho e grandes amigas, Carolina, Gabriela, Camila e Priscila, por fazer meus dias de trabalho ainda mais agradáveis e alegres e pela participação direta na realização desse trabalho.
- Aos colegas do grupo do Prof. Dr. Hernán e do grupo do Prof. Dr. Bóris, pelas experiências e favores trocados e pela agradável convivência diária.
- Aos colaboradores desse projeto: Dr. Lorenzo Lamattina, Dr. Erich Grotewold e principalmente ao Dr. Raul Cássia, pelos ensinamentos, apoio e incentivo.
- Aos órgãos financiadores do projeto: CNPq, CAPES, FAPESC, MCT e FINEP.

Ao meu anjo da guarda pela oportunidade de conviver e aprender com cada uma dessas pessoas!!

“Um pouco de Ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima” (Louis Pasteur).

SERPA, V.I. **INIBIÇÃO POR ÓXIDO NÍTRICO DA LIGAÇÃO AO DNA DE UM DOMÍNIO MYB R2R3 DE *Arabidopsis thaliana***. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

A subfamília de genes MYB R2R3 de plantas é um dos maiores grupos de fatores de transcrição descritos até hoje. Fatores de transcrição MYB R2R3 de *Arabidopsis thaliana* regulam uma variedade de processos incluindo respostas a fatores ambientais e a via de transdução de sinal do ácido abscísico (ABA). O Óxido Nítrico (NO) pode influenciar a atividade transcricional de uma grande variedade de genes em *Arabidopsis* e já foi demonstrado estar presente em plantas e envolvido na resposta a diversos tipos de estresse. O objetivo do presente trabalho foi investigar a possibilidade do NO modificar a atividade de ligação ao DNA de AtMYB2, um típico domínio MYB R2R3 de *A. thaliana* por uma modificação pós-traducional do seu resíduo Cys53 conservado. Nós clonamos, expressamos e purificamos o domínio MYB R2R3, um domínio mínimo ativo que compreende os resíduos 19-125 (M2D). Em ensaios de Retardamento de Migração Eletroforética a proteína M2D se liga à seqüência de DNA 5'-[A]AACC[A]-3'. Os doadores de NO, NPS e SNOG, inibiram a ligação de M2D ao DNA. De acordo com o esperado para o mecanismo de S-nitrosilação da cisteína, os efeitos do NO foram revertidos por DTT. A S-nitrosilação em M2D foi detectada pelo método de biotinilação. Esses resultados demonstram que a ligação de M2D ao DNA é inibida por S-nitrosilação da Cys53 como consequência da ação do NO, estabelecendo pela primeira vez uma relação entre o estado redox e a propriedade de ligação ao DNA de um fator de transcrição MYB de plantas.

Palavras-chave: Óxido nítrico; S-nitrosilação; AtMYB2

SERPA, V.I. **INIBIÇÃO POR ÓXIDO NÍTRICO DA LIGAÇÃO AO DNA DE UM DOMÍNIO MYB R2R3 DE *Arabidopsis thaliana***. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

The plant R2R3 Myb gene subfamily is one of the largest groups of transcription factors described to date. *Arabidopsis thaliana* R2R3-MYB transcription factors regulate a variety of processes including responses to environmental factors and ABA (abscisic acid) signal transduction pathway. Nitric oxide (NO) can influence the transcriptional activity of a wide set of *Arabidopsis* genes and was conclusively demonstrated to be present in plants where it is involved in the adaptive responses to multiple stresses. The aim of the present work was to investigate whether NO modifies DNA-binding activity of AtMYB2, a typical R2R3-MYB from *A. thaliana*, by means of a posttranslational modification of its conserved Cys53 residue. We have cloned, expressed and purified the R2R3 domain of MYB2, a fully active minimal DNA binding domain of AtMYB2 spanning residues 19–125 (M2D). In EMSA assays, M2D binds the core binding site 50-[A]AACCC[A]-30. The NO donors SNP and GSNO inhibit M2D DNA-binding. As expected for a Cys S-nitrosylation, the NO-mediated inhibitory effect was reversed by DTT, and S-nitrosylation of Cys53 in M2D was detected by biotin switch assays. These results demonstrate that the DNA-binding of M2D is inhibited by S-nitrosylation of Cys53 as a consequence of NO action, thus establishing for the first time a relationship between the redox state and DNA binding in a plant MYB transcription factor.

Keywords: Nitric oxide; S-Nitrosylation; AtMYB2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo do domínio MYB R2R3.....	4
Figura 2 – Esquema da evolução do domínio MYB R2R3.....	5
Figura 3 – Fotos das plantas.....	7
Figura 4 – Reações químicas para formação da S-nitrosilação no grupo tiól do aminoácido cisteína.....	10
Figura 5 – Seqüência de DNA que codifica os domínios MYB da proteína AtMYB2 (M2D).....	15
Figura 6 – Vetor pET-14b com os sítios de corte para as enzimas de restrição.....	17
Figura 7 – Indução da expressão gênica no vetor pET-14b por IPTG.....	17
Figura 8 – Região de clonagem do vetor pET-14b.....	18
Figura 9 – Resina de sefarose.....	23
Figura 10 – Comparação entre a estrutura do imidazol e a cadeia lateral do aminoácido histidina.....	24
Figura 11 – Sequências de DNA nas quais as proteínas se ligam.....	25
Figura 12 – Ensaio de retardamento de migração eletroforética.....	26
Figura 13 – Ensaio de biotinylação após a nitrosilação da proteína.....	27
Figura 14 – Experimento de Western blot.....	28
Figura 15 – Amplificação do fragmento que codifica o domínio MYB de AtMYB2...30	
Figura 16 – PCR de colônia.....	31
Figura 17 – Extração dos plasmídios das bactérias.....	32
Figura 18 – Digestão dos plasmídios extraídos com as enzimas <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i>	33
Figura 19 – Perfil de expressão da bactéria <i>E.coli</i> BL21(DE3)pLysS transformada com o plasmídio pET-14b sem o gene de interesse.....	34

Figura 20 – Teste de indução de M2D.....	35
Figura 21 – SDS-PAGE dos passos da purificação de AtMYB2.....	36
Figura 22 – SDS-PAGE dos passos da purificação de P1.....	37
Figura 23 – Comparação entre as seqüências de AtMYB2 e o domínio MYB de <i>Homo sapiens</i>	37
Figura 24 – Ensaio de retardamento de migração eletroforética.....	39
Figura 25 – Influência do DTT e dos doadores de NO na propriedade de ligação de M2D ao DNA.....	40
Figura 26 – Ensaio de biotinação e Western blot.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Biotina-HPDP	N-{6-(Biotinamido)-hexil}-3'-(2'-piridilditio) propionamida
BSA	“Bovine Serum Albumin” – Albumina do soro bovino
cDNA	DNA complementar
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídios trifosfato
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GSH	Glutationa reduzida
HENS	Tampão Hepes 25 mM, pH7.7, EDTA 1 Mm, SDS 1%
IgG	Imunoglobulina G
IMAC	“Immobilized metal ion affinity chromatography” – Cromatografia de afinidade por metal imobilizado
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Meio de cultivo Lúria-Bertani
MMTS	S-metilmetanetiosulfônico
M2D	Domínio de ligação ao DNA da proteína AtMYB2
NO	Óxido nítrico
NO⁺	Nitrosônio
NOS	Óxido nítrico sintase
NPS	Nitroprussiato de sódio
NR	Nitrato redutase
pb	Pares de bases de DNA
PCR	“Polymerase Chain Reaction” – Reação em cadeia da polimerase
PDB	“Protein Data Bank” – Banco de dados de estruturas de proteínas
pH	Potencial hidrogeniônico
PVDF	Membrana de difluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucléico

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	“SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis” – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SNOG	S-nitrosoglutationa
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampão Tris/borato/EDTA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Regulação da Expressão Gênica.....	1
1.2 Fatores de transcrição.....	1
1.3 Fator de Transcrição MYB.....	2
1.4 <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
1.5 Óxido Nítrico.....	8
1.6 S-nitrosilação.....	9
1.7 <i>AtMYB2</i>	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos Gerais.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Amplificação da região que codifica o domínio de ligação MYB de <i>AtMYB2</i> e construção do vetor de expressão.....	15
3.2 Preparação das bactérias competentes.....	19
3.3 Transformação das bactérias com os plasmídios pET14b-M2D e PZmP1.....	19
3.4 P1-Fator de transcrição MYB do milho.....	20
3.5 Expressão das proteínas M2D e P1.....	21
3.6 Teste de indução da expressão de M2D.....	22
3.7 Purificação protéica de M2D e P1.....	22
3.8 Análise por Espectrometria de Massa.....	24
3.9 Ensaio de ligação das proteínas purificadas ao DNA e Teste de Retardamento da Migração Eletroforética.....	24

3.10 Doadores de óxido nítrico: Nitroprussiato de sódio (NPS) e S-nitrosoglutationa (SNOG).....	25
3.11 Ensaio de Biotinilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas (“Biotin Switch”).....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 PCR do inserto no vetor U63651A.....	30
4.2 PCR de colônia (“Coloni PCR”).....	31
4.3 Extração dos plasmídios – “Miniprep”.....	31
4.4 Digestão dos plasmídios com <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i>	32
4.5 Perfil de expressão – 37°C – BL21(DE3) pLysS + pET-14b.....	33
4.6 Teste de indução de <i>AtMYB2</i>	34
4.7 Purificação de <i>AtMYB2</i>	35
4.8 Purificação de P1.....	36
4.9 Espectrometria de Massa e alinhamento Clustal W.....	37
4.10 Ensaio de ligação e Teste de Retardamento de Migração Eletroforética.....	38
4.11 Ensaio de ligação ao DNA na presença de doadores de NO e Teste de Retardamento de Migração Eletroforética.....	39
4.12 Detecção de proteínas S-nitrosiladas – Ensaio de Biotinilação.....	41
5. CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO 1.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Regulação da Expressão Gênica:

Em plantas e animais multicelulares, a expressão gênica é regulada através de processos complexos e elaborados. A diferenciação celular é alcançada por meio de mudanças na expressão dos genes, com o conseqüente acúmulo, nas células, de conjuntos diferentes de moléculas de RNA e proteínas (LEWIN, 1994, NELSON; COX, 2005).

Embora a regulação possa ser feita em várias etapas na rota que vai do DNA à proteína, para a maioria dos genes o controle da transcrição é fundamental. Isso faz sentido porque somente o controle transcricional pode garantir que intermediários desnecessários não sejam sintetizados (LEWIN, 1994).

O controle da transcrição é geralmente exercido na etapa em que a transcrição é iniciada. A RNA polimerase se liga à região promotora de um gene e inicia sua tarefa de transcrever o DNA. Além do promotor, quase todos os genes têm seqüências regulatórias que são necessárias para ativar ou desativar o gene (LEWIN, 1994).

1.2 Fatores de Transcrição:

As seqüências regulatórias de DNA não funcionam por elas mesmas. Para ter qualquer efeito elas devem ser reconhecidas por proteínas chamadas proteínas regulatórias do gene, ou fatores de transcrição, que se ligam ao DNA (NELSON; COX, 2005). Essas proteínas são agrupadas dentro da classe de fatores de

transcrição que reconhecem seqüências específicas de DNA e que podem ser reguladas de diferentes formas: o fator de transcrição pode ser produzido de forma tecido-específica; a atividade do fator de transcrição pode ser controlada diretamente por uma modificação na molécula, como por exemplo, no caso de fosforilação; o fator de transcrição pode depender da ligação a uma determinada molécula ou a sua disponibilidade pode variar de célula para célula (LEWIN, 1994).

Os fatores de transcrição reconhecem uma seqüência específica de DNA porque se ajustam firmemente às características especiais da superfície da dupla hélice em uma determinada região. Isso varia dependendo da seqüência de nucleotídeos, e assim, diferentes proteínas reconhecerão diferentes seqüências de nucleotídeos. Na maioria dos casos, a proteína se insere na fenda maior da hélice de DNA e faz uma série de contatos moleculares com os pares de bases. A proteína forma pontes de hidrogênio, ligações iônicas ou interações hidrofóbicas com as bordas das bases, geralmente sem romper as pontes de hidrogênio que mantêm os pares de bases juntos. Embora cada contato individual seja fraco, os 20 ou mais contatos que são tipicamente formados na interface proteína-DNA asseguram que a interação seja tanto altamente específica como bastante forte; de fato, as interações proteína-DNA estão entre as interações moleculares mais fortes e específicas conhecidas em biologia (NELSON; COX, 2005).

1.3 Fator de transcrição MYB:

Os fatores de transcrição são agrupados em famílias classificadas de acordo com seu domínio de ligação ao DNA (PABO; SAUER, 1992). Nesse contexto, uma das maiores família identificadas, em plantas, é a família dos fatores de transcrição

que apresentam o domínio MYB (RIECHMANN et al., 2000). O primeiro membro descoberto da família de genes MYB foi v-MYB, um oncogene do vírus da mieloblastose aviária (KLEMPNAUER; GONDA; BISHOP, 1982). Subseqüentemente, três genes relacionados a v-MYB, c-MYB, A-MYB e B-MYB foram identificados em vertebrados, estando envolvidos na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular (WESTON, 1998). Desde então proteínas MYB têm sido encontradas em qualquer organismo eucariótico analisado (LIPSICK, 1996).

O domínio do fator de transcrição MYB é composto por três repetições de aminoácidos imperfeitas (R1R2R3), cada uma com aproximadamente 50 aminoácidos, com 3 resíduos de triptofanos, em cada repetição, espaçados regularmente formando um agrupamento de triptofano na estrutura tridimensional da proteína. As duas últimas repetições (R2R3) constituem a região de ligação ao DNA (KANEI-ISHII et al., 1990, SAIKUMAR; MURALI; REDDY, 1990, OGATA et al., 1992).

Cada repetição codifica três α -hélices com as duas últimas formando o motivo de ligação ao DNA chamado hélice-volta-hélice, no qual a terceira hélice é a que interage especificamente com o DNA (figura 1) (OGATA et al., 1992). O motivo hélice-volta-hélice foi o primeiro motivo descrito de reconhecimento de proteínas ao DNA, inicialmente descoberto na proteína Cro do fago lambda. Ele tem sido encontrado, atualmente, em vários fatores de transcrição procarióticos e eucarióticos. A análise comparativa de proteínas com esse motivo revela a estrutura de uma α -hélice, uma volta e outra α -hélice (LEWIN, 1994).

Modificações pós-traducionais estão relacionadas à regulação da atividade do fator de transcrição MYB (GUEHMAN, et al., 1992, ZARGARIAN, et al., 1999).

Guehman e colaboradores, em 1992, demonstraram que a redução de um resíduo de cisteína (Cys) na posição 130 do domínio de ligação ao DNA de proteínas MYB é essencial para a ligação da proteína ao DNA. A Cys 130 está localizada em um motivo básico da proteína. Aminoácidos básicos que circundam o resíduo da Cys 130 também exercem influência na capacidade de ligação ao DNA, pois aumentam a reatividade da cisteína tornando-a mais acessível à oxidação. Modificações no estado redox de uma célula podem ter conseqüências na regulação da expressão de genes MYB (GUEHMAN, et al., 1992).

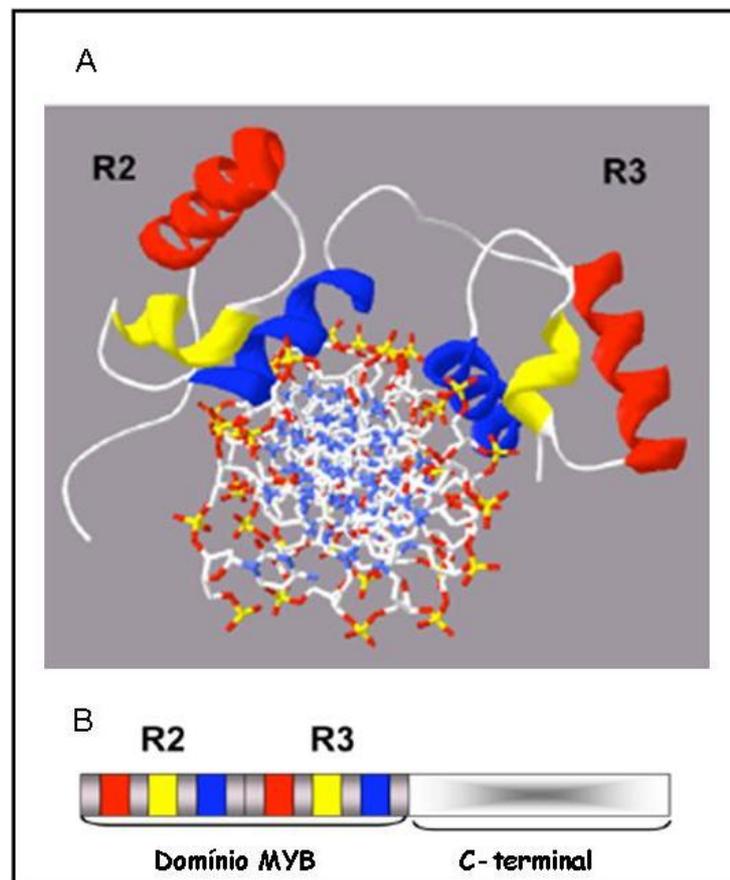


Figura 1: Modelo do domínio MYB R2R3. (A) A Estrutura tridimensional resolvida (PDB 1H88) do domínio de ligação ao DNA com a segunda e a terceira repetição da proteína c-MYB de vertebrados é apresentada ligada ao DNA. As hélices vermelha, amarela e azul correspondem, respectivamente, à primeira, segunda e terceira hélice de cada repetição. O DNA é mostrado entre as duas repetições. (B) Representação linear de um domínio típico R2R3 encontrado nas plantas (Fonte: HEINE, 2006).

Em plantas, fatores de transcrição MYB compreendem uma das maiores famílias de fatores de transcrição conhecidas (RIECHMANN et al., 2000, STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001) e, em contraste com os animais, elas apresentam uma subfamília de proteínas MYB que é caracterizada por domínios com apenas duas repetições, as quais são mais similares às repetições R2 e R3 de MYB de vertebrados (LIPSICK, 1996, STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001).

Genes MYB de plantas (R2R3) originaram-se de um ancestral que é representado hoje pelo gene B-MYB de três repetições (R1R2R3) (figura 2). No entanto, depois da perda da primeira repetição (R1), houve, ainda, a troca do primeiro triptofano (Trp) de R3 por um aminoácido hidrofóbico e a inserção de um resíduo de leucina (Leu), na posição 46, entre a segunda e a terceira hélice de R2. Para se chegar ao típico domínio MYB R2R3, depois da inserção da Leu 46 surgiu um segundo resíduo de Cys na posição 49, além da já existente Cys 53 (Cys 130 para proteínas MYB de vertebrados), o que tem permanecido conservado entre todos os domínios MYB R2R3 conhecidos (DIAS et al., 2003).

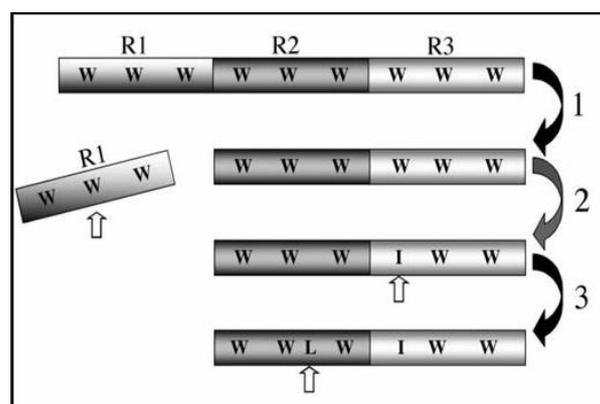


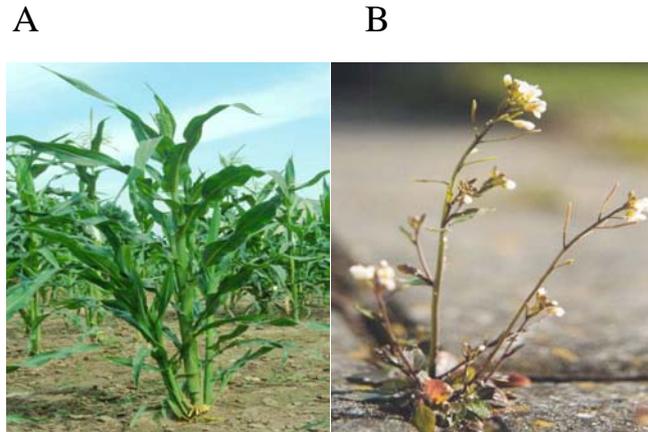
Figura 2: Esquema da evolução do domínio MYB R2R3 em plantas. 1º) perda da repetição 1; 2º) Troca do primeiro triptofano (W) da repetição 3 por outro aminoácido hidrofóbico (nesse caso uma isoleucina); 3º) Inserção de um resíduo de leucina entre a segunda e a terceira hélice da repetição 2 (Fonte: HEINE, 2006).

Genes MYB do tipo R2R3 codificam proteínas que estão relacionadas ao desenvolvimento e determinação do destino e da identidade celular, à resposta da planta a fatores ambientais, à ação mediada por hormônios e à regulação do metabolismo dos fenilpropanóides (STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001).

No genoma da planta *Arabidopsis thaliana* (figura 3) aparecem aproximadamente 125 genes da família MYB (RIECHMANN et al., 2000, STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001), enquanto o genoma do milho (*Zea mays*) (figura 3) e outras monocotiledôneas relacionadas possuem mais de 200 genes MYB (RABINOWICZ, et al., 1999, JIANG; GU; PETERSON, 2004). Esses exemplos demonstram o grande número de genes MYB presente em plantas, o que é bastante diferente da pequena quantidade de genes MYB existentes em outros eucariotos (LIPSICK, 1996).

1.4 *Arabidopsis thaliana*:

A espécie *A. thaliana* é um membro da família da mostarda (Cruciferae ou Brassicaceae) com ampla distribuição pela Europa, Ásia e América do Norte. Características como ciclo de vida curto, pequeno tamanho da planta (15 a 20 cm), pequeno genoma em relação aos demais eucariotos e possibilidade de ser mantida em placas de *petri* tornam a *Arabidopsis* um importante modelo para investigações fundamentais em biologia. Os resultados, podendo ser corroborados às demais plantas e, em muitos aspectos, também a outros eucariotos, têm atraído a atenção de muitos pesquisadores para estudos realizados com o intuito de identificar a função dos genes desse organismo (TOHGE et al., 2005, MEINKE et al., 1998).



Fonte: www.wikipedia.com

Figura 3: Fotos do milho (*Zea mays*) (A) e *Arabidopsis thaliana* (B)

Para que todo o complexo processo de regulação gênica seja funcional em um organismo faz-se necessário que o sistema de comunicação intra e intercelular esteja funcionando corretamente. A informação, contudo, pode ser transmitida por íons ou várias moléculas orgânicas como aminas, ácidos orgânicos, nucleotídeos, proteínas, esteróides e outras. Essas moléculas mensageiras são transportadas por canais ou poros ou atuam especificamente sobre membranas ou moléculas receptoras intracelulares. Durante os últimos vinte anos foi descoberto que precursores orgânicos como arginina e heme são enzimaticamente transformados em pequenas moléculas inorgânicas (monóxido de carbono e óxido nítrico) que também funcionam como sinalizadores (BOGDAN, 2001). O óxido nítrico (NO) é uma molécula difusível multifuncional envolvida em numerosos processos fisiológicos em espécies distantes filogeneticamente (GOW; ISCHIROPOULOS, 2001).

1.5 Óxido Nítrico:

O óxido nítrico foi inicialmente descrito em mamíferos, onde desempenha funções em diferentes processos desde vasodilatação até neurotransmissão e resposta imune (JAFFREY; SNYDER, 1995, MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Foi demonstrada a presença desse gás em plantas e seu envolvimento na sinalização durante o crescimento, desenvolvimento e respostas adaptativas a múltiplos estresses (DURNER; KLESSIG, 1999). Dependendo de sua concentração efeitos citotóxicos ou citoprotectivos foram observados (LAMATTINA et al., 2003).

Há dois mecanismos principais para a produção do NO em mamíferos: a via de redução do nitrito por uma nitrato redutase (NR), na presença de um NADPH e sem requerer oxigênio (ROCKEL et al., 2002) e a via da óxido nítrico sintase (NOS), uma hemo proteína dimérica que converte L-arginina e oxigênio em citrulina e NO (WEICHSEL et al., 2004). Contudo, estudos sobre como o NO é sintetizado pelas plantas não estão concluídos. Há uma grande variedade de enzimas com potencial na geração de NO, mas ainda não foi encontrado uma óxido nítrico sintase homóloga a de mamíferos. Alguns estudos têm mostrado a importância de enzimas relacionadas à NO sintase na produção de NO pelas plantas, porém, outros estudos afirmam que a enzima nitrato redutase é mais importante. Ainda, muitos trabalhos sugerem o envolvimento de enzimas completamente diferentes (WILSON; NEILL; HANCOCK, 2007). Como alternativa à produção endógena, o óxido nítrico atmosférico ou do solo pode entrar na célula da planta e desencadear uma resposta (PARANI et al., 2004).

O NO atua diretamente sobre moléculas efetoras ou indiretamente modificando o estado redox da célula. Existem exemplos de fatores de transcrição

modificados por NO, como o dedo de zinco, o supressor de tumor p53, fatores de transcrição ligados à resposta imune, o zíper de leucinas AP-1 (BOGDAN, 2001). Até o momento não se tem evidência da existência de um elemento de resposta ao NO na região promotora de genes eucarióticos, mas vários mecanismos indiretos como a formação de peroxinitritos, reação com metais de transição e S-nitrosilação foram propostos (LAMATTINA et al., 2003).

Recentes pesquisas farmacológicas indicam que o NO, o qual atua na sinalização celular nos sistemas vascular, nervoso e imune em vertebrados, também realiza uma importante função na resistência das plantas a doenças. Além do mais, os componentes moleculares da sinalização por NO em plantas são similares àqueles em animais no que diz respeito à produção do cGMP como segundo mensageiro (ZEIER et al., 2004).

1.6 S-nitrosilação:

O NO pode reagir com proteínas formando modificações covalentes pós-traducionais. Em resíduos de Cys (figura 4) a modificação mais estudada atualmente é a S-nitrosilação, a qual consiste na inserção de um grupo nitroso diatômico (NO) formando um grupo nitrosotiol, ou éster tionitrito ($R-S-N=O$). A S-nitrosilação é originada por diferentes espécies reativas de nitrogênio, incluindo óxidos de nitrogênio formados pela reação do NO com O_2 . A S-nitrosilação de proteínas pode, portanto, ser produzida diretamente por essas espécies reativas de nitrogênio ou, ainda, por transnitrosilação de nitrosotióis de baixo peso molecular como glutationas e cisteínas livres (MARTÍNEZ-RUIZ; LAMAS, 2003).

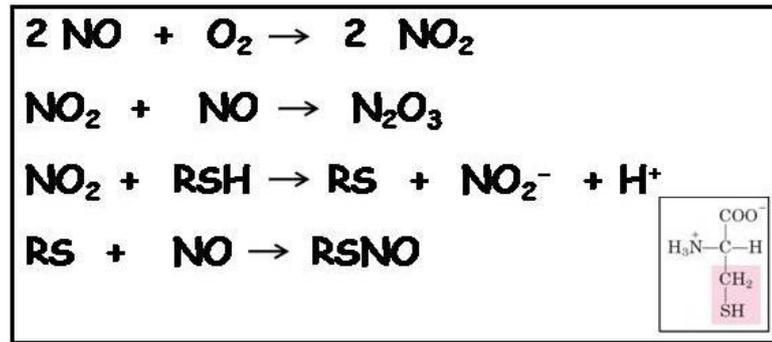


Figura 4: Reações químicas para formação da S-nitrosilação no grupo tiol a partir da reação entre oxigênio e óxidos de nitrogênio. Em destaque: fórmula estrutural do aminoácido cisteína com o grupo tiol na cadeia lateral, no qual ocorre a ligação do grupo NO na S-nitrosilação.

Em enzimas e fatores de transcrição, os resíduos de Cys e a formação ou dissociação de pontes dissulfeto, são freqüentemente cruciais para a estrutura terciária e função da proteína. Isso evidencia que a S-nitrosilação é um mecanismo válido para os efeitos sinalizadores do NO. Esta modificação ainda conta com o critério da reversibilidade, o qual é essencial para muitos eventos de sinalização (BOGDAN, 2001).

A análise dos perfis de expressão gênica em folhas de *A. thaliana* tratadas com NO demonstram a influência deste na atividade transcricional de um amplo grupo de genes (POLVERARI et al., 2003). Recentemente foram identificadas neste organismo várias proteínas S-nitrosiladas como consequência ao tratamento com NO (LINDERMAYR; SAALBACH; DURNER, 2005).

No milho o gene P1 (cor do pericarpo 1) codifica uma proteína de 370 aminoácidos que contém um domínio MYB R2R3 na porção N-terminal (aminoácidos 10-118) (GROTEWOLD; ATHMA; PETERSON, 1991). A proteína P1 controla o acúmulo de 3-deoxiflavonoides (EMERSON, 1917, STYLES; CESKA, 1977) através da ativação transcricional dos genes da via biossintética dos flavonóides C2, CHI e A1. Devido à extensiva caracterização de P1 e à fácil identificação de fenótipos

resultantes da expressão desse gene, P1 tem sido um ótimo modelo empregado no estudo de proteínas MYB R2R3 (GROTEWOLD et al., 1994).

1.7 *AtMYB2*:

No genoma de *A. thaliana* está presente um gene MYB R2R3 que codifica a proteína *AtMYB2*, a qual está envolvida na resposta da planta às condições adversas tais como desidratação e salinidade (URAO et al., 1993). A proteína MYB2 é encontrada também em outros organismos como, por exemplo, em *Trichomonas vaginalis* sendo expressa quando o organismo encontra-se com deficiência de ferro (ONG et al., 2007) e em *Giardia lamblia* na forma de cistos envolvida na diferenciação celular (YANG et al., 2003).

A proteína *AtMYB2* ativa o gene *rd22*, induzido quando a planta enfrenta condições de desidratação (ABE et al., 2003) e o gene *ADH1* quando submetida a baixas concentrações de oxigênio (HOEREN et al., 1998). Genes induzidos por essas condições de estresse assim como o gene de *AtMYB2* também são induzidos por ácido abscísico (ABA) (ABE et al., 2003).

No promotor do gene *rd22*, há uma região de 67 pb que regula a expressão do gene sob condições de estresse. Nesse fragmento existe um sítio de reconhecimento para MYC e um para MYB e a interação entre essas duas proteínas regula a expressão do gene (ABA et al., 2003).

No promotor do gene *ADH1* o fator de transcrição *AtMYB2* se liga a duas seqüências consenso. O motivo GT (5' TGGTTT 3') é essencial para a indução do gene *ADH1* enquanto o segundo motivo, MBS-2, não é necessário. Em baixas concentrações de oxigênio ocorre a expressão do gene *ADH1* e essa expressão se

dá exclusivamente na raiz da planta, onde há a troca do metabolismo de carboidratos da via oxidativa para a via fermentativa. No milho, organismo no qual os eventos moleculares iniciados nessas condições de estresse são estudados em maiores detalhes ocorre a síntese de 2 polipeptídeos de transição de massa molecular em torno de 33 kDa. Depois de cerca de 90 min há a síntese de um grupo de cerca de 20 polipeptídeos anaeróbicos (ANPs), muitos deles envolvidos na fermentação do etanol ou glicólise. A *Arabidopsis* tem uma resposta anaeróbica similar e nessa planta o gene ADH1 é expresso também em presença do hormônio ácido abscísico (ABA) e no caso de desidratação (HOEREN et al., 1998).

Sugere-se que *AtMYB2* seja um dos polipeptídeos de transição e sua síntese é necessária para a expressão de ADH1 e *rd22*, segundo experimentos realizados com cicloheximida, um bloqueador da síntese protéica. Esses ensaios provaram que o gene de *AtMYB2* é expresso nessas condições adversas e que assim, a indução do gene em questão é dada pelo aumento na produção da proteína *AtMYB2* e não pela estabilidade do seu mRNA (HOEREN et al., 1998, URAO, 1993).

AtMYB2 consiste em um fator de transcrição que está envolvido na resposta a diversas condições de estresse, porém, interage com outros fatores para o resultado final da regulação, o que resulta nas suas funções em diferentes genes e diferentes tipos de estresses (HOEREN et al., 1998). Um exemplo dessa interação é dado pela atividade de MYB2 e MYC no promotor do gene *rd22* (conforme citado acima), sendo necessária a ligação dos dois fatores de transcrição ao DNA para que o gene seja transcrito (ABE et al., 2003).

Apesar da grande quantidade de estudos sobre a ação do óxido nítrico nos eventos celulares, os mecanismos moleculares que modulam a expressão gênica por meio do NO são pouco conhecidos. Em vista disto, faz-se importante a

investigação da relação entre o NO e a expressão de membros da família MYB R2R3, caracterizando os efeitos do NO nesses fatores de transcrição. Tais estudos devem contribuir para um maior conhecimento de tais mecanismos moleculares.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Contribuir para o conhecimento do mecanismo molecular de ação do NO na expressão gênica em plantas através de modificações pós traducionais nos fatores de transcrição MYB.

2.2 Objetivos Específicos

- Clonar as seqüências de DNA que codificam os domínios MYB de AtMYB2 (MYB2 de *Arabidopsis thaliana*) no vetor pET-14b;
- Expressar os domínios MYB de AtMYB2 e P1 (MYB do milho) em *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS;
- Purificar os domínios MYB de AtMYB2 e P1;
- Confirmar a capacidade das proteínas de se ligarem ao DNA;
- Determinar a influência do NO na capacidade de ligação das proteínas ao DNA;
- Analisar os efeitos do NO sobre as proteínas, tais como oxidação e/ou nitrosilação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amplificação da região que codifica o domínio de ligação ao DNA MYB de *AtMYB2* e construção do vetor de expressão:

O clone U63651A correspondente ao DNA complementar (cDNA) que codifica a proteína MYB2 completa de *A. thaliana* (*AtMYB2*) foi fornecido pelo Centro de Pesquisa Biológica da *Arabidopsis* (Universidade do Estado de Ohio, Columbus, OH, USA). Este cDNA tem 822 pb e foi usado como molde para amplificar por PCR o domínio de ligação ao DNA de *AtMYB2*, aqui denominado M2D (figura 5). Para isso foram utilizados oligonucleotídeos específicos desenhados com sítios de restrição apropriados flanqueando as extremidades 5' e 3' do gene. O iniciador anverso continha o sítio de restrição *NdeI* (sublinhado), M2Danv (5'-GGA AAT CAT ATG GAT GTA CGG AAA GG – 3'), e o reverso continha o códon de terminação e o sítio de restrição *BamHI* (sublinhado), M2Drev (5' – GTT AAC GGA TCC TTA TTT GGC TTG CTT TTG G – 3').

```
5' gatgtacggaaaggtccatggaccgaggaagaagatgcaatcctag
tcaacttcgtctctattcatggcgatgctcgttggaaccacatcgctc
gttcctctgggctaaagcgaactggtaagagttgtagattaagatggc
ttaattacttacgtccagatgtagaagaggcaacatcactctcgaag
aacaatattatgatcctcaaactccattctctttggggcaatagggtgg
cgaagattgcgcaatatctaccgggaagaacagataatgaaataaaga
attattggagaactcgagtccaaaagcaagccaaa 3'
```

Figura 5: Seqüência de DNA que codifica o domínio MYB de ligação ao DNA da proteína *AtMYB2* (M2D).

A mistura de reação foi obtida com 100 ng de cDNA, 50 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador, 200 pmoles de dNTPs, 1 U de *Taq* DNA polimerase e 1,5

mmol/L de $MgCl_2$, 5 μ l de tampão da *Taq* DNA polimerase (10x) e água ultra pura para um volume final de 50 μ l. O programa do termociclador consistiu em um passo de desnaturação inicial a 95°C por 5 min seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s, anelamento a 60°C por 30 s, extensão a 72°C por 1 min, finalizando com um passo de extensão a 72°C por 10 min.

Os produtos de PCR foram visualizados, após eletroforese, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Para isso foi utilizado um transiluminador acoplado a um sistema de vídeo (``UVP Bioimaging System``) e um computador. Os fragmentos foram purificados com o kit de purificação de PCR ``*Concert, Life Technologies (Rapid PCR Purification System)*``.

O fragmento de DNA e o vetor pET-14b de 4671 pb da Novagen (figura 6) foram digeridos com as endonucleases *NdeI* e *BamHI*. Os produtos da digestão foram visualizados em gel de agarose 1% e a purificação foi feita da mesma forma que já descrito acima. Em seguida foi feita a ligação, com a DNA ligase T4, dos fragmentos amplificados ao plasmídeo. O gene é inserido sob controle do promotor do fago T7 e dessa forma é dependente da RNA polimerase de T7 para ser expresso. Essa, por sua vez, encontra-se no genoma da bactéria (DE3) sob a regulação do promotor do operon lac. O IPTG, por ser um análogo da alolactose, atua como indutor da expressão do gene da RNA polimerase de T7 e conseqüentemente do gene de interesse (figura 7).

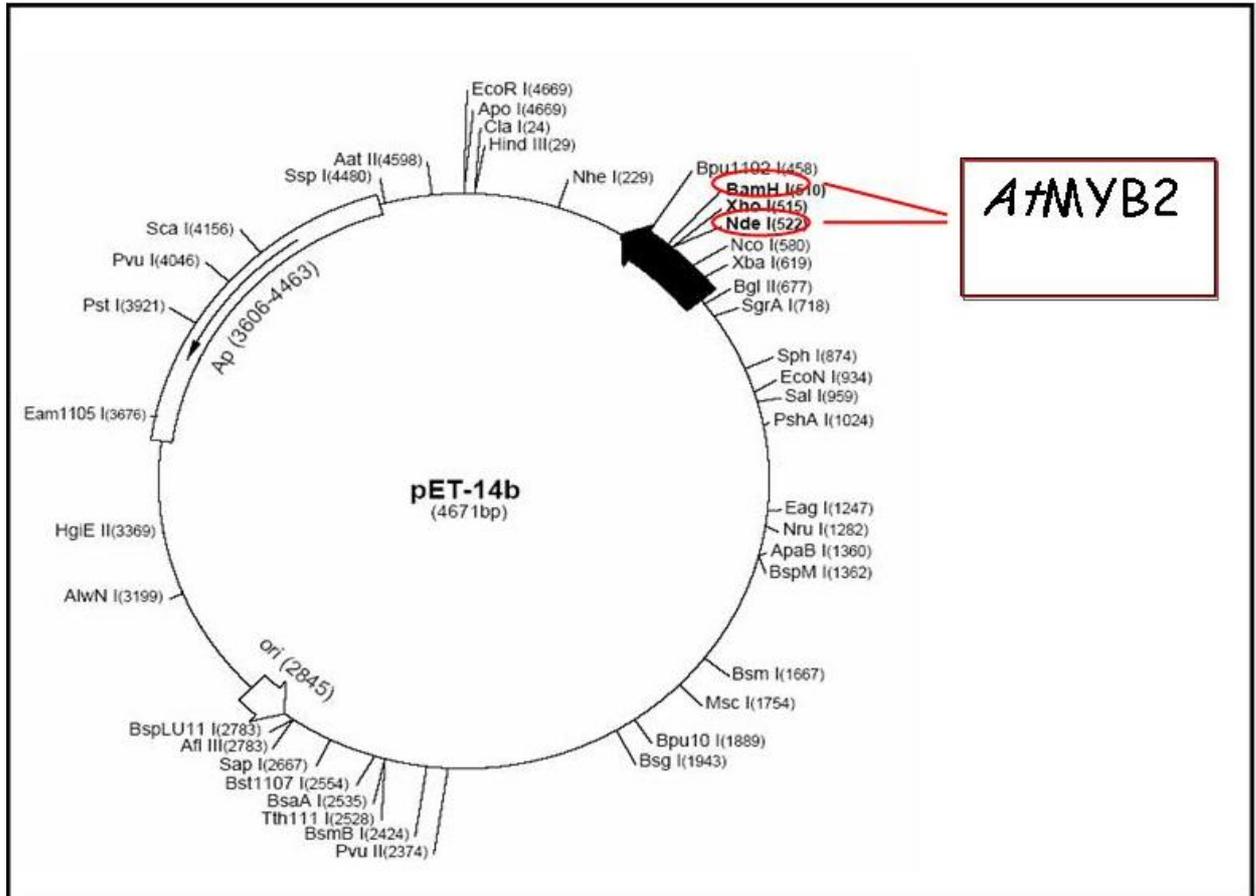


Figura 6: Vetor pET-14b com os sítios de corte para as enzimas de restrição.

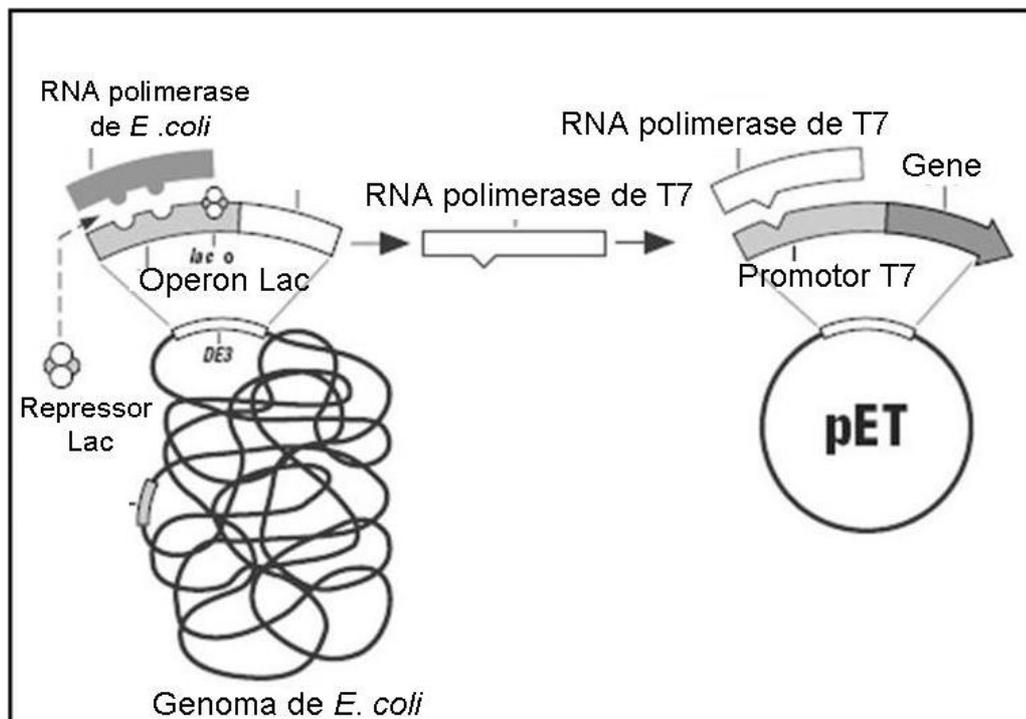


Figura 7: Esquema da indução da expressão gênica no vetor pET-14b por IPTG. A RNA polimerase de T7 está sob controle do Operon Lac. O gene de interesse está sob regulação do promotor do fago T7. (FONTE: www.novagen.com).

O gene é inserido “in frame” e a jusante à seqüência de DNA que codifica a seguinte seqüência de aminoácidos incluindo uma cauda com 6 histidinas: MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH (figura 8).

O plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Essas células são utilizadas como hospedeiras para a clonagem dos genes e propagação dos plasmídeos. Clones com o plasmídeo inserido foram identificados por PCR de colônia e checados por sequenciamento de DNA.

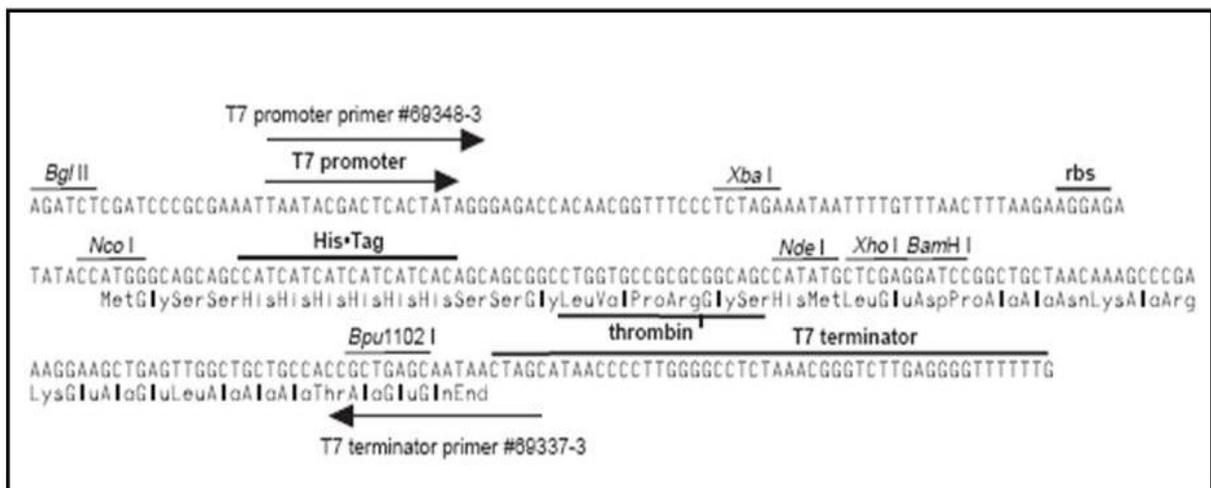


Figura 8: Região de clonagem do vetor pET -14b. Os sítios de corte para as respectivas enzimas de restrição são demonstrados. Os fragmentos foram inseridos entre os sítios *NdeI* e *BamHI* e aos quais foi adicionado um códon de terminação.

Para o PCR de colônia foi colocada a colônia a ser analisada em 50 μ l de água, aquecida a 100°C por 5 min, homogeneizada e centrifugada a 10000 x g por 10 min. O PCR foi feito com 10 μ l do sobrenadante nas mesmas condições de PCR descritas acima. Como controle positivo foi utilizado como DNA molde o fragmento do gene que codifica M2D.

3.2 Preparação de bactérias competentes:

Essa metodologia tem por finalidade tornar, através de tratamento químico, cepas bacterianas capazes de incorporar facilmente fragmentos de DNA. Para isso, foram retiradas bactérias de interesse armazenadas no freezer -80°C e colocadas para crescer 50 ml de meio Lúria Bertani (LB) líquido (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%, pH 7.5). Cultivos celulares foram crescidos a 37°C sob agitação (140 rpm) até atingir uma densidade óptica de 0,4 a 600 nm. Nesse momento (aproximadamente 16 h) foram centrifugados ($6000 \times g$ por 20 min) e homogeneizados em 25 ml de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,1 M gelado, mantidos por uma hora em gelo e centrifugados novamente ($6000 \times g$ por 20 min). Dispensado o sobrenadante, as bactérias foram homogeneizadas em 5 ml de CaCl_2 0,1 M gelado contendo 20% de glicerol e mantidas em gelo durante meia hora (AUSUBEL et al., 1992). As bactérias foram aliquotadas e armazenadas em freezer -80°C .

Todos os protocolos que envolvem a manipulação de bactérias foram realizados em materiais autoclavados e em condições estéreis (capela de fluxo laminar).

3.3 Transformação das bactérias com os plasmídeos Pet14b-M2D e PZmP1:

Com o objetivo de obter colônias isoladas de bactérias com o plasmídeo de interesse inserido foi feita a transformação das bactérias. O protocolo seguido consistiu em adicionar cerca de 100 ng do plasmídeo em uma solução de 100 μl de bactérias e mantê-las em gelo por 30 min, seguido de 45 s a 42°C e novamente em gelo por 2 min. Em seguida foram adicionados 600 μl de meio de cultivo LB e as

bactérias foram mantidas a 37°C por 45 min quando, então, foram plaqueadas em placas de petri com meio LB sólido (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%, ágar 1,5%, pH 7.5) e ampicilina (100 µg/ml) e mantidas a 37°C por 15 h (AUSUBEL et al., 1992). Como controle foi feito o mesmo procedimento com as bactérias que não receberam o plasmídeo, assim, somente foram selecionadas por resistência a ampicilina (cresceram nas placas) as bactérias que corretamente incorporaram o vetor pET-14b, visto que ele é o portador do gene que confere tal resistência. Todo o procedimento foi realizado com material autoclavado e em condições estéreis.

As colônias contendo os plasmídeos recombinantes pet14b-M2D foram identificadas por PCR e a seqüência e incorporação correta do gene *myb2* foram checadas por sequenciamento de DNA. Os plasmídeos foram purificados com o *kit Miniprep Spin QIAprep (Qiagen)*.

3.4 P1 – Fator de transcrição MYB do milho:

O clone, vetor pKM260, de P1 (PZmP1) foi fornecido pelo Dr. Raul Oscar Cássia da Universidade Nacional de Mar del Plata. O domínio de ligação ao DNA de P1 expresso corresponde ao fragmento compreendido entre os resíduos 10 e 118 fusionado com uma cauda de histidinas N-terminal (HEINE; HERNANDEZ; GROTEWOLD, 2004). O vetor confere resistência a ampicilina.

3.5 Expressão das proteínas M2D e P1:

Células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS foram utilizadas pelo seu alto potencial indutor de expressão de proteínas recombinantes pois apresentam um controle mais rigoroso da expressão. Células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS possuem um plasmídeo que confere resistência ao cloranfenicol. As bactérias foram preparadas e transformadas da mesma forma descrita para as células DH5 α . Colônias selecionadas por resistência à ampicilina (100 μ g/ml) e à cloranfenicol (30 μ g/ml) foram usadas para inocular 10 ml de meio LB líquido suplementado com 100 μ g/ml de ampicilina e 30 μ g/ml de cloranfenicol. Os cultivos foram mantidos sob agitação a 37°C durante 15 h. Foram transferidos 5 ml dos mesmos para 250 ml de meio LB novo, suplementado com os mesmos antibióticos citados acima, onde continuaram crescendo sob agitação a 37°C até alcançar 0,6 de densidade óptica (DO) a 600 nm. Nesse momento foi adicionado isopropil - β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 1 mM e o tempo e a temperatura de indução da expressão da proteína M2D seguiu o estabelecido pelo teste de indução (descrito na próxima seção). Para a proteína P1 foi seguido o proposto pela literatura que descreve a expressão dessa proteína em 15 h a 37°C.

As células foram, então, centrifugadas (6000 x *g* por 30 min a 4°C), lavadas com tampão fosfato de sódio (NaH₂PO₄) 50 mM, pH 8 e o precipitado de aproximadamente 1 g foi ressuscitado com cerca de 5 ml de tampão A (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de cloreto de sódio (NaCl), 10 mM de Imidazol, pH 8.0) e inibidores de proteases (“*Complete- Boehringer Mannheim, GmbH, Germany*”). As células foram lisadas por sonicação, 6 ciclos de 20s (“*Fisher Scientific Model 60*”).

Sonic Dismembrator”) e centrifugadas (10000 x g por 30 min a 4°C) para separação da fração solúvel e da insolúvel.

3.6 Teste de indução da expressão de M2D:

Para otimizar as condições de expressão do domínio M2D foram testados o tempo e a temperatura de indução que rendessem uma maior concentração da proteína solúvel. Para células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformadas com o vetor pET14b-M2D foram testados 15°C, 22°C e 37°C nos tempos 0h, 2h e 15h para cada temperatura. O agente indutor, IPTG (1 mM), foi adicionado no momento em que 150 ml de cultivo (meio LB) alcançaram uma DO de 0,6 a 600 nm e esse foi o tempo 0 h (T0h), no qual antes da adição do IPTG foram retirados 50 ml para análise. Depois de 2 h de indução foi retirada uma nova fração de 50 ml para análise do T2h e o mesmo foi feito a 15 h. As amostras foram tratadas do mesmo modo descrito para expressão até a separação das frações solúvel e insolúvel para serem analisadas em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio - SDS-PAGE (*“Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis”*) (SHAGGER e JAGOW, 1987). Como controle foi realizado o mesmo teste com bactérias transformadas com o plasmídeo pET14b, sem o fragmento, para comparação com o perfil basal de expressão da célula de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

3.7 Purificação protéica de M2D e P1:

As proteínas M2D e P1, com a cauda de histidina na porção N-terminal, foram purificadas por cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC) em resina

de sefarose (``Chelating Sepharose Fast Flow``), de acordo com instruções do fornecedor (``GE Healthcare, Uppsala, Sweden``) (figura 9).

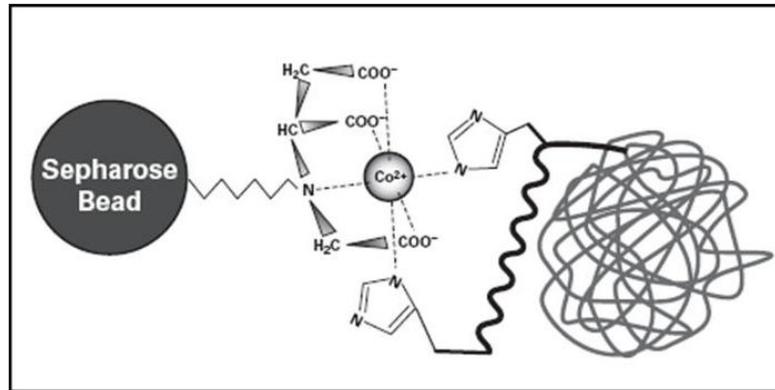


Figura 9: Resina de sefarose. Esquema demonstrando a forma de interação da cauda de histidina da proteína com o metal (nesse esquema o cobalto) imobilizado ao grupo iminodiacético das esferas de sefarose da resina (FONTE: www.ge.com).

A resina (2 ml) foi previamente carregada com sulfato de cobre (CuSO_4) 100 mM e equilibrada com o tampão A (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 10 mM). Para retirar possíveis proteínas contaminantes foram feitas lavagens utilizando tampão A com 60 mM de imidazol. As proteínas foram eluídas da resina com tampões de eluição que consistem no tampão A com 100 ou 250 mM de imidazol (figura 10). A pureza da preparação protéica foi analisada por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 16%, sob condições desnaturantes e redutoras (SHAGGER, JAGOW, 1987). Os géis foram corados com ``Coomassie Brilliant Blue R-250`` 0,250% (50% metanol e 10% ácido acético) (SILVA, 2001) e o conteúdo protéico determinado pelo método de ``Bradford`` (BRADFORD, 1976), com albumina soro bovina como padrão.

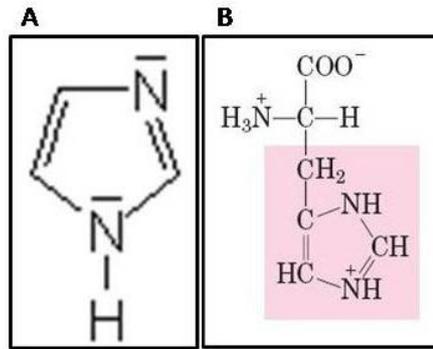


Figura 10: Comparação entre estrutura do imidazol (A) e a cadeia lateral do aminoácido histidina (B), demonstrando a analogia entre as estruturas.

3.8 Análise por Espectrometria de Massa

A identidade da proteína M2D purificada foi confirmada por espectrometria de massa. Foi realizada digestão trípica (WESTERMEIER; NAVEN, 2002) em gel usando 5 µg de M2D purificada e analisada em SDS-PAGE. As amostras digeridas foram enviadas para análise de espectrometria de massa em espectrômetro Ettan MALDI-Tof Pro no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

3.9 Ensaio de ligação das proteínas purificadas ao DNA e teste de retardamento da migração eletroforética (EMSA “ Electrophoretic mobility shift assay”)

Para iniciar o teste de ligação algumas amostras de proteína foram tratadas por 5 min com DTT 1mM para verificar a necessidade da adição de DTT para que ocorresse a ligação. Os ensaios foram realizados em tampão de ligação DNA-proteína (TRIS HCl 10 mM, pH 8.0, glicerol 5%, DTT 1mM, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM e BSA 0,1 mg/ml), em volume final de 20 µl com adição de 15 µM de proteína, mantendo as amostras por 15 min a 25°C. Em seguida foram adicionados 5 µM do DNA dupla fita (figura 11) e o período de incubação estendeu-se por mais 15 min a

25°C (WILLIAMS; GROTEWOLD, 1997). Os fragmentos de DNA específicos para cada domínio de ligação das diferentes proteínas (*INVITROGEN*) foram anelados em um termociclador por 2 min a 95°C mais 20 min a 25°C (figura 11).

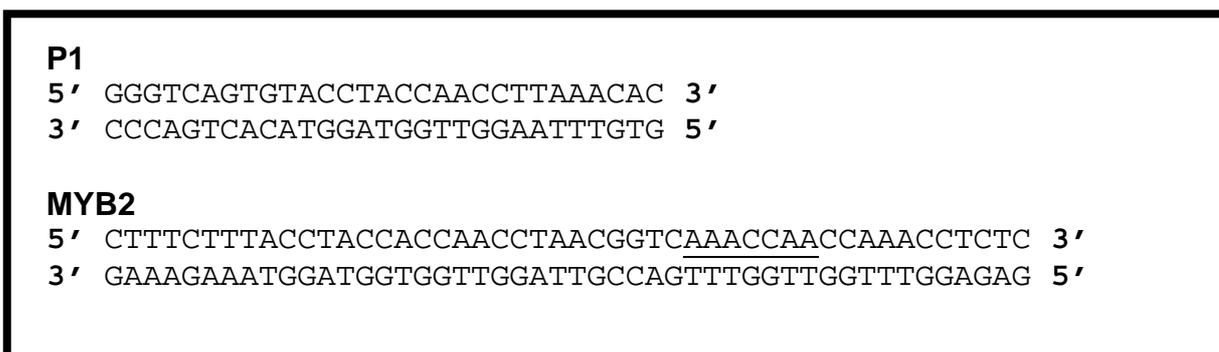


Figura 11: Seqüências de DNA nas quais as proteínas (P1 e MYB2) ligam-se especificamente. Para M2D a seqüência corresponde a região promotora do gene *rd22* no qual o sítio de ligação ao domínio de *AtMYB2* está sublinhado.

3.10 Doadores de óxido nítrico: Nitroprussiato de sódio (NPS) e S-nitrosoglutathiona (SNOG):

Foram utilizados dois tipos de doadores de óxido nítrico para investigação dos efeitos de NO no domínio M2D. A S-nitrosoglutathiona (SNOG) foi utilizada como doadora de NO⁺ (nitrosônio) em uma reação de transnitrosação, na qual o grupo NO do SNOG é transferido a um grupo tiol da proteína (ARNELLE; STAMLER, 1995, ASKEW et al., 1995). Foi também utilizado nitroprussiato de sódio (NPS) como um doador de NO, sendo capaz de liberar NO em solução quando exposto à luz (WANG et al., 2002). O NPS pode atuar como um agente oxidante levando a proteína a formar pontes dissulfeto.

Os doadores de óxido nítrico (5 mM) foram adicionados à amostra após os primeiros 15 min de incubação da proteína com o tampão de ligação, sendo

mantidos a 4 °C por mais 15 min. Um excesso de DTT (50 mM) foi adicionado para testar a capacidade desse agente redutor de reverter os efeitos do óxido nítrico. Em seguida a solução foi mantida por mais 15 min a 4 °C antes da adição das sondas de DNA. Após 15 min a 4 °C da adição das sondas (5 µM) as amostras foram aplicadas ao gel. Os complexos proteína-DNA foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), em condição nativa (não desnaturante), utilizando tampão Tris-borato-EDTA (TBE) e corado com brometo de etídio (figura 12). No ensaio de retardamento da migração eletroforética a formação do complexo proteína-DNA dificulta a migração da sonda de DNA pela matriz de poliacrilamida.

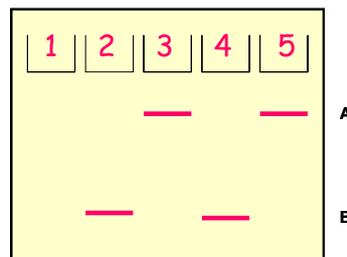


Figura 12: Ensaio de retardamento de migração eletroforética para teste de atividade de ligação ao DNA da proteína AtMYB2. Esquema demonstrando resultado do teste com DNA complexado à proteína **A** e sonda de DNA livre **B**, que migra mais facilmente no gel.

3.11 Ensaio de Biotinilação para detecção de proteínas S-nitrosiladas (“Biotin-Switch”)

Para detecção das proteínas S-nitrosiladas foi realizado experimento de biotinilação (MARTINEZ-RUIZ; LAMAS, 2003). Para isso precipitados bacterianos com as proteínas expressas foram solubilizados e sonicados (de acordo com o descrito na seção de expressão protéica) em tampão HENS (hepes 25 mM, pH 7.7, EDTA 1 mM, SDS 1%). A concentração protéica foi ajustada a 0,5 mg/ml. As proteínas foram tratadas com 1 mM de SNOG por 30 min a 25°C na ausência de luz.

Após a nitrosilação as amostras foram mantidas por 20 min, sob freqüente agitação, com 300 µl de HEPES 25 mM, pH 7.7 contendo EDTA 1 mM, SDS 3,3% (w/v) e S-metilmetanetiosulfônico (MMTS) 27 mM. O MMTS é utilizado para bloquear os resíduos de cisteínas que não foram nitrosilados pelo óxido nítrico. Como controle negativo, para confirmar o efeito do NO, uma fração das amostras foi tratada com 1 mM de glutathiona reduzida (GSH) ao invés de SNOG, sendo que a diferença entre os reagentes consiste unicamente em um grupo NO que está presente apenas na molécula de SNOG.

O excesso de MMTS foi removido por precipitação com 2 volumes de acetona a -20°C e as proteínas foram ressuspensas em 60 µl de tampão HENS. A biotilação foi conseguida com a adição de 1 mM de ascorbato (para retirada dos grupos NO supostamente ligados à proteína) e 2 mM de N-{6-(Biotinamido)-hexil}-3'-(2'-piridilditio) propionamida (biotina-HPDP) para incorporação da molécula de biotina, mantidos a 25°C por 1 h. As proteínas foram, então, precipitadas com acetona e ressuspensas no mesmo volume de tampão HENS (figura 13).

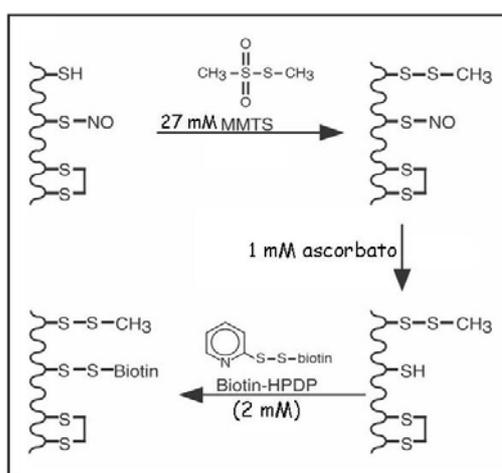


Figura 13: Passos do ensaio de Biotilação após a nitrosilação da proteína. O MMTS bloqueia os resíduos de cisteína não nitrosilados. Em seguida o ascorbato quebra as ligações S-NO deixando o resíduo de cisteína antes nitrosilado agora livre para a ligação à biotina (DERAKHSHAN; WILLE; GROSS, 2007).

Para detectar proteínas biotinizadas por “Western blot”, amostras do ensaio de biotina foram separadas por eletroforese SDS-PAGE, transferidas a membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF), bloqueadas com leite em pó desnatado (1%) e incubadas com anticorpo anti-biotina de cabra (1:10000) (Sigma) por 15 h a 4°C. Em seguida as membranas foram incubadas por 1 h com um anticorpo secundário de coelho anti IgG de cabra e conjugado à peroxidase. Para detectar os sinais foi utilizado kit quimioluminescente da Amershan ECL e para visualizar os resultados filmes Kodak XR (figura 14).

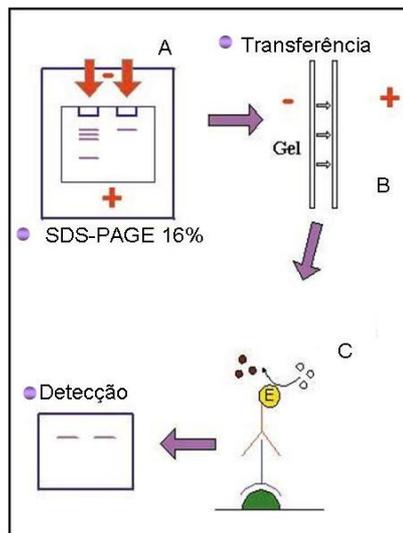


Figura 14: Passos do experimento de western blot: as proteínas são separadas de acordo com a massa molecular por SDS-PAGE. As proteínas são transferidas do gel para a membrana de PVDF (para tornar as proteínas mais acessíveis ao anticorpo) através de uma corrente elétrica, mantendo a mesma disposição do gel. Após o bloqueio de ligações inespecíficas dos anticorpos com leite em pó e a incubação com o anticorpo de interesse é adicionado um segundo anticorpo conjugado à peroxidase. Esta reage com um agente quimioluminescente produzindo fluorescência na reação e permitindo a detecção.

A região da membrana utilizada que continha a banda correspondente à M2D foi recortada, lavada com tampão Gly-HCl 0,1 M, pH 3.0 para retirada dos anticorpos utilizados e incubada com outro anticorpo, dessa vez um policlonal de coelho (1:5000) contra o domínio MYB da proteína P1 (aminoácidos 1-118) com o objetivo

de conferir a identidade do domínio M2D. A visualização foi feita com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PCR do inserto no vetor U63651A

Um fragmento de 348 pb (figura 15), correspondente a região do gene *myb2* que codifica o domínio de ligação ao DNA (M2D) foi obtido da amplificação a partir do cDNA total da proteína *AtMYB2* clonado no vetor U63651A, a qual possui 274 aminoácidos com uma massa molecular de 32 kDa (URAO et al., 1993).

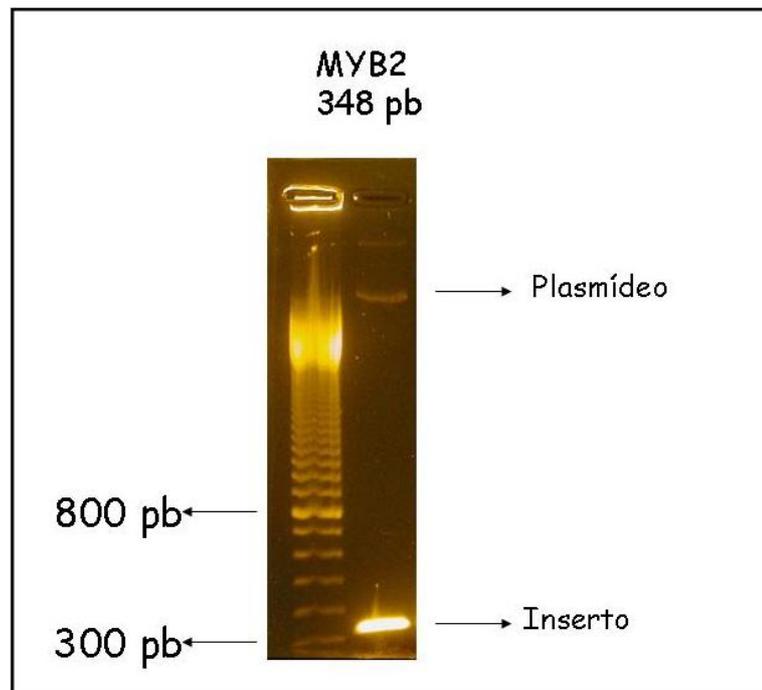


Figura 15: Amplificação do fragmento que codifica o domínio de ligação ao DNA MYB de *AtMYB2*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Bandas correspondem ao fragmento amplificado de 348 pb (inserto) e ao vetor U63651A (plasmídeo) utilizado como DNA molde. Marcador molecular apresentado à esquerda.

4.2 PCR das colônias – (“Coloni-PCR”)

Para conferir quais colônias bacterianas (*E. coli* DH5 α) possuíam o plasmídeo com o gene de interesse foi feito PCR diretamente das colônias transformadas. Os fragmentos amplificados apresentaram os 348 pb esperados que correspondem ao fragmento do gene inserido ao vetor (figura16).

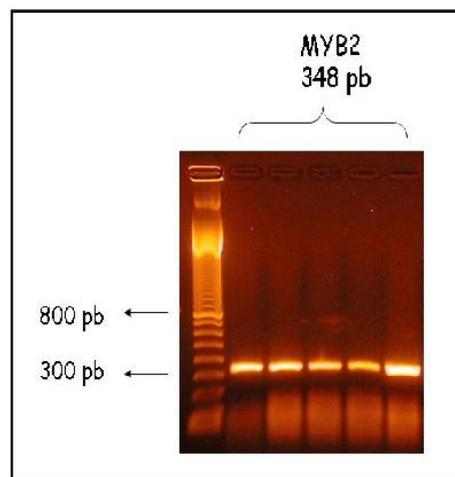


Figura 16: PCR de colônia de *E. coli* DH5 α . Bandas correspondentes ao fragmento de 348 pb são observadas. Marcador molecular é apresentado à esquerda. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

4.3 Extração dos plasmídeos - “Miniprep”

As colônias positivas foram cultivadas e foi realizada a extração dos plasmídeos com kit comercial (figura 17).

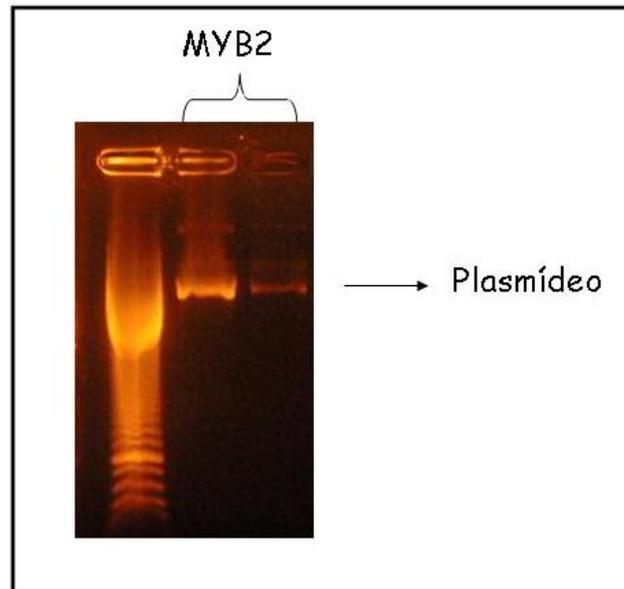


Figura 17: Extração dos plasmídeos das bactérias *E.coli* DH5 α após propagação dos mesmos. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

4.4 Digestão dos plasmídeos com *NdeI* e *BamHI*

Após a extração, os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* (figura 18) para verificar se os fragmentos estavam inseridos nos vetores. A digestão liberou um fragmento de 348 pb conforme o esperado.

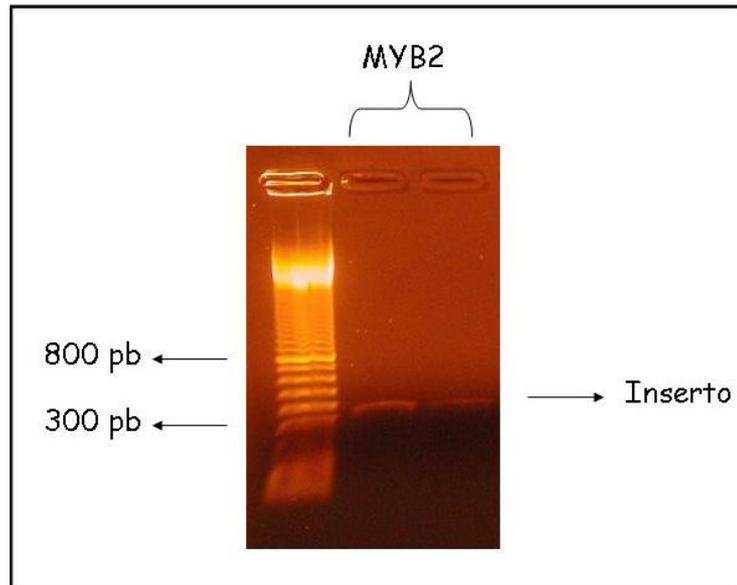


Figura 18: Digestão dos plasmídios com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. Fragmento de 348 pb (inserto) liberado após o corte pelas enzimas confirma a inserção do gene de interesse nos plasmídeos. Marcador molecular apresentado à esquerda. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

4.5 Perfil de expressão – 37 °C - BL21 (DE3) pLysS + pET-14b:

Esse experimento teve como objetivo a obtenção de um perfil do nível de expressão basal das células utilizadas na expressão de proteínas aqui em estudo, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS para comparar com a expressão de proteínas heterólogas. Para isso foram utilizadas células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformadas com o plasmídeo pET-14b sem o fragmento do gene em estudo. As células foram crescidas a 37°C até alcançarem uma DO de cerca de 0,6 a 600 nm, quando foi adicionado o indutor IPTG a uma concentração final de 1 mM. Análises foram feitas antes da adição do indutor, 2 h depois e 15 h depois. Uma comparação entre a fração solúvel e o precipitado foi feita para uma observação mais completa do padrão de expressão (figura 19). É facilmente observado a ausência de uma banda forte correspondente a M2D, em torno de 15 kDa, tanto na forma solúvel quanto no precipitado.

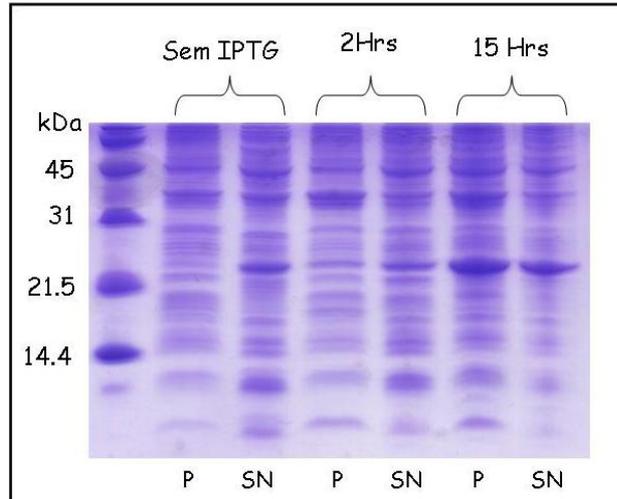


Figura 19: Perfil de expressão de proteínas da bactéria *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformada com o plasmídeo pET-14b sem o gene de interesse. Bandas correspondem às proteínas expressas nos diferentes tempos após a adição do IPTG (0, 2 h e 15 h). Para cada tempo está apresentado o perfil de expressão na fração solúvel (SN) e no precipitado (P). Marcador molecular à esquerda. Gel de poliacrilamida 10% corado com Coomassie.

4.6 Teste de indução de M2D:

Como procedimento normal para toda proteína que se começa a trabalhar, foi feito um teste de indução para M2D (15 kDa) para se conhecer a melhor temperatura e o tempo ideal para a produção dessa proteína na forma solúvel. Foram testadas 3 temperaturas, 15°C, 22°C e 37°C. Para 15°C foi experimentado 15 h após adição do IPTG e para 22°C e 37°C testou-se com 2 h e 15 h de indução. Observou-se que a 37°C a proteína foi expressa na forma insolúvel e por isso foi descartada essa opção de temperatura. Fazendo uma comparação entre 15°C e 22°C foi determinado que 15°C por 15 h era uma boa condição para a expressão de M2D como proteína solúvel (figura 20).

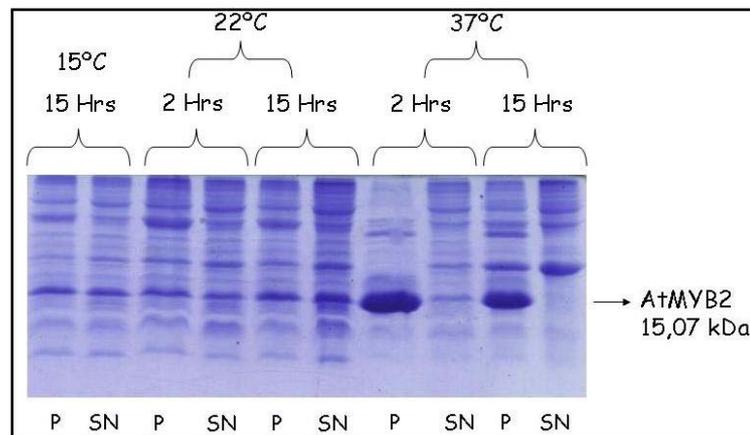


Figura 20: Teste de indução da expressão de M2D. As frações expressas na forma solúvel (SN) e no precipitado (P) são observadas. Bandas correspondentes à M2D (15,07 kDa) estão indicadas.

4.7 Purificação de M2D:

A expressão do domínio de ligação ao DNA de *AtMYB2* (M2D), correspondente à região entre os resíduos 19 e 125 foi feita em células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS como proteína fusionada a uma cauda de 6 histidinas. Devido à propriedade da histidina de se ligar a metais, a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade a metal imobilizado, sendo o cobre o metal utilizado. A retirada de possíveis contaminantes, proteínas ligadas não especificamente à resina, deu-se por 6 lavagens com frações de 10 ml de tampão A com imidazol 60 mM. A eluição da proteína da resina foi feita com 5 frações de 2 ml de tampão A com imidazol 250 mM, visto que o imidazol é um análogo da cadeia lateral do aminoácido histidina e, assim, compete com a proteína pela ligação ao metal da matriz. As eluições foram analisadas em gel SDS-PAGE 16% corado com Coomassie (figura 21) e a identidade confirmada por Espectrometria de Massa.

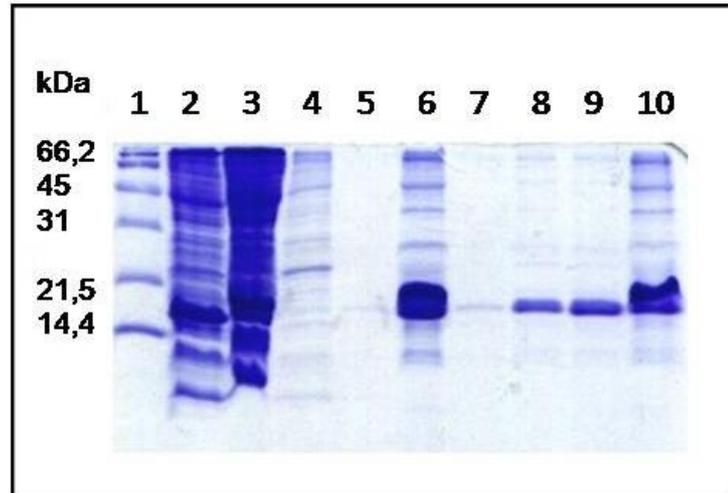


Figura 21: Gel SDS-PAGE 16% com os passos da purificação de M2D. Marcador de peso molecular (1); Extrato solúvel bacteriano (5 μ l) (2); Fração do que não se ligou à resina (10 μ l) (3); Lavagens da resina com tampão A com imidazol 60 mM (15 μ l) (4 e 5); Resina antes da eluição (15 μ l) (6); Eluição com tampão A com imidazol 100 mM (15 μ l) (7); Eluições com tampão A com imidazol 250 mM (15 μ l) (8 e 9); Resina após eluição (15 μ l) (10).

4.8 Purificação de P1:

A proteína P1 foi purificada conforme descrito na literatura (GROTEWOLD et al., 1994) . Foram feitas as mesmas lavagens que em MYB2, mas a eluição ocorreu com tampão A com imidazol 250 mM. As eluições foram analisadas em gel SDS-PAGE 16% corado com Coomassie (figura 22). A proteína purificada foi utilizada como controle nos ensaios de ligação ao DNA e retardamento de migração eletroforética, visto que já foi confirmada a atividade de ligação dessa proteína ao DNA (HEINE; HERNANDEZ; GROTEWOLD, 2004).

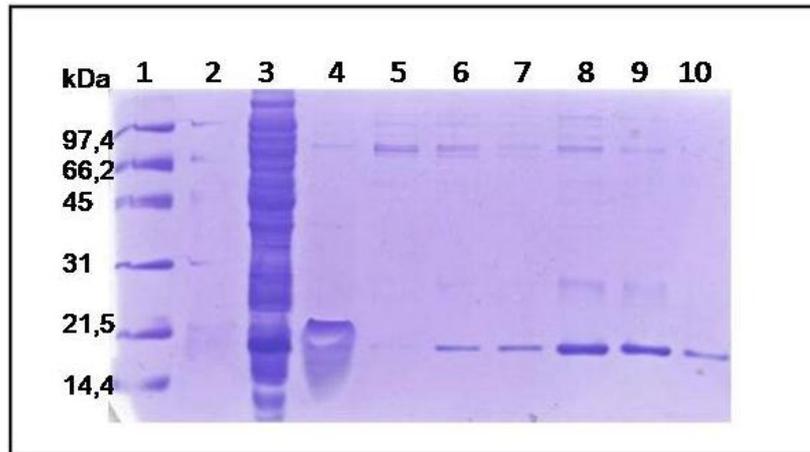


Figura 22: Gel SDS-PAGE com passos da purificação de P1: Marcador de peso molecular (1); Fração solúvel do extrato bacteriano (5 µl) (3); Fração insolúvel do extrato bacteriano (5 µl) (4); Lavagem com tampão A com imidazol 60 mM (15 µl) (5); Eluições com tampão A com imidazol 100 mM (15 µl) (6 e 7); Eluições com tampão A com imidazol 250 mM (15 µl) (8 e 9); Resina após as eluições (15 µl) (10).

4.9 Espectrometria de massa e alinhamento ClustalW:

A identidade do domínio M2D foi confirmada por análise em Espectrômetro de Massa Maldi-Tof da proteína purificada e digerida com tripsina em gel SDS-PAGE (figura 23).

Para caracterização do domínio M2D foi feito um alinhamento (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) das seqüências das repetições 2 e 3 do domínio MYB de *Homo sapiens* com o domínio MYB de *AtMYB2* (M2D). Aminoácidos idênticos cobriram 40% de *AtMYB2*, demonstrando a homologia entre os domínios das duas proteínas (figura 23).

AtMYB2	DVR <u>KGPWTE</u> EEEDAIVNEFVSIHGDAWNIARSSGLKRTGKSCRLR <u>WLN</u> YL <u>RPD</u>	R2
HC-MYB	ELIKGPWTK <u>EEED</u> QRVIELVQKYGPKRWSVIAKHLKGRIGKQCRERW <u>HNHLN</u> PE	
AtMYB2	VRRGNIT <u>LEE</u> QFMILKLHSLWGNRWSKIAQYLPGR <u>TDNE</u> IKNYWRTRVQKQAK	R3
HC-MYB	VKKT <u>SWTE</u> EEEDRIIYQH <u>HKRLGNR</u> QAEIAKLLPGR <u>TDNA</u> IKNHWNSTMRKVE	

Figura 23: Comparação entre as seqüências de aminoácidos de *AtMYB2* (M2D) e do domínio MYB de *Homo sapiens* (HC-MYB). Somente as repetições 2 e 3 são apresentadas, resíduos idênticos são destacados em vermelho e peptídeos identificados por espectrometria de massa estão sublinhados.

4.10 Ensaio de ligação ao DNA – Ensaio de Retardamento de Migração

Eletroforética:

O domínio de ligação ao DNA de *At*MYB2 (M2D) retardou a migração da sonda de DNA-MYB (figura 24, linhas 2 e 3), um oligonucleotídeo dupla fita contendo a sequência consenso 5' – CAAACCAAC- 3', na qual já foi confirmada a ligação de *At*MYB2 (HOEREN, et al., 1998). De acordo com a ausência da segunda cisteína na posição 49, e a não formação de pontes dissulfeto, M2D se ligou à sonda de DNA mesmo na ausência de DTT (figura 24, linha 3), condição na qual não há a ligação de P1 ao DNA, que por sua vez possui duas cisteínas (Cys49 e Cys53) (HEINE, HERNANDEZ e GROTEWOLD, 2004; WILLIAMS e GROTEWOLD, 1997). DTT é necessário também para a atividade de ligação ao DNA de c-MYB, o qual possui somente a Cys130, que é equivalente à Cys53 em *At*MYB2 (BREDEFORD; ANDERSSON; GABRIELSEN, 1998). Essa sensibilidade diferente de c-MYB e *At*MYB2 às condições redox, apesar de ambas possuírem apenas um aminoácido cisteína é uma consequência das diferenças estruturais entre os domínios MYB dessas duas proteínas (HEINE, HERNANDEZ e GROTEWOLD, 2004).

O domínio de *At*MYB2 não se ligou à sonda de DNA-P1 (figura 24 , linha 4), na qual estão superpostos dois motivos consensos de ligação ao DNA de domínios MYB-R2R3 5'-CCTACCAACC-3' e na qual o domínio de P1 se liga (figura 24, linha 6) (WILLIAMS e GROTEWOLD, 1997). Isso demonstra que o padrão de especificidade de *At*MYB2 contraria o de outros domínios MYB-R2R3, conforme demonstrado por P1 ter se ligado ao DNA-MYB (figura 24, linha7). Diferenças quanto ao padrão de ligação ao DNA já foram observadas em estudos prévios, como

por exemplo o proposto por Bergholtz e colaboradores em 2001, que observaram comportamentos diferentes de especificidade e sensibilidade a condições redox entre A-MYB, B-MYB e c-MYB.

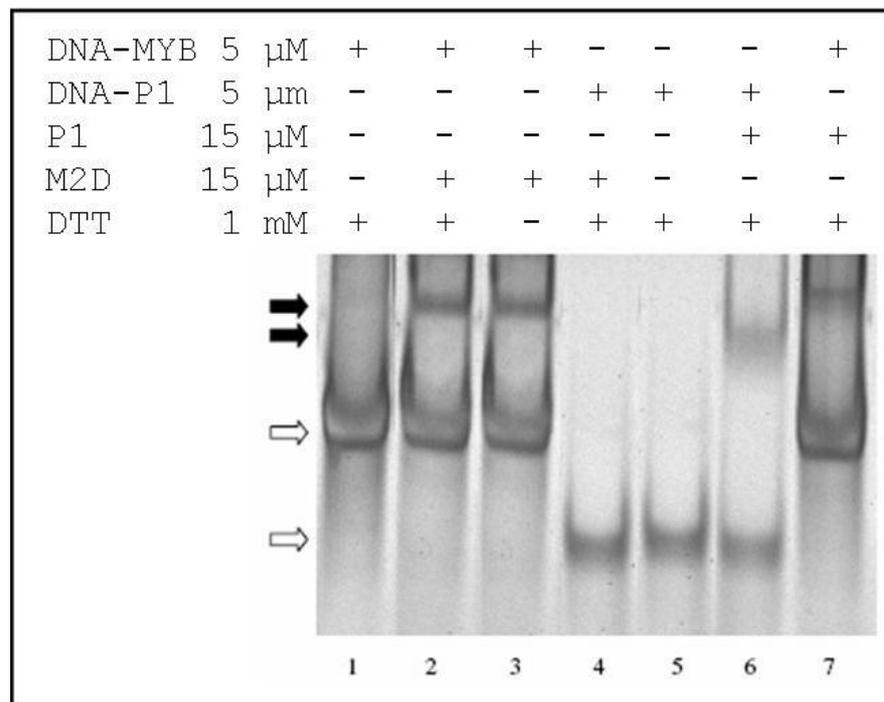


Figura 24: Ensaio de retardamento de migração eletroforética utilizando sonda de DNA dupla fita correspondente à região promotora do gene *rd22*, DNA-MYB (linhas 1, 2, 3 e 7), ou a região promotora do gene A1, regulado por P1, DNA-P1 (linhas 4, 5 e 6). Ensaio foram feitos na presença ou ausência das proteínas M2D ou P1 e DTT (indicado por + e -, respectivamente) antes da incubação com o DNA. As setas escuras e claras indicam complexo proteína-DNA e sonda de DNA livre, respectivamente. Diferença entre migração das sondas de MYB2 e P1 é devido ao tamanho diferente das mesmas.

4.11 Ensaio de ligação ao DNA na presença de doadores de óxido nítrico:

A atividade de ligação ao DNA de A-MYB2 foi fortemente inibida pela ação de agentes nitrosilantes como NPS e SNOG. O nitroprussiato de sódio, eficiente doador de óxido nítrico (WIECZOREK et al., 2006), inibiu a ligação de M2D ao DNA quando adicionado (5 mM) à solução de proteína e mantido por 15 min a 4°C antes da adição da sonda (figura 25, comparar linhas 2 e 3). Quando DTT 50 mM foi

adicionado à proteína tratada com NPS, a ligação ao DNA foi restabelecida (figura 25, linha 4).

Para determinar se o efeito do NPS na atividade de ligação ao DNA de M2D era devido a S-nitrosilação, foi testado o doador de NO mais fisiológico, a S-nitrosoglutathiona (SNOG) (BERENDORF; ANDERSSEN; GABRIELSEN, 1998). O SNOG inibiu a atividade de ligação ao DNA de M2D (figura 25, linha 5) da mesma forma que o NPS e essa inibição também foi revertida com a adição de um excesso de DTT (50 mM) (figura 25, linha 6).

A inibição da formação do complexo foi revertida pelo excesso de DTT, o que sugere que a redução da Cys53 é necessária para a ligação da proteína ao DNA.

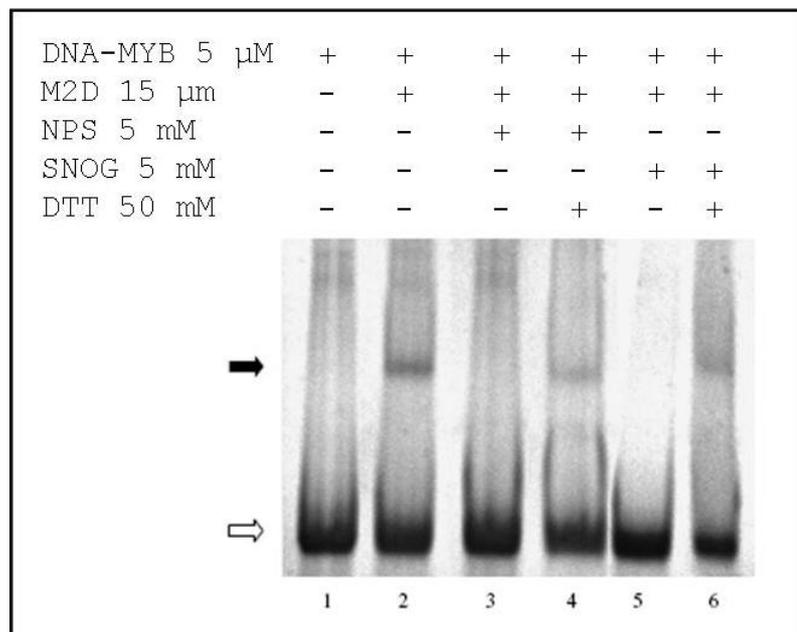


Figura 25: Influência dos efeitos dos doadores de NO (SNOG e NPS) na capacidade do domínio MYB-R2R3 de *AtMYB2* (M2D) de se ligar ao DNA. A presença ou ausência do reagente antes da adição do DNA (5 μ M) está indicada por + e -, respectivamente. *AtMYB2* (15 μ M) foi tratada com NPS (5 mM) ou SNOG (5 mM) por 15 min a 4°C. Quando indicado, um excesso de DTT (50 mM) foi adicionado após os doadores de NO.

4.12 Detecção de proteínas S-nitrosiladas – Ensaio de Biotinilação:

A proteína c-MYB também perde a propriedade de se ligar ao DNA quando tratada com doadores de NO. Sugere-se que esse domínio possa estar sendo regulado por S-nitrosilação (BREDEFORD; ANDERSSON; GABRIELSEN, 1998). O objetivo do presente trabalho foi investigar se esse mecanismo estaria ocorrendo para *AtMYB2*. Para isso foi utilizado o método de biotinilação, o qual consiste em marcar as proteínas S-nitrosiladas com biotina, especificamente o resíduo de Cys S-nitrosilado (JAFFREY; SNYDER, 2001 e MARTINEZ-RUIZ; LAMAS, 2005).

Recentemente o método de biotinilação tem sido aplicado com sucesso em estudos de proteômica para identificar proteínas S-nitrosiladas. Esse ensaio envolve três principais passos: bloqueio de tióis livres, redução específica por ascorbato de S-nitrosotióis a tióis e marcação dos tióis gerados por biotina (ZHANG; KESZLER; BRONIEWSKA; HOGG, 2005).

Proteínas biotiniladas, podem, assim, ser identificadas por “immunoblotting” usando anticorpos anti-biotina. Essa técnica apresenta algumas dificuldades referentes ao passo de purificação protéica tais como a necessidade de uma alta concentração da proteína, a interferência que pode causar o imidazol utilizado na eluição e a precipitação da proteína quando dialisada contra o tampão ideal. Para resolver tais problemas foi realizado neste trabalho um ensaio de biotinilação diretamente a partir do extrato bacteriano com a proteína de interesse superexpressa. Quando o extrato foi tratado com SNOG 1 mM foram identificadas várias bandas representando proteínas nitrosiladas (figura 26A, linhas 1 e 3). Entre elas verificou-se a presença de uma banda de massa molecular correspondente ao domínio de *AtMYB2* em questão (figura 26A, linha 3). Para confirmar a identidade de

M2D, a região da banda foi recortada e lavada para retirada dos anticorpos utilizados na identificação da S-nitrosilação. Em seguida, foi incubada com um anticorpo policlonal anti domínio MYB (figura 26C, linhas 3 e 4). Quando GSH 1 mM foi utilizado no lugar de SNOG nenhuma banda foi detectada (figura 26A, linhas 2 e 4), confirmando que as bandas detectadas nas amostras tratadas com SNOG eram realmente devido a um efeito do NO. A membrana corada com Coomassie (figura 26B) e a membrana recortada e submetida a outro tratamento com novo anticorpo anti-MYB (figura 26A) comprovaram a presença de M2D em amostras tratadas tanto com SNOG quanto com GSH (figura 26 B e C, linhas 3 e 4). Como controle negativo foram feitos os mesmos testes para bactérias transformadas com o vetor pET-14b, ou seja, sem o fragmento codificante para M2D, condição na qual não foi observada banda correspondente à M2D nem por Coomassie nem por Western blot (figura 26A, linha 1; 26B e 26C, linhas 1 e 2). A baixa intensidade da banda correspondente à M2D (figura 26A, linha3) é devida à presença de somente um resíduo de Cys nessa proteína.

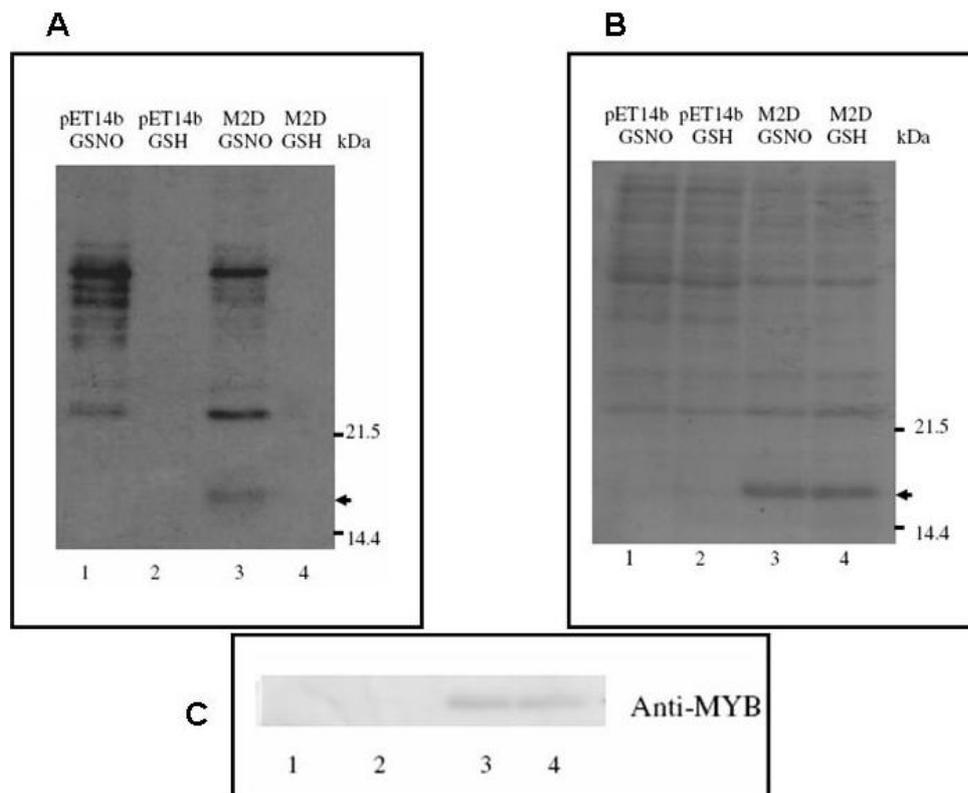


Figura 26: Ensaio de biotilação e western blot. Extrato protéico total (50 ug) com *AtMYB2* superexpressa (M2D) ou de bactérias transformadas com o vetor sem *myb2* (pET-14b) foram tratados com 1 mM de SNOG ou 1 mM de GSH. Em seguida proteínas foram marcadas com biotina. **A** detecção de proteínas S-nitrosiladas: proteínas (20 ug) foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de PVDF. Proteínas biotinizadas foram detectadas com anticorpo anti-biotina.. **B** Proteínas tratadas em A (20 ug) foram separados por SDS-PAGE e coradas com Coomassie. Marcadores de massa molecular são mostrados a direita e seta indica *AtMYB2*. **C** Confirmação da identidade de *AtMYB2*: a mesma membrana utilizada em A foi recortada na faixa de 15 kDa, lavada e incubada com anticorpo policlonal anti domínio MYB.

O mecanismo de S-nitrosilação tem despertado interesse por ser um mecanismo regulatório durante a resposta da planta a condições de estresse e durante mudanças no potencial redox na via de transdução de sinal celular (GRUN et al., 2006 e WANG et al., 2006). Esta foi a primeira vez que evidências experimentais provaram que um fator de transcrição MYB de plantas pode ser nitrosilado (SERPA et al., 2007) (ANEXO 1).

O ácido abscísico (ABA) está relacionado com a produção de NO sob condições de estresse e induz a expressão de *AtMYB2* depois de 24 h de tratamento, sugerindo que a nitrosilação de *AtMYB2* dependente de NO promove um

mecanismo de desligamento da atividade biológica dessa proteína regulatória, depois de já iniciada a resposta ao estresse (ABE et al., 2003). Logo, mudanças no estado redox da célula podem ter conseqüências na expressão de genes regulados por *AtMYB2*.

Resumo dos resultados obtidos nesse trabalho:

- O fragmento do gene que codifica o domínio MYB de *AtMYB2* (M2D) foi amplificado a partir do clone U63651A que continha o cDNA total para *AtMYB2*;
- O fragmento amplificado foi clonado no vetor de expressão pET-14b;
- A proteína M2D foi expressa em células de *E.coli* BL21 (DE3) pLysS, a 15°C por 15 h, com 1 mM de IPTG;
- A proteína M2D foi purificada por cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC) em resina de sefarose com cobre e eluída com imidazol 250 mM;
- A identidade da proteína foi confirmada por Espectrometria de Massa;
- A proteína M2D demonstrou atividade de ligação específica ao DNA correspondente a região do promotor do gene *rd22*;
- A proteína M2D, que apresenta somente uma cisteína na posição 53, se ligou ao DNA mesmo na ausência de um agente redutor como DTT 1 mM;
- A nitrosilação foi detectada pelo método específico de Biotinilação;
- A cisteína da posição 53, altamente reativa, foi nitrosilada por 5 mM de SNOG ou NPS e essa concentração a inibiu a ligação de M2D ao DNA;

- Um excesso de DTT (50 mM) reverteu o feito dos doadores de NO (SNOG e NPS);

5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho evidenciam, pela primeira vez, que um fator de transcrição MYB R2R3 de plantas pode ser nitrosilado. A nitrosilação do resíduo de cisteína (S-nitrosilação) tem se tornado um mecanismo regulatório chave durante a resposta da planta a condições de estresse e a modificações no estado redox em vias de transdução de sinal celular (WANG et al., 2006). Resíduos de cisteína estão presentes em uma grande variedade de proteínas e, freqüentemente, participam na coordenação de metais de transição, como os dedos de zinco. Por outro lado, somente em um pequeno número de proteínas identificadas até hoje, os resíduos de cisteína aparecem modulados por S-nitrosilação (HESS et al., 2005). Dessa forma, a identificação de potenciais alvos susceptíveis a essa modificação pós traducional em plantas contribuirá para o entendimento da relevância funcional desse processo.

A cisteína da posição 53 do domínio de ligação ao DNA de *AtMYB2*, altamente reativa, foi nitrosilada por 1 mM de SNOG, uma concentração que inibe a atividade de ligação ao DNA desse domínio. A nitrosilação foi detectada pelo método de Biotinilação específico, sugerindo que este é o mecanismo responsável pela inibição provocada por NO, da atividade de ligação de *AtMYB2* ao DNA.

O ácido abscísico (ABA) está relacionado diretamente com a produção de NO durante condições de estresse hídrico (LAMATTINA et al., 2003, BRIGHT et al., 2006) e com a expressão de *AtMYB2* (URAO et al., 1993). A nitrosilação de *AtMYB2* dependente de NO pode estar promovendo um mecanismo de desligamento da atividade biológica desta proteína depois de iniciada a resposta à seca. Sendo assim, mudanças no estado redox da célula podem ter conseqüências na expressão

de genes regulados por *AtMYB2*. Este trabalho representa um bom ponto de partida em investigações que buscam esclarecer se a S-nitrosilação é um mecanismo geral de regulação da atividade de fatores de transcrição MYB R2R3.

São perspectivas do presente trabalho a continuidade nos estudos com fatores de transcrição MYB R2R3 e a busca por novos alvos de S-nitrosilação. Para a proteína P1, apesar de bastante estudada e estabelecida a relação entre o NO e a atividade de ligação do domínio ao DNA, não foi identificado o mecanismo pelo qual o NO está atuando.

O domínio de ligação ao DNA da proteína *AtMYB2* será melhor caracterizado bioquimicamente quanto à presença do único resíduo de cisteína nesse domínio. Mutações sítio dirigidas foram realizadas para a troca desse aminoácido por uma alanina e o domínio clonado já foi expresso e purificado. Ensaio de retardamento de migração eletroforética e de biotinylação serão realizados também com esse domínio.

REFERÊNCIAS

- ABE, H.; URAO, T.; ITO, T.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis *AtMYC2* (bHLH) and *AtMYB2* (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signalling. *Plant Cell*, vol. 15, pp. 63-78, 2003.
- ARNELLE, D.R.; STAMLER, J.S. NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 2, pp. 279-285, 1995.
- ASKEW, S.C.; BUTLER, A.R.; FLITNEY, F.W.; KEMP, G.D.; MEGSON, I.L. Chemical mechanisms underlying the vasodilator and platelet anti-aggregating properties of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine and S-nitrosoglutathione. *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 3, pp. 1-9, 1995.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**, 2^o ed., pp. 1.24 - 1.27, 1992.
- BERGHOLTZ, S.; ANDERSEN, T.O.; ANDERSSON, K.B.; BORREBAEK, J.; LUSCHER, B.; GABRIELSEN, O.S. The highly conserved DNA-binding domains of A-, B-, c-MYB differ with respect to DNA-binding, phosphorylation and redox properties. *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, pp. 3546-3556, 2001.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the regulation gene expression. *TRENDS Cell Biol.*, vol. 11, pp. 66-75, 2001.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, vol. 75, pp. 248-254, 1976.
- BRENDEFORD, E. M.; ANDERSSON, K. B.; GABRIELSEN, O. S. Nitric oxide (NO) disrupts specific DNA binding of the transcription factor c-Myb in vitro. *FEBS Lett.*, vol. 425, pp. 52-56, 1998.
- BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T.; WEIR, I.S.; NEILL, S.J. ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis, *Plant J.*, vol. 45, pp. 113-122, 2006.
- DERAKHSHAN, B.; WILLE, P.C.; GROSS, S.S. Unbiased identification of cysteine S-nitrosylation sites on proteins, *Nat. Protoc.*, vol. 2, pp. 1685-1691, 2007.
- DIAS, A.P.; BRAUN, E.L.; MCMULLEN, M.D.; GROTEWOLD, E. Recently duplicated maize R2R3 MYB genes provide evidence for distinct mechanisms of evolutionary divergence after duplication. *Plant. Physiol.*, vol. 131, pp. 610-620, 2003.

DURNER, J.; KLESSIG, D. F. Nitric oxide as a signal in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 2, pp. 369-374, 1999.

EMERSON, R.A. Genetical studies of variegated pericarp in maize. *Genetics*, vol. 2, pp. 1-35, 1917.

GOW, A. J.; ISCHIROPOULOS, H. Nitric oxide chemistry and cellular signalling. *J. Cell Physiol.*, vol.187, pp. 277-282, 2001.

GROTEWOLD, E.; ATHMA,P.; PETERSON, T. Alternatively spliced products of the maize P gene encode proteins with homology to the DNA-binding domain of myb-like transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 88, pp. 4587-4591, 1991.

GROTEWOLD, E.; DRUMMOND, B.J.; BOWEN, B.; PETERSON, T. The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell*, vol. 76, pp. 543-553, 1994.

GRUN, S., LINDERMAYR, C., SELL, S., DURNER, J. Nitric oxide gene regulation in plants, *J. Exp. Bot.*, vol. 57, pp. 507-516, 2006.

GUEHMAN, S.; VORBRUEGGEN,G.; KALKBRENNER, F.; MOELLING, K. Reduction of a conserved Cys is essential for MYB DNA-binding. *Nucleic Acids Res.*, vol.20, pp. 2279-2286, 1992.

HEINE, G.F. **Functional Analysis of P1, a model R2R3 MYB domain transcription factor**. 2006. 155. Tese (Graduate program in Plant Cellular and Molecular Biology) – Graduate School of The Ohio State University, Ohio, USA.

HEINE, G.F., HERNANDEZ, J.M., GROTEWOLD, E. Two cysteines in plant R2R3 MYB domains participate in REDOX-dependent DNA binding, *J. Biol. Chem.*, vol. 279, pp. 37878-37885, 2004.

HESS, D.T.; MATSUMOTO, A.; KIM, S.O.; MARSHALL, H.E.; STAMLER, J.S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, pp. 150-166, 2005.

HOEREN, F.U., DOLFERUS, R., WU, Y., PEACOCK, W.J., DENNIS, E.S. Evidence for a hole for AtMYB2 in the induction of the Arabidopsis alcohol dehydrogenase gene (ADH1) by low oxygen, *Genetics*, vol. 149, pp. 479-490, 1998.

JAFFREY, S.R.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a neural messenger. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 11, pp. 417-440, 1995.

JAFFREY, S.R.; SNYDER, S.H. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins, *Sci. STKE*, L1, 2001.

JIANG, C.; GU, X.; PETERSON, T. Identification of conserved gene structures and carboxy-terminal motifs in the Myb gene family of *Arabidopsis* and *Oryza sativa* L. ssp. indica. *Genome Biol.*, vol. 5, R46, 2004.

KANEI-ISHII, C.; SARAI, A.; SAWAZAKI, T.; NAKAGOSHI, H.; HE, D.N.; OGATA, K.; NISHIMURA, Y.; ISHII, S. The tryptophan cluster: a hypothetical structure of the DNA-binding domain of the myb protooncogene product. *J. Biol. Chem.*, vol. 265, pp. 19990-19995, 1990.

KLEMPNAUER, K.H.; GONDA, T.J.; BISHOP, J.M. Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene. *Cell*, vol. 31, pp. 453-463, 1982.

LAMATTINA, L.; GARCIA-MATA, C.; GRAZIANO, M.; PAGNUSSAT, G. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Ann. Rev. Plant Biol.*, vol. 54, pp. 109-36, 2003.

LEWIN, B. **Regulation of transcription: factors that activate the basal apparatus** IN: **Genes V**. Oxford, pp. 879-910, 1994.

LINDERMAYR, C.; SAALBACH, G.; DURNER, J. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, vol. 137, pp. 921-930, 2005.

LIPSICK, J. S. One billion years of Myb. *Oncogene*, vol. 13, pp. 223-235, 1996.

MACIEL, G. R.; VERNAL, J.; PORTUGAL, R. V.; CALGARO, M.; FERNANDEZ, P.; ZAKIN, M. M.; POLIKARPOV, I.; TEREZI H. Expression, purification and initial structural characterization of rat orphan nuclear receptor NOR -1 LBD domain. *Protein Expr. Purif.*, vol. 37, pp. 443-449, 2004.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; LAMAS, S. Detection and proteomic identification of S-nitrosylated proteins in endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 423, pp. 192-199, 2003.

MEINKE, D.W.; CHERRY, J.M.; DEAN, C.; ROUNSLEY, S.D.; KOORNEEF, M. *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science*, vol. 282, pp. 662-682, 1998.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, vol. 43, pp. 109-142, 1991.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principios de Bioquímica**. 4º ed., Sarvier, 2005.

OGATA, K.; HOJO, H.; AIMOTO, S.; NAKAI, T.; NAKAMURA, H.; SARAI, A.; ISHII, S.; NISHIMURA, Y. Solution structure of a DNA-binding unit of Myb: a helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 89, pp. 6428-6432, 1992.

ONG, S.J.; HSU, H.M.; LIU, H.W.; CHU, C.H.; TAI, J.H. Activation of multifarious transcription of an adhesion protein ap65-1 gene by a novel Myb2 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*, *J. Biol. Chem.*, vol. 282, pp. 6716-6725, 2007.

PABO, C.O.; SAUER, R.T. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 61, pp. 1053-1095, 1992.

PARANI, M.; RUDRABHATLA, S.; MYERS, R.; WEIRICH, H.; SMITH, B.; LEAMAN, D.W.; GOLDMAN, S.L. Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.*, vol. 2, pp. 359-366, 2004.

POLVERARI, A.; MOLESINI, B.; PEZZOTTI, M.; BUONAURO, R.; MARTE, M.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, vol. 16, pp. 1094-1105, 2003.

RABINOWICZ, P.D.; BRAUN, E.L.; WOLFE, A.D.; BOWEN, B.; GROTEWOLD, E. (1999). Maize R2R3 Myb genes: Sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *Genetics*, vol. 153, pp. 427-444, 1999.

RIECHMANN, J.L.; HEARD, J.; MARTIN, G.; REUBER, L.; JIANG, C.; KEDDIE, J.; ADAM, L.; PINEDA, O.; RATCLIFFE, O.J.; SAMAHA, R.R.; CREELMAN, R.; PILGRIM, M.; BROUN, P.; ZHANG, J.Z.; GHANDEHARI, D.; SHERMAN, B.K.; YU, G. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, vol. 290, pp. 2105-2110, 2000.

ROCKEL, P.; STRUBE, F.; ROCKEL, A.; WILDT, J.; KAISER, W.M. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exp. Bot.*, vol. 53, pp. 103-110, 2002.

SAIKUMAR, P.; MURALI, R.; REDDY, E.P. Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in Myb-DNA interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 87, pp. 8452-8456, 1990.

SERPA, V.I.; VERNAL, J.; LAMATTINA, L.; GROTEWOLD, E.; CASSIA, R.; TEREZI, H. Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 361, pp. 1048-1053, 2007.

SHAGGER, H.; JAGOW, G.V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, vol. 166, pp. 368-379, 1987.

SILVA JR., J.G.D. **Eletroforese de proteínas: guia teórico e prático**. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda., 125 p., 2001.

STRACKE, R.; WERBER, M.; WEISSHAAR, B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 4, pp. 447-456, 2001.

THOMPSON, JD; HIGGINS, DG; GIBSON, YJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, Vol. 22, pp. 4673-4680, 1994.

TOHGE, T.; MATSUI, K.; OHME-TAKAGI, M.; YAMAZAKI, M.; SAITO, K. Enhanced radical scavenging activity of genetically modified Arabidopsis seeds. *Biotechnol. Lett.*, vol. 27, pp. 297-303, 2005.

URAO, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; URAO, S.; SHINOZAKI, K. An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*, vol. 5, pp. 1529-1539, 1993.

WANG, Y.; YUN, B.W.; KWON, E.; HONG, J.K.; YOON, J.; LOAKE, G.J. S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants, *J. Exp. Bot.*, vol. 57, pp. 1777-1784, 2006.

WANG, P.G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X.; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A.J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem. Rev.*, vol. 102, pp. 1091-1134, 2002.

WEICHSEL, A.; MAES, E.M.; ANDERSEN, J.F.; VALENZUELA, J.G.; SHOKHIREVA, T.A.; WALKER, F.A.; MONTFORT, W.R. Heme-assisted S-nitrosation of a proximal thiolate in a nitric oxide transport protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol.102, pp. 594-599, 2005.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in practice. A Laboratory Manual of Proteome Analysis**, Wiley-VCH, WEINHEIM, 2002.

WESTON, K. Myb proteins in life, death and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 8, pp. 76-81, 1998.

WIECZOREK, J., MILCZAREK, G., ARASIMOWICZ, M., CISZEWSKI, A. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants?, *Planta*, vol. 224, pp. 1363-1372, 2006.

WILLIAMS, C.E., GROTEWOLD, E. Differences between plant and animal Myb domains are fundamental for DNA binding activity, and chimeric Myb domains have novel DNA binding specificities, *J.Biol. Chem.*, vol. 272, pp. 563-571, 1997.

WILSON, I.D.; NEIL, S.J.; HANCOCK, J.Y. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ.*, 2007.

YANG, H.; CHUNG, H.J.; YONG, T.; LEE, B.H.; PARK, S. Identification of an encystation-specific transcription factor, Myb protein in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 128, pp. 167-74, 2003.

ZARGARIAN, L.; TILLY, V.L.; JAMIN, N.; CHAFFOTTE, A.; GABRIELSEN, O.D.; TOMA, F.; ALPERT, P. MYB-DNA recognition : role of tryptophan residues and

structural changes of the minimal DNA binding domain of c-MYB. *Biochemistry*, vol. 38, pp. 1921-1929, 1999.

ZEIER, DELLEDONNE, M.; MISHINA, T.; SEVERI, E.; SONODA, M.; LAMB, C. Genetic elucidation of nitric oxide signalling in incompatible plant-pathogen interaction. *Plant Physiol.*, vol. 136, pp. 2875-2886, 2004.

ZHANG, Y.; KESZLER, A.; BRONIOWSKA, A.; HOGG, N. Characterization and application of the biotin-switch assay for the identification of S-nitrosated proteins, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 38, pp. 874-881, 2005.

ANEXO 1